

**DOCTORADO EN CIENCIAS Y  
BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS**

**Estudios moleculares durante la formación  
y germinación de embriones de cocotero**

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

**Mayra Itzcalotzin Montero Cortés**

**Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.**

**Mérida, Yucatán, México**

**2009**





CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE  
YUCATÁN, A.C.

## Contenido

<b>Agradecimientos</b> .....	<b>i</b>
<b>Dedicatorias</b> .....	<b>ii</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>iii</b>
<b>Lista de cuadros</b> .....	<b>v</b>
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	<b>vii</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xi</b>
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>1</b>
1 Introducción .....	1
1.1 Bibliografía .....	6
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>11</b>
2 Antecedentes.....	11
2.1 Importancia económica.....	11
2.2 Problemática del cultivo de cocotero y alternativas.....	12
2.2.1 Alternativas para el control del amarillamiento letal.....	14
2.2.2. Mejoramiento genético .....	15
2.3 Embriogénesis somática (ES) .....	16
2.3.1 Embriogénesis somática en cocotero .....	18
2.3.2 Empleo de reguladores de crecimiento en la ES en cocotero .....	21
2.3.3 División celular durante el desarrollo de embriones somáticos .....	24
2.3.4 Genes que promueven el potencial embriogénico .....	26
2.3.5 Genes KNOX durante el desarrollo de embriones .....	29
2.4 Germinación de embriones.....	31

2.4.1 Activación del ciclo celular en la germinación .....	32
2.4.2 Genes que promueven el alargamiento y diferenciación celular durante la germinación .....	34
2.5 Hipótesis .....	37
2.6 Objetivo general .....	39
2.6.1 Objetivos particulares .....	39
2.7 Bibliografía .....	40
<b>CAPÍTULO 3 .....</b>	<b>55</b>
3.1. Efecto del ácido giberélico (AG <sub>3</sub> ) en la formación y germinación de embriones somáticos de cocotero .....	55
3.2. Materiales y métodos .....	57
3.2.1. Material vegetal y condiciones de cultivo .....	57
3.2.2. Embriogénesis somática primaria (ESP) .....	58
3.2.3. Multiplicación de callo embriogénico (MCE) .....	58
3.2.4. Experimentos con giberelina .....	58
3.2.5. Análisis estadístico .....	60
3.3. Resultados .....	61
3.3.1. Efecto de AG <sub>3</sub> en la formación de embriones somáticos de cocotero .....	61
3.4 Discusión .....	65
3.5. Bibliografía .....	67
<b>CAPÍTULO 4 .....</b>	<b>71</b>
4.1. Estudio de la expresión de genes del ciclo celular en la formación y germinación de embriones de cocotero. ....	71
4.2. Materiales y métodos .....	74
4.2.1. Desarrollo de embriones somáticos .....	74
4.2.2. Germinación de embriones cigóticos .....	75
4.2.3. Extracción y cuantificación de ácidos nucleicos .....	76
4.2.4. Síntesis de ADN complementario .....	76
4.2.5. Amplificación por PCR-Tiempo Real .....	77
4.3. Resultados .....	79
4.3.1. Expresión de genes del ciclo celular durante el desarrollo de embriones somáticos en presencia de ácido giberélico .....	79
4.3.2 Expresión de genes del ciclo celular durante la germinación de embriones cigóticos .....	89
4.4. Discusión .....	95

4.4.1	Discusión del desarrollo de embriones somáticos .....	95
4.4.2	Discusión de la germinación de embriones cigóticos .....	98
4.5	Bibliografía .....	101
<b>CAPÍTULO 5</b>	.....	<b>107</b>
5.1	Estudio de la expresión de los genes <i>CnKNOX</i> durante la formación y germinación de embriones de cocotero.....	107
5.2	Materiales y métodos.....	110
5.2.1	Desarrollo de embriones somáticos .....	110
5.2.2	Germinación de embriones cigóticos .....	111
5.2.3	Extracción de ácidos nucleicos y síntesis de ADN complementario.....	111
5.2.4	Amplificación por PCR-Tiempo Real.....	112
5.3	Resultados .....	115
5.3.1	Comparación de secuencias deducidas de aminoácidos .....	115
5.3.2	Expresión de los genes <i>CnKNOX</i> durante el desarrollo de embriones somáticos de cocotero.....	117
5.3.3	Expresión de los genes <i>CnKNOX1</i> durante la germinación de embriones cigóticos de cocotero .....	122
5.4	Discusión .....	124
5.4.1	Comparación de secuencias deducidas de aminoácidos .....	124
5.4.2	Desarrollo de embriones somáticos de cocotero .....	125
5.4.3	Germinación de embriones cigóticos de cocotero .....	127
5.5	Bibliografía .....	130
<b>CAPÍTULO 6</b>	.....	<b>135</b>
6.1	Addition of benzyladenine to coconut explants cultured <i>in vitro</i> improves the formation of somatic embryos and their germination .....	135
6.1.1	Abstract.....	135
6.1.2	Introduction.....	136
6.1.2	Introduction.....	137
6.2	Materials and methods .....	138
6.3	Results and discussion .....	141
6.4	Conclusion .....	149
6.5	References.....	149
6.5	References.....	150
<b>CAPÍTULO 7</b>	.....	<b>153</b>
7.1	Discusión general y perspectivas .....	153
7.1.1	Efecto de AG <sub>3</sub> y benciladenina (BA) en la formación de embriones	

y su germinación .....	153
7.1.2 Estudios moleculares durante la embriogénesis.....	158
7.2 Conclusiones generales .....	166
7.3 Bibliografía.....	167

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de estudios otorgada con el registro **183253**, la cual me permitió realizar mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (CICY) por abrirme sus puertas y facilitarme el desarrollo de mi proyecto de tesis.

Al financiamiento otorgado por el CONACYT por medio del proyecto "Caracterización de genes involucrados en el ciclo celular y el desarrollo en explantes de cocotero (*Cocos nucifera* L.) cultivados *in vitro*". Clave de proyecto 43834 CONACYT.

A los Doctores Luis Alfonso Sáenz Carbonell y Carlos Oropeza Salín por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, por su asesoría y apoyo en este proyecto de tesis. Principalmente quisiera agradecer al Dr Luis Sáenz por su amistad incondicional y confianza que me otorgó a cada paso de esta investigación.

Al los integrantes del Comité Tutoral y Revisores de tesis: Doctores José Juan Zúñiga Aguilar, Jorge Manuel Vázquez Ramos, Ignacio Islas Flores, Javier Orlando Mijangos Cortés y Alfonso Azpeitia Morales, por sus valiosas aportaciones para mejorar esta tesis.

Al M.C. Iván Córdova Lara por su apoyo y asesoría en cada momento en las técnicas moleculares e histológicas y al Ing. José Luis Chan Rodríguez por su asesoría en la parte de cultivo *in vitro*.

## **Dedicatorias**

Dedico esta tesis a mi familia que gracias a su guía, amor y apoyo me han dado la fortaleza para ser una mejor persona y cumplir mis objetivos profesionales. A mis padres Cesar D. Montero y Alma R. Cortés por su cariño, consejos y apoyo incondicional que me han brindado a lo largo de mi vida.

A mi esposo Joaquin A. Qui, a mi hermano Rodrigo y a mi mamá Arcelia que siempre me han dado aliento para continuar. A mi primo Omar Cortés y a su esposa Celene por sus comentarios y observaciones en esta tesis. A mi suegra Deysi y a mi mamá Alma que me apoyaron en los momentos más críticos de la realización de esta tesis, ayudandome en el cuidando de mi más preciado tesoro, mi hija Diana Saslil.

En general dedico esta tesis a mi familia y todos aquellos que aportaron su granito de arena para la realización y conclusión de esta tesis. A los que les extiendo mi más sincero agradecimiento

## Lista de figuras

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
2.1	Desarrollo de embriones cigóticos (A) Dicotiledoneas. (B) Monocotiledoneas.....	17
3.1	Curso temporal del efecto de AG <sub>3</sub> en la formación y germinación de embriones somáticos de cocotero <i>in vitro</i> (medio II, condición II) con material Alto del Pacífico.....	63
4.1	Desarrollo normal y desviaciones del desarrollo durante la embriogénesis somática de cocotero.....	80
4.2	Expresión de <i>CnE2F1</i> durante el desarrollo normal de embriones somáticos así como en desviaciones del desarrollo (tejido no deseado para la formación de plantas).....	82
4.3	Expresión de <i>CnE2F2</i> durante el desarrollo normal de embriones somáticos así como en desviaciones del desarrollo (tejido no deseado para la formación de plantas).....	85
4.4	Expresión de <i>CnCDKA</i> durante el desarrollo normal de embriones somáticos así como en desviaciones del desarrollo (tejido no deseado para la formación de plantas).....	88
4.5	Germinación de embriones cigóticos de cocotero en cultivo <i>in vitro</i> .....	89
4.6	Expresión relativa de genes que regulan el ciclo celular durante la germinación de embriones cigóticos en presencia y ausencia de AG <sub>3</sub> .....	92
4.7	Expresión relativa de genes que intervienen en la regulación del ciclo celular ( <i>CnE2Fs</i> y <i>CnCDKA</i> ) y porcentaje de germinación de embriones cigóticos de cocotero.....	94

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
5.1	Alineamiento de secuencias deducidas de aminoácidos de diferentes genes <i>KNOX</i> .....	116
5.2	Expresión de <i>CnKNOX1</i> durante el desarrollo normal de embriones somáticos así como en desviaciones del desarrollo (tejido no deseado para la formación de plantas).....	119
5.3	Expresión de <i>CnKNOX2</i> durante el desarrollo normal de embriones somáticos así como en desviaciones del desarrollo (tejido no deseado para la formación de plantas) .....	121
5.4	Expresión relativa de los genes <i>CnKNOXs</i> durante la germinación de embriones cigóticos de cocotero en presencia y ausencia de $AG_3$ . .....	123
6.1	Development and germination of coconut somatic embryos in the presence of $100\mu M$ BA.....	142
6.2	The effect of BA on the formation of somatic embryos [SE] in embryogenic calluses [EC].....	144
6.3	The effect of BA on the germination of somatic embryos [SE].....	146
7.1	Esquema de la expresión de genes que intervienen en la regulación del ciclo celular ( <i>CnE2F1</i> , <i>CnE2F2</i> y <i>CnCDKA</i> ) y genes que intervienen en el desarrollo ( <i>CnKNOX1</i> y <i>CnKNOX2</i> ) durante el desarrollo de embriones somáticos y germinación de embriones cigóticos de cocotero, en presencia y ausencia de $AG_3$ .....	165

## Lista de cuadros

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
2.1	Problemática del cocotero.....	13
2.2	Avances recientes de la propagación clonal de cocotero a través de embriogénesis somática en nuestro laboratorio.....	20
4.1	Secuencias de cebadores utilizados para la amplificación de genes del estudio de Tiempo Real-PCR.....	78
5.1	Secuencias de cebadores utilizados para la amplificación de genes del estudio de Tiempo Real-PCR.....	113
5.2	Porcentaje de identidad de las secuencias deducidas de aminoácidos de diferentes genes <i>KNOXs</i> .....	117
6.1	Comparative summary of results of quantitative morphogenic changes with the control treatment (0 $\mu$ M BA) and the best treatment (100 $\mu$ M BA) at day 150, and yields of total somatic embryos and total somatic embryos germinating.....	145
7.1	Cálculo del rendimiento en la formación y germinación de ES empleando el protocolo de multiplicación de CE de cocotero con base a 100 explantes iniciales.....	157



## Lista de abreviaturas

<b>Abreviaturas</b>	<b>Significado</b>
18S	Subunidad Ribosomal 18S
2,4-D	2,4-diclofenoxiacético
ABA	Acido Abscísico
ADNc	Ácido Desoxi-ribonucleico complementario
AG <sub>3</sub>	Ácido Giberélico
AGL15	<i>AGAMOUS-like 15</i>
AL	Amarillamiento Letal
ANOVA	Análisis de Varianza
AP	Alto del Pacífico
ARN	Ácido Ribonucleico
BA	Bencil Adenina
BRs	Brasinoesteroides
C	Coleoptile
CDKA	<i>Cinasa Dependiente de Ciclina A</i>
CE	Callo Embriogénico
cm	Centímetros
CN	Callo no embriogénico
CONACOCO	National Association of Coconut Farmer
Ct	Valor Umbral
CTL	Control
E2F	Factor de transcripción E2F
EC	Embryogenic Callus
EC	Embrión Cigótico
EM	Enano Malayo
Est	Embyogenic Structures
ES	Embrión Somático
ESP	Embriogénesis Somática Primaria
ESS	Embriogénesis Somática Secundaria
FUS3	<i>FUSCA</i>

g	Gramo
GAs	Giberelinas
gp	Germinative pore
<i>KNOX</i>	<i>KNOTTED-like homeobox-containing</i>
L	Litro
<i>LEC</i>	<i>Leafy Cotyledon</i>
LY	Lethal Yellowing
LYD	Lethal Yellowing-like Diseases
M	Molar
MCE	Multiplicación de Callo Embriogénico
mM	Milimolar
mm	Milímetros
MPT2	México Pacific Tall 2
NER	Niveles de Expresión Relativa
PCNA	Antígeno Nuclear de Células en Proliferación
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PEG	Polietilenglicol
<i>PKL</i>	<i>PICKLE</i>
PPFD	Densidad de Flujo fotónico fotosintético
proE	Proembrión
Rb	Proteína del Retinoblastoma
SE	Somatic Embryos
SEg	Somatic Embryos Germinating
<i>SERK</i>	<i>Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase</i>
<i>STM</i>	<i>SHOOT MERISTEMLESS</i>
URE	Unidad Relativa
<i>WUS</i>	<i>WUSCHEL</i>
μM	Micromolar

## Resumen

La superficie y producción de cocotero (*Cocos nucifera* L.) han declinado progresivamente en México y otros países debido a enfermedades letales. Esto ha incrementado la necesidad de una producción masiva de palmas resistentes a enfermedades y productivas para la replantación. La micropropagación es una herramienta útil para este propósito. Actualmente existe gran interés en propagar la variedad Alto del Pacífico por sus características agronómicas. Sin embargo, la micropropagación de cocotero presenta problemas como un bajo número de embriones somáticos y baja tasa de germinación. El objetivo del presente estudio fue incrementar estos parámetros con la aplicación de fitohormonas (ácido giberélico, AG<sub>3</sub> y benciladenina, BA), así como entender y aportar conocimiento básico a través del estudio de genes que podrían estar involucrados en este proceso.

La aplicación independiente de AG<sub>3</sub> y BA incrementó 140% y 923 % respectivamente el rendimiento total en la formación de embriones somáticos y embriones somáticos germinados 322 % y 1210 % respectivamente. Durante la embriogénesis somática los estudios a nivel molecular mostraron que los genes *CnCDKA*, *CnE2Fs* y *CnKNOXs* se expresaron de manera significativa y su expresión se modificó en presencia de AG<sub>3</sub>. En la germinación de embriones cigóticos, la expresión de estos genes se elevó en los primeros días (2 y 8) y en presencia de AG<sub>3</sub> se aceleró y sincronizó la máxima expresión de los genes *CnE2Fs* y *CnCDKA* (día 2), excepto la del gen *CnKNOX1* que disminuyó su expresión.

Los resultados de este trabajo mostraron un incremento en la eficiencia de la micropropagación del cocotero y generaron información para entender el desarrollo y germinación de los embriones somáticos. Todo ello en un futuro podría ayudar a mejorar la eficiencia del proceso.



## ABSTRACT

Coconut (*Cocos nucifera* L.) surface and production have been declining in Mexico and other countries due to deadly diseases. Therefore there is a growing need of massive production of palms resistant to diseases for replanting and micropropagation will be very useful for this purpose. At the present time great interest exists in propagation of the Pacific tall variety for its agronomic traits. However the coconut micropropagation presents low efficiency on the formation and germination of somatic embryos. The objective of this study was to increase these parameters with the application of phytohormones (gibberellic acid and benzyladenine) and have better insights on coconut embryogenesis by mean of the study of genes that could be linked to this process.

The independent application of gibberellic acid and benzyladenine increased the total yield of somatic embryos in 140% and 923% respectively and total yield of germinated somatic embryos in 322% and 1210% respectively. During the somatic embryogenesis the studies at molecular level showed that the genes *CnCDKA*, *CnE2Fs* and *CnKNOXs* showed a significative expression and was modified by gibberellic acid. During the germination of zygotic embryos, the expression of these genes increased the first days (2 and 8) and gibberellic acid hastened and synchronized the maximum expression of the genes *CnE2Fs* and *CnCDKA* (day 2), contrary the *CnKNOX1* decreased its expression.

The results of the present work improved the overall efficiency of coconut micropropagation and gave us better insights to understand the development and germination of somatic embryos; that in a future they could help to improve the efficiency of the process.



## **CAPÍTULO 1**

### **1 Introducción**

El cocotero es un cultivo de gran importancia económica en las regiones tropicales del mundo por ser fuente de alimento, bebida, abrigo y trabajo. La copra es el producto a partir del cual se obtiene el aceite que puede ser utilizado para diversos propósitos como la fabricación de jabones, margarinas, confitería, entre otros. (Punchihewa, 1995). Actualmente, hay tres productos que tienen un gran potencial y cuya explotación podrían ser muy rentable. Dos de ellos, el agua embotellada y el aceite virgen, ya están en el mercado en nuestro país (México), en Estados Unidos y en Europa. El tercer producto es el coco-diesel que, en particular, se usa como aditivo para combustible de origen fósil, pues se ha reportado una reducción de hasta el 90% de las emisiones nocivas al medio ambiente (Bradley *et al.*, 2006).

En más de 90 países, cerca de 12 millones de hectáreas cultivadas de cocotero dan sustento a alrededor de 50 millones de personas. En México se cultivan cerca de 170 mil hectáreas con palma de coco, de las cuales dependen alrededor de 70 mil familias (Consejo Nacional del Cocotero, 2008). Desafortunadamente, en México las áreas dedicadas al cultivo de cocotero se han reducido considerablemente incrementando la posibilidad de desaparecer como un sistema de cultivo económicamente rentable. Esto obedece, entre otras cosas, a la baja productividad de las plantaciones debido a que la mayoría son viejas, al uso limitado de los productos y subproductos que se obtienen de la palma, así como al daño ocasionado a las plantaciones por enfermedades como el

amarillamiento letal (AL), enfermedad causada por fitoplasmas (Plavsic-Banjac *et al.*, 1972), que pueden ser transmitidos a través del homóptero *Myndus crudus* (Howard *et al.*, 1982).

Desafortunadamente la enfermedad del AL continúa muy activo en las plantaciones de Tabasco, Veracruz y amenaza seriamente con desplazarse a la región del pacífico, donde se encuentran la áreas más importantes de este cultivo. La replantación con variedades resistentes es el método más efectivo y viable para enfrentarnos a la enfermedad del AL. En México el INIFAP inició estudios para el desarrollo de híbridos enano x alto con base al Enano Malayo Amarillo y Altos del Pacífico. Posteriormente, el CICY inició estudios de caracterización, productividad y resistencia al AL de materiales presentes en México, permitiendo identificar cinco ecotipos diferentes, de los cuales los ecotipos clasificados como Enano Malayo, Altos del Pacífico 1 y 2 presentaron los niveles con mayor resistencia al AL (Zizumbo *et al.*, 1999).

Otro problema para el cocotero es la disponibilidad de germoplasma (en particular de germoplasma resistente al amarillamiento letal), además de que la propagación por semilla es muy lenta. Tomando en cuenta estos factores, la renovación de la superficie de cultivo de cocotero (a partir de progenitores selectos) que existía en México cuando ingresó el AL (alrededor de 40 millones de palmas), requeriría décadas, lo que podría significar la desaparición del cultivo y de la industria del cocotero. Por lo tanto, se plantea como una alternativa de multiplicación la propagación clonal del cocotero, herramienta que permite la producción masiva de plantas con características genéticas sobresalientes y libre de patógenos (von Arnol *et al.*, 2002).

Se han implementado diversos protocolos de regeneración de plantas para el cocotero, empleando diferentes explantes, tal es el caso de: hojas inmaduras, inflorescencias o plúmulas. Este último tipo de explante ha sido el de mayor respuesta y reproducible, permitiendo la formación de plantas a través de la formación de callos embriogénicos (CE) y embriones somáticos (ES) (Chan *et al.*, 1998). Este protocolo ha mejorado considerablemente su eficiencia debido al establecimiento de un proceso de multiplicación de callo embriogénico (MCE) y embriogénesis somática secundaria (ESS) (Pérez-Nuñez *et al.*, 2006). La combinación de estos protocolos podría permitir la producción masiva de plantas con un genotipo selecto. Sin embargo, aunque estos procesos aumentan de manera importante la formación de embriones somáticos mediante varios ciclos de MCE/ESS, también presentan una baja eficiencia en la formación de callo embriogénico (40-60%). No obstante el paso limitante es el bajo número de embriones somáticos formados (5-7) y un bajo porcentaje de germinación de éstos (12-28%) por cada ciclo de cultivo, por lo que es importante el incremento de estos parámetros para aumentar la eficiencia del proceso de regeneración *in vitro*.

Los principales avances en embriogénesis somática de cocotero se han realizado con la variedad Enano Malayo, ya que ésta había mostrado mayor resistencia al amarillamiento letal. Sin embargo, ahora existe un gran interés en la micropropagación del cocotero Alto del Pacífico porque muestra características agronómicas interesantes (fruto grande, robustez de la planta y contenido elevado de copra), y una baja susceptibilidad al amarillamiento letal. Por lo que en este estudio se buscó el mejoramiento de la embriogénesis somática *in vitro* del cocotero Alto del Pacífico.

Como se mencionó anteriormente, uno de los principales obstáculos para obtener un protocolo de propagación eficiente, es la baja formación y germinación de embriones somáticos. Se ha reportado que los reguladores del crecimiento son clave en estos procesos (Gaj, 2004). En el caso del protocolo actual de cocotero sólo se agrega ácido 2,4-diclofenoxiacético (2,4-D) para inducir el proceso embriogénico. La adición de ácido giberélico ha mostrado que favorece la formación de embriones somáticos (Hita *et al.*, 1997; Rudus *et al.*, 2002) y su germinación (George, 1993). Además, se ha reportado que en algunas monocotiledones, incluyendo cocotero (explantos de inflorescencias) (Verdeil *et al.*, 1994), la adición de una citocinina como bencil adenina (BA) induce la formación de embriones somáticos (Li *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2007).

Por otro lado, durante la embriogénesis cigótica se ha observado que en los estadios de maduración tardíos disminuye la división celular, presentando en la mayoría de las células una detención del ciclo celular en la fase G1 y justo antes de la germinación se reactiva la división celular, tanto en semillas ortodoxas que presentan dormancia como en semillas vivíparas, las cuales no presentan dormancia (Bino *et al.*, 1993; Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003; Sánchez *et al.*, 2005). En el caso de embriones somáticos que presentan un desarrollo continuo como en las semillas vivíparas, se ha observado que en estadios de maduración se reduce la actividad de división y antes de la germinación se incrementa la división celular (Schmidt *et al.*, 2006). También se ha reportado que las proteínas que controlan el ciclo celular, principalmente la transición de la fase G1/S, se incrementan durante el proceso de germinación de embriones cigóticos (Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003; Sánchez *et al.*, 2005) y se induce la expresión

de una ciclina D (Gutierrez *et al.*, 2006). Así mismo, los genes homeóticos de la familia *KNOX* que son reguladores clave del patrón de formación y diferenciación morfológica en los organismos multicelulares, están involucrados en el proceso de embriogénesis cigótica, formando y conservando la identidad del meristemo apical del embrión, al mantener a las células en estado indiferenciado (Laux *et al.*, 2004). También se ha reportado que los genes de esta familia se expresan de manera importante durante la embriogénesis somática (Ma *et al.*, 1994; Hjortswang *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002) y la sobreexpresión de estos genes induce la formación de embriones somáticos (Belmonte *et al.*, 2007).

Por lo tanto en este trabajo se pretende entender y mejorar la embriogénesis somática de cocotero, utilizando dos enfoques: (a) el directo, la aplicación de fitohormonas (giberelina y citocinina) para promover la formación de ES y su germinación; (b) el indirecto, a través de la realización de estudios básicos sobre genes que podrían estar vinculados con el control de la embriogénesis y germinación.

En el segundo enfoque (b), se estudiarán situaciones de contraste en las que se manejarán dos condiciones, ausencia y presencia de ácido giberélico (AG<sub>3</sub>). La información que se genere en este estudio podría servir para entender el desarrollo y germinación de embriones, que en un futuro podrían ayudar a mejorar la eficiencia del proceso de embriogénesis somática *in vitro*.

## 1.1 Bibliografía

- Belmonte MF, Tahir M, Schroeder D, Stasolla C (2007). Overexpression of HBK3, a class I KNOX homeobox gene, improves the development of Norway spruce (*Picea abies*) somatic embryos. J. Exp. Bot. Doi: 10.1093/jxb/erm099.
- Bino RJ, Lanteri S, Verhoeven HA, Kraak HL (1993). Flow cytometric determination of nuclear replication stages in seed tissues. Ann. Bot. 72:181-187.
- Bradley WL, Poel J, Huang H (2006). *Cocos Nucifera*: An Abundant Rewable source of Energy. Proceedings of the International Conference on Renewable Energy for Developing Countries. Disponible en Internet. <http://cere.udc.edu/Cocos%20Nucifera-paper.pdf>. Accesado en 2008.
- Chan JL, Saéñz L, Talavera C, Hornung R, Robert M, Oropeza C (1998). Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explant through somatic embryogenesis, Plant Cell Rep. 17: 515-521.
- Consejo Nacional del Cocotero (CONACOCO) (2008). Disponible en DIALOG. [www.conacoco.com.mx](http://www.conacoco.com.mx). Accesado en Agosto 2008.
- Gaj MD (2004). Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Plant Growth Regul. 43:27-47.
- George FE (1993). 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.
- Gutierrez L, Conejero G, Castelain M, Guénin S, Verdeil

- J-L, Thomasset B, Van Wuytswinkel O (2006). Identification of new gene expression regulators specifically expressed during plant seed maturation. *J .Exp. Bot.* 57, 1919-1932.
- Hita O, Lafarga C, Guerra H, (1997). Somatic embryogenesis from chickpea (*Cicer arietium* L.) immature cotyledons: The effect of zeatin, gibberellic acid and indole-3-butyric acid. *Acta Physiol. Plant.* 19, 333-338.
  - Hjortswang HI, Filonova LH, Vahala T, von Arnold S (2002). Modified expression of the Pa18 gene interferes with somatic embryo development in *Norway spruce*. *Plant Growth Regul.* 38:75-82.
  - Howard FW, Norris RC, Thomas DL (1982). Evidence of transmission of palm lethal yellowing agent by a planthopper, *Myndus crudus*. *Trop. Agric.* 60:168-171
  - Laux T, Würschum T, Breuninger H (2004). Genetic Regulation of Embryonic Pattern Formation. *The Plant Cell*, Vol. 16, S190–S202, Supplement
  - Li R, Bruneau AH, Qu R (2006). Improved plant regeneration and *in vitro* somatic embryogenesis of St Augustinegrass [*Stenotaphrum secundatum* (Walt.) Kuntze]. *Plant Breed.* 125:52-56
  - Ma H, McMullen MD, Finer JJ (1994). Identification of a homeobox-containing gene with enhanced expression during soybean (*Glycine max* L.) somatic embryo development. *Plant Mol. Biol.* 24:465-473.
  - Martin KP, Shahanaz Beegum, Zhang CL, Slater A, Madhusoodanan PV (2007). *In vitro* propagation of *Ophiorrhiza prostrata* through somatic embryogenesis. *Biol. Plant.* 51:769-772.
  - Perez-Nuñez MT, Chan JL, Sáenz L, González T, Verdeil JL, Oropeza C (2006). Improved somatic

- embriogénesis from *Cocos nucifera* (L.) Plumule explants. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 42:37-43.
- Plavsic-Banjac B, Hunt P, Maramorosch K, (1972). Mycoplasma-like bodies associated with lethal yellowing disease of coconut palms. *Phytopathol.* 62: 298-299.
  - Punchihewa PG (1995). Coconut product diversification. In: Oropeza C, Howard FW, Ashborner GR (eds). *Lethal Yellowing Research and Practical Aspects*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. The Netherlands pp. 229-244.
  - Rudus I, Kepczynska E, Kepczynski J (2002). Regulation of *Mendicago sativa* L. somatic embryogenesis by gibberellins. *Plant Growth Regul.* 36:1-5.
  - Sánchez MP, Gurusinghe SH, Bradford KJ, Vázquez-Ramos JM (2005). Differential response of PCNA and Cdk-A proteins and associated kinase activities to benzyladenine and abscisic acid during maize seed germination. *J. Exp. Bot.* 56; 515-523.
  - Schmidt Th, Ewald A, Seyring M, Hohe A (2006). Comparative analysis of cell cycle events in zygotic and somatic embryos of *Cyclamen persicum* indicates strong resemblance of somatic embryos to recalcitrant seeds. *Plant Cell Rep.* 25:643-650.
  - Vázquez-Ramos JM, Sánchez P (2003). The cell cycle and seed germination. *Seed Sci. Res.* 13:113-130.
  - Verdeil JL, Huet C, Grosdemange F, Buffard-Morel J (1994). Plant regeneration from cultured immature inflorescences of coconut (*Cocos nucifera* L.): evidence for somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.* 13:218-221.
  - von Arnol S, Sabala I, Bozhkov P, Dyachok J, Filonova L (2002). Developmental pathway of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 69:233-249.

- Zizumbo D, Fernandez M, Torres N, Cardeña R (1999). Lethal yellowing resistance in coconut germplasm from México. In: Oropeza C., Verdeil JL., Asburner R, Cardeña R, Santamaría JM (eds). Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture. Kluwer Academic Publishers Netherlands p 131-143.
- Zhang S, Wong L, Meng L, Lemaux PG (2002). Similarity of expression patterns of *knotted1* and *ZmLEC1* during somatic and zygotic embryogenesis in maize (*Zea mays* L.). *Planta* 215:191-194.



## CAPÍTULO 2

### 2 Antecedentes

#### 2.1 Importancia económica

El cocotero es un cultivo de gran importancia económica en las regiones tropicales del mundo, por ser fuente de alimento, bebida, abrigo y trabajo. En 90 países, cerca de 12 millones de hectáreas cultivadas de cocotero dan sustento a alrededor de 50 millones de personas. En México se cultivan cerca de 170 mil hectáreas con palma de coco para la producción de copra, de las cuales dependen alrededor de 70 mil familias (Consejo Nacional del Cocotero, 2008).

En el ámbito mundial, México es el séptimo productor de coco y segundo a nivel continente americano, presentando la mayor superficie cultivada de coco en los estados costeros del Pacífico: Guerrero, Colima, Oaxaca, Michoacán, Jalisco, Chiapas, Sinaloa y Nayarit, donde se ubica el 80% del total nacional (Domínguez *et al.*, 1999). Según la FAO, en el 2006 la producción de copra fue de aproximadamente 203, 700 toneladas, que una vez procesada generó 108, 400 toneladas de aceite. Este último producto actualmente puede ser un recurso renovable muy atractivo para la generación de electricidad en zonas rurales y también puede servir para la producción y consumo de biodiesel de la misma zona, ofreciendo una opción mucho más sustentable que la importación del combustible (Bradley *et al.*, 2006).

## **2.2 Problemática del cultivo de cocotero y alternativas**

En la agricultura mexicana se han identificado severos problemas de rentabilidad, capitalización, producción y productividad, generando pobreza extrema en 8.8 millones de habitantes del medio rural, situación demasiado preocupante para la sociedad, más aún si se considera el nuevo escenario de apertura comercial que exige mayores niveles de competitividad para los productores del campo. En este marco, la política de desarrollo del sector agropecuario ha buscado incrementar los ingresos netos de los productores y contribuir al combate de la pobreza rural con acciones de fomento productivo, para aumentar la producción agropecuaria (SARH, 1997).

En el caso de cocotero, considerado como uno de los sistemas-producto más importantes en las zonas costeras de México, actualmente se ha reducido progresivamente su superficie cultivada, incrementando la posibilidad de desaparecer como un sistema de cultivo. La problemática en el sector primario, transformación y servicios para el modelo del cocotero mexicano que se indica en el cuadro 2.1 (Puchnchihewa, 1999; Rogelio-Flores, 2006).

En general, la disminución de la productividad de cocotero y un mercado inestable, han llevado a la búsqueda de nuevas alternativas que permitan preservar la variabilidad genética y aumentar la productividad de los cultivos con la generación de híbridos resistentes o tolerantes a estrés biótico y abiótico como enfermedades; control del amarillamiento letal y pestes; desarrollo de sistemas agroforestales sustentables y productivos basados en cultivos de cocotero; mejoramiento de la eficiencia y valor agregado de los procesos post-cosecha y

su utilización; participación de agricultores en la rehabilitación y replantación del cultivo (Rogelio-Flores, 2006).

**Cuadro 2.1. Problemática del cocotero**

<b>Problemática del sector primario del cocotero</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reducción de las áreas de cultivo, debido a la enfermedad letal conocida como amarillamiento letal y sustitución de la palma de coco por otros cultivos.</li> <li>• Limitado número de variedades de palma de coco en México resistentes al amarillamiento letal.</li> <li>• Uso limitado de los productos y subproductos del cocotero. El consumo es casi exclusivamente como nuez madura, copra y en menor proporción para coco deshidratado y agua.</li> <li>• Persiste el monocultivo en la mayoría de las plantaciones. Menos del 10% de las plantaciones cuenta con cultivos asociados como limón, mango y plátano.</li> <li>• Las plantaciones del cocotero generalmente son viejas. Cuentan con más de 40 años de edad promedio en todo el país.</li> </ul>
<b>Problemática del sector agroindustrial del cocotero</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Debido a un desconocimiento de la diversificación y consumo limitado del mercado interno, los principales productos que se generan en México, bajo un proceso agroindustrial son solamente: coco deshidratado, carbón activado, fibra, copra y aceite.</li> <li>• Desbalance en el aprovechamiento de las partes económicas del cocotero, principalmente el mesocarpo y la madera.</li> <li>• Existen pocas empresas de madera, fibras, dulces y artesanías que pudieran generar ingresos adicionales en las costas turísticas de México.</li> </ul>
<b>Sector comercial y de servicio</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mercado del cocotero limitado a satisfacer a muy baja escala.</li> <li>• La demanda del mercado doméstico poco diversificado en subproductos.</li> </ul>

### **2.2.1 Alternativas para el control del amarillamiento letal**

En México el amarillamiento letal es la enfermedad más devastadora para el cultivo de cocotero, la cual afectó una superficie de 13 mil hectáreas de cultivo (1989 a 1996), sin posibilidad de controlar la enfermedad (Batugal, 1999). El amarillamiento letal es causado por un fitoplasma, el cual es transmitido a través del homóptero *Myndus crudus* al momento de alimentarse del floema de palmas. Las palmas infectadas presentan caída prematura de frutos, oscurecimiento de inflorescencias, amarillamiento ascendente de hojas, pérdida de la corona y finalmente la muerte (McCoy *et al.*, 1983).

Actualmente en México se continúan perdiendo grandes extensiones de cocotero, principalmente en áreas con material susceptible a la enfermedad, por lo que se han establecido estrategias para controlar el vector, como son la aplicación de insecticidas, así como la sustitución de gramíneas bajo el cocotero por especies leguminosas (ya que *M. crudus* se reproduce y pasa gran parte de su ciclo biológico en gramíneas), control del agente causal con la aplicación continua de antibiótico (cada dos meses) hasta la recuperación; destrucción de palmas enfermas, así como eliminación de palmas circundantes. Replantación con germoplasma resistente al amarillamiento letal con características agronómicas deseadas (Domínguez *et al.*, 1999).

### 2.2.2. Mejoramiento genético

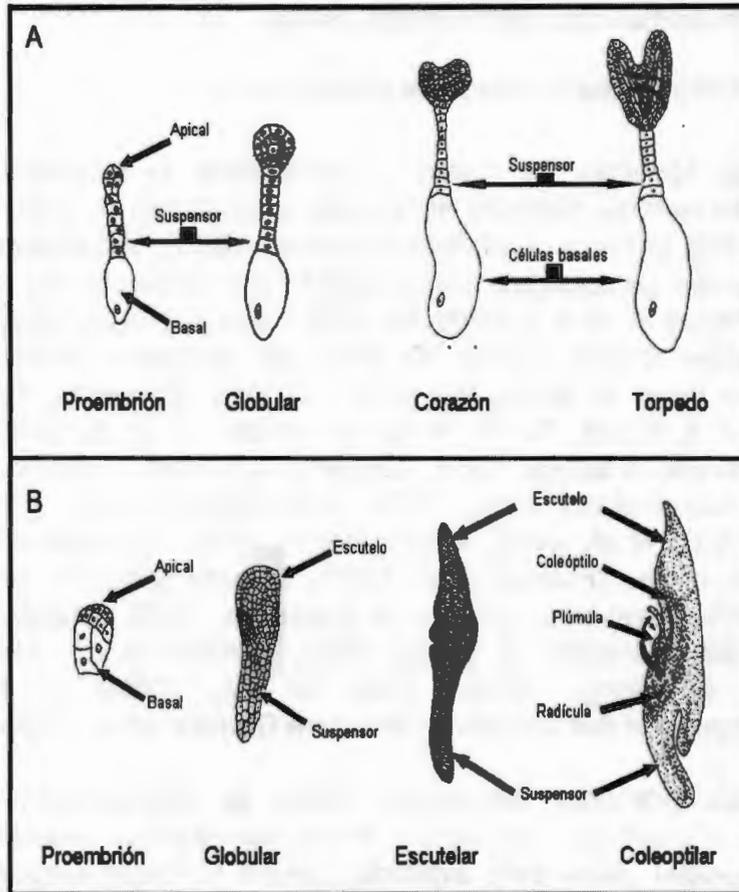
La erradicación del fitoplasma es difícil, y se ha intentado controlar con las estrategias mencionadas anteriormente. Sin embargo, la replantación con germoplasma resistente es el único método preventivo de la enfermedad que hasta el momento se considera aplicable. El control genético del amarillamiento letal del cocotero debe ser mediante el uso de materiales genéticos tolerantes (Zizumbo, 1997), como el cocotero Enano Malayo (EM) y Altos del Pacífico (AP), que presentan un alto grado de tolerancia a la enfermedad (AP X AP) o híbridos tolerantes (cruzas entre cocotereros EM y AP) (Zizumbo *et al.*, 1999). La generación de plantas Altos del Pacífico con alto grado de tolerancia a la enfermedad puede conservar las mejores características de los progenitores, obteniendo la robustez y el tamaño grande de la fruta con el consecuente aumento en el contenido y la calidad de la copra del cocotero Alto del Pacífico.

El empleo de material tolerante al amarillamiento letal del cocotero es una buena opción para replantar aquellas áreas que han sido devastadas por la enfermedad, o sean susceptibles de ser afectadas. Los programas de replantación requieren técnicas eficientes de multiplicación vegetal, debido a que en la naturaleza, la velocidad de multiplicación de la palma de cocotero propagado por semilla es particularmente lenta, por lo tanto el número de semillas es un factor limitante para su propagación (Ashmore, 1997). La tecnología de propagación *in vitro* se plantea como una nueva alternativa de multiplicación en cocotero, de la cual se regeneran plantas a partir de células somáticas. Esta herramienta permite la producción de plantas de un genotipo deseado libre de patógenos y con una tasa de multiplicación alta (von Arnol *et al.*, 2002).

### 2.3 Embriogénesis somática (ES)

Durante la embriogénesis somática, el embrión pasa a través de estados de desarrollo similares a los del embrión cigótico, excepto por la ausencia del suspensor y la carencia de una capa protectora embrionaria que se desarrolla en la embriogénesis cigótica para formar la semilla. El proceso de embriogénesis somática en general tiene tres distintas fases con diferentes requerimientos de fitohormonas. En la primera fase, las células de los explantes se desdiferencian para adquirir la competencia para la embriogénesis somática en respuesta a un estímulo externo (adición de reguladores de crecimiento). En la segunda fase las células competentes toman un camino morfogénico bajo la influencia de reguladores de crecimiento. En la tercera fase la morfogénesis procede independiente del suministro de reguladores de crecimiento (Fehér *et al.*, 2003).

De forma general, el proceso de embriogénesis se caracteriza por la formación de patrones de división celular a lo largo del eje apico-basal, así como la diferenciación del tejido básico en epidermis, cortex y tejido vascular (Wolpert *et al.*, 1998). Los patrones de división del embrión difieren en plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas. En dicotiledóneas el proceso de desarrollo del embrión pasa por una secuencia de estadios globulares, triangulares, acorazonados y torpedo, como se muestra en la Figura 2.1A (Mordhorst *et al.*, 1998). En plantas monocotiledóneas se presentan estadios globulares, escutelares y coleoptilares, que prosiguen con un crecimiento de órganos para su maduración, como se muestra en la Figura 2.1B (Hartmann *et al.*, 1997).



**Figura 2.1** Desarrollo de embriones cigóticos (A) Dicotiledoneas. (B) Monocotiledoneas (modificado y adaptado de Hartmann et al., 1997)

El programa de desarrollo en las plantas es tan flexible, que permite a la célula diferenciada cambiar su programa dependiendo de las necesidades. En cultivos *in vitro*, cambios en la composición y concentración de sustancias en el medio, así como en las condiciones del cultivo, pueden alterar la

división y diferenciación celular, induciendo la formación de embriones somáticos (Zimmerman, 1993).

### **2.3.1 Embriogénesis somática en cocotero**

Las técnicas de cultivo *in vitro* para la propagación masiva de palmas clonales están muy avanzadas en sistemas como palma aceitera o datilera (Tisserat, 1980). Sin embargo, los explantes de cocotero han mostrado ser recalcitrantes para ser cultivados *in vitro*. A partir de 1976 hubo una gran cantidad de reportes sobre cultivo *in vitro* de cocotero utilizando diferentes tipos de explantes como: cogollo (Eeuwens, 1976; Apavatjirut & Blake, 1977), hojas (Pannetier & Buffard-Morel, 1986; Branton & Blake, 1983 ; Gupta *et al.*, 1984 ; Raju *et al.*, 1984 ; Buffard-Morel *et al.* 1988 ; Karunaratne *et al.*, 1991 ; Buffard-Morel *et al.* 1992), embriones cigóticos (De Guzmán *et al.*, 1978), raíces (Fulford *et al.*, 1981), anteras (Nguyen *et al.*, 1983), inflorescencias (Blake & Eeuwens, 1982; Branton & Blake, 1983; Branton & Blake, 1984; Verdeil *et al.*, 1994), plúmula (Hornung, 1995; Chan *et al.*, 1998) y más recientemente la flor femenina inmadura (Perera *et al.*, 2006).

Los primeros resultados sobre la regeneración de cocotero a partir de plúmulas del embrión cigótico mostraron gran potencial, pues este explante generó la mejor respuesta en tiempos cortos, comparado con los otros tipos de explantes utilizados (Hornung, 1995, Chan *et al.*, 1998), pero la eficiencia del sistema fue pobre (Chan *et al.*, 1998). Por lo tanto, la investigación que se ha realizado en el Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. (CICY A.C.) se enfocó a mejorar la eficiencia del proceso (ver Cuadro 2.2), primero con el uso de otra fuente de carbón activado (Sáenz *et al.*, 1999). La adición de brasinoesteroides y ABA/PEG al medio de cultivo (Azpeitia

2003; Azpeitia *et al.*, 2003) y finalmente se estableció un protocolo de multiplicación de callo embriogénico (MCE) y embriogénesis somática secundaria (ESS) que permite obtener nuevo callo embriogénico, empleando como explante inicial estructuras embriogénicas (aisladas de callo embriogénico primario) y embriones somáticos respectivamente (Pérez-Nuñez *et al.*, 2006), incluso ambos protocolos pueden ser combinados. Cabe señalar que en los últimos años, la mayoría de los reportes publicados sobre el cultivo *in vitro* de cocotero ha provenido del grupo de Investigación en micropropagación del cocotero del CICY A.C.

Esta última estrategia podría permitir la producción masiva de plantas con un genotipo selecto. Sin embargo, aunque este protocolo aumenta de manera dramática la formación de embriones somáticos mediante ciclos de MCE/ESS, presenta una eficiencia baja por ciclo de cultivo en la formación de callo embriogénico (40-60%), y una de las principales limitantes de la propagación clonal del cocotero radica en el bajo número de embriones somáticos formados por callo embriogénico (5-7), así como el bajo porcentaje de germinación de éstos (12-28%) (Pérez-Nuñez *et al.*, 2006), lo cual hace que el proceso para la regeneración de plántulas requiera de más tiempo y mayor labor, por lo que es importante el incremento de estos parámetros para aumentar la eficiencia del proceso de regeneración *in vitro*.

**Cuadro 2.2** Avances recientes de la propagación clonal de cocotero a través de embriogénesis somática en el laboratorio del Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. (CICY A.C.)

Reporte	Variedad	Modificación	CE/ 100plúmula	ES/CE	ES/ 100plúmula	Plántulas/ 100 plúmula
Chan <i>et al.</i> , 1998	EMV	Referencia	40	ND	ND	ND
Sáenz, 1999	EMV	Carbón activado	60	6	360	0.7
Azpeitia, 2003	EMV	Brasinoesteroides <sup>A</sup>	90	12	1080	ND
Azpeitia <i>et al.</i> ,2003	EMV	ABA/PEG	---	10	---	3
Pérez <i>et al.</i> , 2006	EMV	MCE/ESS <sup>A</sup>	61	6.2	9.8 millones	ND
CICY, 2007	AP	Carbón activado tamizado <sup>A</sup>	40 a 70	---	---	---

(A) Mismas condiciones y formulación de acuerdo a Sáenz *et al.*, 1999. (EMV) Enano Malayo Verde. (AP) Altos del Pacífico.

Los estudios de embriogénesis somática de cocotero reportados hasta el momento son en el cocotero Enano Malayo, el cual presenta mayor resistencia al amarillamiento letal. Sin embargo, agronómicamente el cocotero Alto del Pacífico es considerado de mayor valor económico (fruto grande, robustez de la planta y contenido elevado de copra), presentando diferentes grados de susceptibilidad al amarillamiento letal. En este estudio se buscó el mejoramiento de la respuesta embriogénica en la propagación *in vitro* del cocotero Alto del Pacífico con alta productividad y con un alto grado de tolerancia al amarillamiento letal.

### **2.3.2 Empleo de reguladores de crecimiento en la ES en cocotero**

El empleo de reguladores de crecimiento (auxinas, citocininas, brasinoesteroides, ácido abscísico y ácido giberélico, entre otros) ha favorecido la embriogénesis somática en diversas especies de plantas. Las auxinas y las citocininas son reguladores de crecimiento que actúan para controlar muchos de los procesos centrales del desarrollo en plantas. El balance entre estas hormonas puede regular la morfogénesis para favorecer la formación de embriones somáticos, probablemente por su participación en la regulación del ciclo celular y división celular (Francis & Sorrell, 2001). Por otra parte, los brasinoesteroides (BRs) inducen un amplio rango de respuestas en la planta como son: incremento en la elongación de tallos, aumento en la expansión de hojas, crecimiento del tubo polínico, entre otras (Clouse & Sasse, 1998). En algunas especies de coníferas, arroz y algodón, se ha reportado que la adición externa de BR en cultivo *in vitro* aumenta la formación de embriones somáticos y favorece la

transición de las fases de maduración (Pullman *et al.*, 2003; Aydin *et al.*, 2006). El empleo de ácido abscísico (ABA) en sistemas que presentan altos porcentajes de embriones inmaduros, favorece su maduración aumentando los porcentajes de conversión (Veisseire *et al.*, 1994). En el caso del ácido giberélico ( $AG_3$ ), su empleo en la formación de embriones somáticos ha sido poco estudiado; sin embargo, en algunos géneros como *Cicer*, *Pelargonium* y *Medicago* favorece la embriogénesis somática (Hita *et al.*, 1997; Hutchinson *et al.*, 1997; Rudus *et al.*, 2000).

Durante la **embriogénesis somática primaria** de cocotero (explante inicial plúmula), se ha reportado que la aplicación de auxina (2,4-ácido diclorofenoxiacético; 2-4-D) induce la formación de callo embriogénico y en combinación con citocinina (benciladenina; BA) se presenta un efecto negativo en la formación de callo embriogénico proveniente del ecotipo Enano Malayo (Chan *et al.*, 1998; Azpeitia, 2003). Sin embargo, en otros cultivos se ha observado que la respuesta del potencial embriogénico por la adición de citocininas depende mucho del tipo de explante inicial (Li *et al.*, 2006) y genotipo empleado (Portillo *et al.*, 2007). En el caso de cocotero, el empleo de brasinoesteroides y la combinación del ácido abscísico/polietilenglicol (ABA/PEG) favoreció la formación de ES durante la embriogénesis somática primaria (ESP). La adición de BR durante la ESP requiere de un pre-cultivo de tres días para tener una respuesta favorable tanto en la formación de CE como en la formación de ES. En el caso de ABA/PEG, también se incrementa el número de ES por callo embriogénico en un tiempo más prolongado (Azpeitia, 2003). Estudios preliminares indicaron que la adición de  $AG_3$  incrementa la proporción de callos embriogénicos que presentan ES germinados, sin prolongar los tiempos de cultivo

(Final Report, 1998) en la variedad Enano Malayo. Es de gran interés profundizar en este estudio y determinar el efecto de AG<sub>3</sub> en la formación y germinación de ES en la variedad Alto del Pacífico.

Es importante mencionar que hasta el momento los estudios realizados para incrementar la respuesta embriogénica por la adición de fitohormonas ha sido con base al protocolo de embriogénesis somática primaria (explante inicial; la plúmula) en la variedad Enano Malayo y no se ha determinado el efecto de fitohormonas basado en el protocolo de multiplicación de callo embriogénico (explante inicial, estructuras embriogénicas aisladas a partir de callo embriogénico). Este aspecto es de gran importancia, debido a que el potencial embriogénico depende tanto del tipo de explante inicial empleado para inducir embriogénesis somática, el genotipo, así como la composición del medio de cultivo, adición de fitohormonas (Gaj, 2004). Es de gran interés desarrollar estrategias que incrementen el potencial embriogénico para cada etapa del protocolo (multiplicación de callo embriogénico y embriogénesis somática secundaria), y así aumentar la eficiencia del sistema de regeneración de cocotero. Basados en el protocolo de MCE (explante inicial estructuras embriogénicas), el objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto del AG<sub>3</sub> y la benciladenina (BA) durante la formación y germinación de ES del cocotero Alto del Pacífico.

### **2.3.3 División celular durante el desarrollo de embriones somáticos**

En plantas la estrategia de crecimiento y patrones de formación es continuo durante su ciclo de vida, presentando un balance permanente entre la proliferación y la diferenciación celular (den Boer & Murray, 2000). El potencial de proliferación (división celular), proceso indispensable para la generación y desarrollo de embriones somáticos, es influido por fitohormonas, afectando la expresión transcripcional de genes involucrados en la regulación del ciclo celular (Pozo *et al.*, 2005; Quiroz *et al.*, 2006).

La división celular involucra la progresión del ciclo celular, en el que la célula duplica su material genético (fase S) y segrega los cromosomas a cada una de sus células hijas (fase M). Este proceso involucra fases de intervalo (G1 y G2) entre las fases S y M en cada ciclo, en el que la célula incrementa su tamaño aumentando el número de proteínas y organelos, evitando que las células reduzcan su tamaño por ciclo de división celular (Lewin, 2001).

La interfase entre proliferación y diferenciación se presenta en el punto de restricción G1, en el que es determinante la duración de la fase G1 del ciclo celular, repercutiendo en la cantidad de información genética generada para el desarrollo (Neumann 2000; Fukuda & Konamine, 1985). La transición de la fase G1 a la fase S está dada por la vía de regulación transcripcional E2F/RB. Esta vía juega un papel crucial en la regulación de la expresión de genes que intervienen tanto en la proliferación como en la diferenciación (Gutierrez *et al.*, 2002). En esta vía el complejo ciclina D/CDK se encarga de la fosforilación de la proteína del retinoblastoma

(pRb), que resulta en la disociación del complejo Rb-E2F permitiendo la liberación de E2F, el cual es un factor de transcripción importante en la modulación de genes blanco que afectan la proliferación celular, diferenciación y morfogénesis (Magyar *et al.*, 2005; Gutiérrez, 2002).

Durante la embriogénesis somática es necesaria la reactivación del ciclo celular en células diferenciadas para la iniciación de células con potencial embriogénico, así como en la formación y desarrollo de organismos multicelulares (Parternak *et al.*, 2002; Gutierrez, 2005; Ramírez *et al.*, 2005). Estudios a nivel molecular de genes involucrados en la regulación del ciclo celular durante el desarrollo de embriones somáticos son importantes para el entendimiento y mejora del proceso.

En cocotero se han aislado secuencias homólogas de genes que intervienen en la regulación del ciclo celular como: *CDK-A*, *E2F1*, *E2F2* y *Rb* (Sandoval, 2003; Sáenz, datos no publicados). Se han efectuado análisis de expresión de *CDK-A*, *Rb* y *E2F1* durante la formación de callo embriogénico en la embriogénesis somática secundaria. Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que al menos en el caso de *CDK-A*, los patrones de amplificación coinciden con eventos morfológicos (mayor crecimiento de callo) durante la inducción de callo embriogénico, y al parecer incrementos en la expresión de *CDK-A* por ciclo de cultivo (entiéndase como ciclo de cultivo la generación de CE hasta la formación y desarrollo de ES) coinciden con un aumento en el potencial embriogénico en dicho ciclo de cultivo (Pérez Núñez, 2006). Las evidencias en este estudio parecen indicar una relación entre los niveles de transcritos de los genes que regulan el ciclo celular y los procesos morfogénicos que tienen lugar en la formación de

callo embriogénico (Pérez Núñez, 2006).

Los estudios de expresión de genes que regulan el ciclo celular realizados hasta el momento en cocotero han sido en la etapa de iniciación y formación de callo embriogénico, por lo que en esta tesis se realizarán estudios de la expresión de estos genes (*CDK-A*, *E2F1*, *E2F2*) durante el desarrollo de embriones somáticos en ausencia y presencia de  $AG_3$  (condición que favorece la formación de embriones somáticos).

#### **2.3.4 Genes que promueven el potencial embriogénico**

La embriogénesis somática es el desarrollo reestructurado de células somáticas hacia una vía embriogénica, resultado de la capacidad totipotencial de las plantas. En ésta, las células somáticas presentan cambios en la expresión de genes que llevan a la iniciación de células con potencial embriogénico para la generación de embriones (Chugh & Khurana, 2002). Aunque en la actualidad se desconocen los mecanismos moleculares que involucran la transición de células somáticas a células con potencial embriogénico, se han identificado genes que tienen una función crítica en promover el potencial embriogénico y tienen una participación activa durante el desarrollo de embriones.

*WUSCHEL* (*WUS*) es un gen homeótico requerido para el mantenimiento de la identidad y funcionalidad de células madres del centro meristemático apical del brote, que presenta una participación activa en la embriogénesis, detectándose su expresión en células apicales desde las primeras fases del desarrollo del embrión (Laux *et al.*, 1996; Mayer *et al.*, 1998). La expresión ectópica de *WUS* en tejido diferenciado promueve la formación de embriones somáticos, lo que parece indicar

que la expresión de *WUS* es suficiente para inducir la transición de células somáticas a células embriogénicas (Zuo *et al.*, 2002; Gallois *et al.*, 2004). Sin embargo, las plantas que sobreexpresan *WUS* no parecen afectar la expresión del gen *SERK1*, *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE* (Zuo *et al.*, 2002). Este último codifica una proteína receptora con repeticiones ricas en leucina tipo cinasa, cuya expresión parece marcar la transición de un estado vegetativo a uno embriogénico en cultivos de zanahoria, detectándose su expresión en la embriogénesis temprana (Schmidt *et al.*, 1997). En el caso de *Arabidopsis*, la sobreexpresión de *AtSERK* en cultivos *in vitro* incrementa la eficiencia de iniciación de células embriogénicas en presencia de auxina (Hecht *et al.*, 2001).

Actualmente, además de *WUS* y *SERK*, se han aislado otros genes necesarios durante la embriogénesis y que promueven el potencial embriogénico. La expresión ectópica de *BABY BOOM* (*BBM*) (Boutillier *et al.*, 2002) y de *LEAFY COTYLEDON 1* y *2* (*LEC*) (Lotan *et al.*, 1998; Stone *et al.*, 2001) resultan en la formación de embriones somáticos en tejido diferenciado (plantas) sin la aplicación de hormonas externas. El gen *BABY BOOM* codifica para un factor de transcripción de la familia *AP2/ERF*, cuya expresión se detecta en microsporas, durante los estadios temprano y tardío del desarrollo del embrión (Boutillier *et al.*, 2002). Por otro lado el gen *LEC1* controla diversos aspectos de la embriogénesis tanto en la identidad del embrión como en la maduración de la semilla. Otros dos genes, *LEC2* y *FUSCA* (*FUS3*), pertenecientes a la familia *LEC*, además de que parecen compartir funciones similares a *LEC1* durante la embriogénesis, también son regulados por *PICKLE* (Lotan *et al.*, 1998). El factor *PICKLE* (*PKL*), un remodelador de cromatina, regula negativamente los genes *LEC*, cuya pérdida

de función en mutantes *pkl* falla en el cambio de transición del estado embriogénico al estado vegetativo durante el desarrollo, promoviendo la expresión de los genes *LEC* (*FUS3*, *LEC1* y *2*) sin alterar los niveles de expresión de *SERK1*, *WUS* y *AGL15* (Ogas *et al.*, 1999; Rider *et al.*, 2003).

El factor de transcripción *AGL15* (MADS-box) es expresado durante la embriogénesis temprana, y su expresión ectópica resulta en un incremento de la competencia embriogénica, promoviendo la expresión de *SERK1* (Harding *et al.*, 2003). Otro gen que promueve la competencia embriogénica al sobreexpresarse en cultivos de abeto es *HBK3*, un gen homeótico de la familia *KNOX* clase 1, que codifica un factor de transcripción que tiene un papel crucial en el mantenimiento e identidad del meristemo apical en el embrión somático (Hjortswang *et al.*, 2002; Belmonte *et al.*, 2007).

La adquisición del potencial embriogénico es dependiente de una gama de factores regulatorios provenientes de numerosas vías relacionadas y/o independientes, cuyo trabajo cooperativo bajo ciertas circunstancias podría incrementar el potencial embriogénico e inclusive promover la transición de un estado vegetativo a uno embriogénico.

### 2.3.5 Genes KNOX durante el desarrollo de embriones

Durante el desarrollo de embriones somáticos, la formación de los meristemos apical y radicular es vital para que los embriones logren la germinación y conversión. Estudios moleculares en diferentes especies han identificado la participación de una familia de genes "*knotted1-like homeobox-containing*" o genes *KNOX* que están implicados en la formación y mantenimiento del meristemo en plantas. Los genes *KNOX* están divididos de acuerdo a las similitudes en los residuos del homeodominio, la posición del intrón y su patrón de expresión. Estos genes codifican un factor de transcripción que modula eventos de desarrollo (Hake *et al.*, 2004).

Los genes *KNOX* de clase 1 se expresan en el meristemo apical del brote, mientras que los genes *KNOX* de clase II no tienen una expresión específica. En *Arabidopsis*, se ha identificado el gen *SHOOT MERISTEMLESS (STM)* perteneciente a la familia *KNOX* de clase I. La expresión de este gen durante la embriogénesis se detectó primero en una célula apical de embriones globulares así como en un grupo de células apicales de embriones maduros (Aida *et al.*, 1999; Long & Barton 1998).

La generación de semillas mutantes (pérdida de función del gen *stm*) resultó en la formación de cotiledones fusionados del embrión, indicando que este gen es necesario para la formación del meristemo apical (Long *et al.*, 1996). Por otro lado, en un estudio más reciente en *Elaeis guineensis* perteneciente a la familia *Araceae*, se aisló al gen *EgKNOX* ortólogo de *AtSTM*, que conserva su participación en la formación del meristemo apical de esta especie (Jouannic *et al.*, 2007). La familia de genes *KNOX* participa durante la

formación de embriones; sin embargo, no existen antecedentes de la participación de los genes *KNOX* durante la germinación.

Estudios realizados en plantas de tabaco indican que los genes *KNOX* tienen una interacción antagónica con giberelinas y una interacción directa con las citocininas. Esta relación se observó en plantas transformadas que al sobreexpresar genes *KNOX* presentan un desequilibrio hormonal de citocininas y giberelinas. En estas plantas se observaron incrementos en las concentraciones de citocininas y por otro lado una reducción en los niveles de la giberelinas, causando una disminución de la senescencia (Barley & Waites, 2002; Hake *et al.* 2004).

En la embriogénesis somática de cocotero se presenta la formación de embriones aberrantes (fusión de embriones somáticos y carencia de meristemo, entre otros) que no desarrollan el meristemo apical y al final pierden su conformación, lo que podría estar relacionado con la baja germinación en este sistema (Sáenz *et al.*, 2006). Para entender este efecto es indispensable conocer mejor el proceso de formación de ES. En este aspecto, el entendimiento de la embriogénesis a nivel molecular, bioquímico y fisiológico durante el desarrollo y germinación del embrión somático podría ayudar a la optimización del protocolo.

En cocotero (perteneciente a la familia *Arecaceae*) se han aislado e identificado dos secuencias de ADNc cuya traducción a aminoácidos muestra dominios conservados propios de la familia *KNOX*; estos genes podrían estar relacionados con el desarrollo del meristemo apical, estructura fundamental para la germinación y la conversión del embrión, por lo que el objetivo de este trabajo es estudiar la expresión de los genes *KNOXs* de cocotero (denominados *CnKNOX*)

durante el desarrollo de embriones somáticos (en presencia y ausencia de AG<sub>3</sub>) y durante la germinación de embriones cigóticos de cocotero (en presencia y ausencia de AG<sub>3</sub>). Los resultados del segundo punto podrían servir como marco de referencia para la germinación de ES, debido a que en estos momentos es complicado el estudio de la germinación de ES por la asincronía del sistema.

## **2.4 Germinación de embriones**

Los embriones somáticos son originados vía asexual y durante su desarrollo pasan a través de las mismas secuencias de maduración que su contraparte cigótica. Sin embargo, en la germinación (desarrollo de meristemo de tallo y raíz) de embriones somáticos, se carece de una fase de deshidratación y del estado quiescente del embrión, presentando un desarrollo continuo como ocurre en semillas vivíparas y recalcitrantes (Farnsworth, 2000; Rochon *et al.*, 1998). La realización de estudios básicos (moleculares, bioquímicos, fisiológicos) durante la germinación de semillas vivíparas (*Cocos nucifera*) podría contribuir en un futuro al entendimiento y mejoramiento del proceso de germinación en embriones somáticos.

En la naturaleza existen semillas ortodoxas, vivíparas y recalcitrantes, las dos últimas carecen de una fase de deshidratación y no pasan por un estado quiescente, ya que después de finalizar la maduración, la semilla continúa con la germinación del embrión (Farnsworth, 2000). En el caso de semillas ortodoxas estas pasan por la fase de deshidratación que lleva a un estado quiescente. Después de superar el periodo de latencia, cuando las condiciones ambientales son las adecuadas, se inicia la captación de agua y la activación del metabolismo, en el que predominan procesos que promueven

la formación de enzimas para el desdoblamiento, la movilización de reservas hacia el eje embrionario, iniciación de los procesos de reparación y activación del ciclo celular, mientras que los eventos asociados con la maduración son suprimidos (Bradford *et al.*, 2000).

En el sistema de embriogénesis somática de cocotero se presenta una baja respuesta de germinación (germinación en embriones somáticos se refiere al desarrollo del brote y raíz), que se atribuye al alto número de embriones aberrantes y otros embriones que no llegan a un estadio de madurez, perdiendo su conformación (Sáenz *et al.*, 2006). Estos aspectos pueden estudiarse durante el desarrollo de los embriones; sin embargo, es difícil estudiar de forma separada el desarrollo y la germinación de embriones somáticos, debido a que ambos procesos se presentan de forma asincrónica en un mismo callo. Por lo que el estudio de la germinación *in vitro* de embriones cigóticos de cocotero (semillas vivíparas; carecen de una fase de dormancia) podría emplearse como marco de referencia para entender el proceso de germinación de embriones somáticos, al presentar un alto grado de similitud con embriones cigóticos.

#### **2.4.1 Activación del ciclo celular en la germinación**

En diferentes especies se ha identificado que uno de los eventos tempranos de la germinación en semillas que presentan quiescencia (semillas ortodoxas), es la activación del ciclo celular. Por el momento no se ha logrado discernir si esta activación es requerida para el avance de la germinación, pero es un suceso común en las especies que hasta el momento han sido estudiadas, lo que sugiere, que este evento es relevante durante la germinación (Sánchez *et al.*, 2005).

Estudios realizados durante la fase tardía de maduración tanto en semillas ortodoxas como en semillas que no presentan quiescencia (semillas vivíparas), tienen un arresto de la fase G1 del ciclo celular, lo que podría indicar que el control del ciclo celular en esta fase puede tener gran importancia para la maduración/germinación del embrión (Bino *et al.*, 1993). En el caso de embriones somáticos que presentan un desarrollo continuo (como semilla vivíparas) se ha observado que durante la maduración, declina la expresión de genes que intervienen en la proliferación celular (proteínas nucleares, PCNA “proliferating cell nuclear antigen”, e histonas) y crecimiento, mientras que en la germinación se recupera la expresión de estos genes (Che *et al.*, 2006). Estas observaciones parecen indicar que durante la fase de maduración tardía de embriones somáticos, así como de semillas ortodoxas se detiene y/o reduce la proliferación celular, mientras que en la germinación se promueve.

Estudios básicos del control del ciclo celular durante la germinación de semillas vivíparas (como cocotero) podrían tomarse como marco de referencia para entender la germinación de embriones somáticos y en un futuro mejorar el proceso. Debido a que en estos momentos es difícil evaluar la germinación de embriones somáticos por la asincronía del cultivo, se realizó el estudio de expresión de genes (*CnE2F1*, *CnE2F2* y *CnCDKA*) que intervienen en la progresión de fases G1/S del ciclo celular durante la germinación de embriones cigóticos (EC) en ausencia y presencia de AG<sub>3</sub> (condición que favorece y acelera la germinación EC), resultados que podrían servir como marco de referencia para la germinación de ES.

#### **2.4.2 Genes que promueven el alargamiento y diferenciación celular durante la germinación.**

Para investigar los mecanismos de la germinación de semillas *sensu stricto* es esencial caracterizar la expresión de genes involucrados antes de la protusión de la radícula, que es el primer signo visible del éxito de la germinación. Los genes asociados con el alargamiento y diferenciación celular son buenos candidatos durante la germinación (Bradford *et al.*, 2000). La elongación del embrión es un factor que contribuye a la ruptura de la testa. Después de activar el metabolismo basal, iniciada la germinación se requieren dos procesos: la turgencia celular del eje del embrión y la pérdida de la pared celular (Obroucheva & Antipova, 1997, 1999; Obroucheva, 1999).

En general la entrada de agua en células elongadas es facilitada por canales de agua. La elongación de células se caracteriza por la expresión activa de acuaporinas, que forman canales de agua tanto en el plasmalema como en el tonoplasto (Fricke & Chaumont, 2006). Otro mecanismo relacionado con el crecimiento celular es la acidificación de la pared celular, incrementada por el flujo de protones del citoplasma durante la elongación (Shanko *et al.*, 2003). Por lo que es necesaria la expresión de genes que codifican bombas de protones (NpPMA5), y cuya activación es requerida para la elongación celular (Evans, 1984; Antipova *et al.*, 2003; Obroucheva & Antipova, 2004; Lefebvre *et al.*, 2005). La flexibilidad de la pared celular es un factor importante para la elongación celular, que depende de la composición y estructura de los componentes principales, la fuerza de unión entre ellos, así como la acidificación del medio por el bombeo de protones a través de la membrana plasmática. La acidificación resultante de la pared celular induce la hidrólisis de los puentes de hidrógeno entre

polímeros que dan consistencia a la pared celular, permitiendo flexibilidad entre los componentes para el alargamiento celular y así ceder a la presión de turgencia de la célula (Raven *et al.*, 1992).

En el proceso de germinación se promueve la expresión de genes que codifican proteínas llamadas expansinas, encargadas de romper puentes de hidrógeno entre polímeros (celulosa y hemicelulosa) incrementando la extensibilidad de la pared celular (Chen & Bradford, 2000; Ogawa *et al.*, 2003). También se incrementa la expresión de otras hidrolasas que contribuyen al rompimiento de puentes de hidrógeno entre diversos polímeros presentes en la pared celular (Nonogaki *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2001). Durante el proceso también se incrementa la expresión de genes que codifican para pectinas. Estas proteínas conforman una red que penetra en toda la pared celular regulando la movilidad de la celulosa y hemicelulosa, para formar una fase de gel (Wen *et al.*, 1999).

En la germinación, además de participar genes que contribuyen a la expansión celular, también es requerida la expresión de genes como *PICKLE*, que reprimen la identidad embriogénica durante la germinación, inhibiendo la expresión de genes que promueven el potencial embriogénico (*LEC1* y *LEC2*) y promueve la expresión de hidrolasas (glucanasas) (Rider *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2005). Por todo lo anterior se sugiere que durante la germinación es importante la expresión de genes que promueven el alargamiento celular y genes que reprimen el potencial embriogénico.



## **2.5 Hipótesis**

Las fitohormonas ácido giberélico y bencil adenina suministradas exógenamente a cultivos *in vitro* de cocotero, favorecerán la formación de embriones somáticos y su germinación, afectando la expresión de genes que intervienen en la regulación del ciclo celular y el desarrollo del meristemo apical del embrión.



## **2.6 Objetivo general**

Evaluar el efecto de las fitohormonas ácido giberélico y bencil adenina suministradas exógenamente a cultivos *in vitro* de cocotero, en la formación de embriones somáticos y su germinación; así como en la expresión de genes que intervienen en la regulación del ciclo celular y el desarrollo del meristemo apical del embrión.

### **2.6.1 Objetivos particulares**

Estudiar el efecto de las fitohormonas ácido giberélico y benciladenina, suministradas exógenamente a cultivos *in vitro* de cocotero, en la formación y germinación de embriones somáticos

Determinar si los genes *CnE2F1*, *CnE2F2*, *CnCDKA*, *CnKNOX1* y *CnKNOX2* se expresan durante la formación y la germinación de embriones somáticos en cultivos *in vitro* de cocotero; y si esta expresión puede ser influida por la adición de ácido giberélico.

Determinar si los genes *CnE2F1*, *CnE2F2*, *CnCDKA*, *CnKNOX1* y *CnKNOX2* se expresan durante la germinación de embriones cigóticos de cocotero, y si esta expresión puede ser influida por la adición de ácido giberélico.

## 2.7 Bibliografía

- Aida M, Ishida T, Tasaka M (1999). Shoot apical meristem and cotyledon formation during Arabidopsis embryogenesis: interaction among the *CUP-SHAPED COTYLEDON* and *SHOOT MERISTEMLESS* genes. *Dev.* 126:1563-1570.
- Antipova OV, Bartova LM, Kalashnikova TS, Obroucheva NV, Voblikova VD, Muromtsev GS (2003). Fusicoccin-induced cell elongation and endogenous fusicoccin-like ligands in germinating seed. *Plant Physiol. Biochem.* 41:157-164.
- Apavatjirut P, Blake J (1977). Tissue culture of stem explants of coconut (*Cocos nucifera* L.). *DOI.* 32:267-271.
- Ashmore SE (1997). Status Report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetic resources International Plants Genetic Resources, Rome, Italy, p. 13.
- Aydin Y, Talas-Ogras T, Ipekci-Altas Z, Gözükirmizi N (2006). Effect of brassinoesteroid on cotton regeneration via somatic embryogenesis. *Biol.* 61:289-293.
- Azpeitia A, Chan JL, Saéñz L, Oropeza C (2003). Effect of 22(S), 23(S)- homobrassinolide on somatic embriogénesis in plumule explants of *Cocos nucifera* (L.) cultured *in vitro*. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 78:591-596.
- Azpeitia A (2003). Estudio de diferentes estrategias para promover la embriogénesis somática en cocotero a partir de plúmula. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatan, México 130 p.

- Barley R, Waites R (2002). Plant meristem: The interplay of KNOX and Gibberellins. *Current Biol.* 12: R696-R698.
- Batugal PA (1999). Current status of the coconut industry. In *Current advances in coconut biotechnology*. Oropeza C, Verdeil JL, Asbrner R, Cardeña R and Santamaría JM (eds). Kluwer Academia Publishers Netherlands p. 22.
- Belmonte MF, Tahir M, Schroeder D, Stasolla C (2007). Overexpression of HBK3, a class I KNOX homeobox gene, improves the development of Norway spruce (*Picea abies*) somatic embryos. *J. Exp. Bot.* Doi:10.1093/jxb/erm099.
- Bino RJ, Lanteri S, Verhoeven HA, Kraak HL (1993). Flow cytometric determination of nuclear replication stages in seed tissues. *Ann. Bot.* 72:181-187.
- Blake J, Eeuwens CJ (1982). Culture of coconut palm tissues with view to vegetative propagation. En: *Tissue culture for economically important plants. Proceedins of the International Symposium Costed, ANBS. Singapore, pp 145-148.*
- Boutilier K, Offringa R, Sharma VK, Kieft H, Cuellet T, Zhang L, Hattori J, Liu C-M, van Lammeren AAM, Miki BLA, Custers JBM, van Lookeren Campagne MM (2002). Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic Growth. *The Plant Cell* 14: 1737-1749.
- Bradford KJ, Chan F, Cooley MB, Dahal P, Downie B, Fukunaga KK, Gee OH, Gurusinghe S, Mella RA, Nonogaki H, Wu CT, Yang H, Yim KO (2000). Gene expression prior to radicle emergence in imbibed tomato seeds. In *Seed Biology Advances and applications*. Black M, Bradford KJ, Vázquez-Ramos (eds). J. CABI Publishing. New York. 231-251.

- Bradley WL, Poel J, Huang H (2006). *Cocos nucifera*: An Abundant Renewable source of Energy. Proceedings of the International Conference on Renewable Energy for Developing Countries. Disponible via DIALOG. <http://cere.udc.edu/Cocos%20Nucifera-paper.pdf>. Accesado en Septiembre del 2008.
- Branton RL, Blake J (1983). Development of organized structures in callus derived from explants of *Cocos nucifera* L. *Ann. Bot.* 52:673-678.
- Branton RL, Blake J (1984). Clonal propagation of coconut palm, Proceedings of the International Conference on Cocoa and Coconuts. Kuala Lumpur pp1-8.
- Buffard-Morel J, Verdeil JL, Pannetier C (1988). Vegetative propagation of coconut palm (*Cocos nucifera* L.) through somatic embryogenesis. En: G Durand, L. Bobichon y J. Florent (eds). Proceedings of the 8th International Biotechnology Symposium, Paris. Société Française de Microbiologie, Paris, Abs. pp 177.
- Buffard-Morel J, Verdeil JL, Pannetier C (1992). Embryogénese somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.) á partir de tissus foliaires étude histologique. *Can. J. Bot.* 70:735-741.
- Chan JL, Saéñz L, Talavera C, Hornung R, Robert M and Oropeza C (1998). Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explant through somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.* 17: 515-521.
- Che P, Love TM, Frame BR, Wang K, Carriquiry AL, Howell SH (2006). Gene expression patterns during somatic embryo development and germination in maize Hi II callus cultures. *Plant Mol. Biol.* 62:1-14.
- Chen F, Bradford KJ (2000). Expression of an expansin is associated with endosperm weakening during tomato

- seed germination. *Plant Physiol.* 124:1265-1274.
- Chen F, Nonogaki H, Bradford KJ (2002). A gibberellin-regulated xyloglucan, endotransglycosylase gene is expressed in the endosperm cap during tomato seed germination. *J. Exp. Bot.* 53:215-223.
  - Chugh A, Khurana P (2002) Gene expression during somatic embryogenesis—recent advances. *Curr. Sci.* 86:715–730.
  - Clouse SD, Sasse JM (1998). Brassinosteroids: Essential regulators of plant growth and development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:427-51.
  - Consejo Nacional del Cocotero (CONACOCO) (2008). Disponible en DIALOG. [www.conacoco.com.mx](http://www.conacoco.com.mx). Accesado en Agosto 2008.
  - De Guzmán EV, del Rosario AG, Ubalde EM (1978). Proliferative growths and organogenesis in coconut embryo and tissue cultures. *The Philipp. J. Coconut Stud.* 3:1-10.
  - Den Boer BGW, Murray JAH (2000). Control of plant growth and development through manipulation of cell cycle genes. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11:138-145.
  - Dominguez EC, López JIA, Castillo RAG, Ruíz PB (1999). El cocotero (*Cocos nucifera* L.) Manual para la producción en México. INIFAP-CIARGC-CEHUI. Tabasco, México p. 132-133.
  - Eeuwens CJ (1976). Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and date (*Phoenix dactylifera*) palm cultured in vitro. *Physiol Plant.* 42:173-178.
  - Evans ML (1984). Functions of hormones at the cellular level of organization. In Scott TK (ed). *Encyclopedia of Plant Physiology* Vol. 10. Berlin Springer-Verlag 23-79.

- FAOSTAT AGRICULTURE DATA 2006  
<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567>
- Farnsworth E (2000). The ecology and physiology of viviparous and recalcitrant seeds. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 31:107-138.
- Fehér A, Pasternak TP, Dudits D (2003). Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 74:201-228.
- Final Report (1998). Coconut: Development of methods for the clonal propagation of elite, disease resistant palms by somatic embryogenesis. Period under review: January 1995-June 1998. Section CICY.
- Francis D, Sorrell DA (2001). The interface between the cell cycle and plant growth regulator: a mini review. *Plant Growth Regul.* 33:1-12.
- Fricke W, Chaumont F (2006). Solute and Water Relations in Growing Plant Cell, *The Expanding Cell*, Berlin: Springer, pp.7-31.
- Fukuda H, Konamine AI (1985). Cytodifferentiation. In *Cell Growth, Nutrition, Cytodifferentiation, and Cryopreservation: Cell Culture and somatic Cell Genetics of Plants*, In: Vasil IK (ed), Vol. 2, pp.149-212. Academic Press, New York-London-Tokyo.
- Fulford RM, Passey AJ, Justin HGW (1981). Coconut propagation *in vitro*. Reports of the East Malling Research Station pp 1-12.
- Gaj MD (2004). Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Reg.* 43:27-47.
- Gallois JL, Nora FR, Mizukami Y, Sablowski R (2004). WUSCHEL induces shoot stem cell activity and

- developmental plasticity in the root meristem. *Genes Dev.* 18:375-380.
- Gupta PK, Kendurka SV, Kuikarni VM, Shir Gukka MV, Mascarenhas AF (1984). Somatic embryogenesis and plants from zygotic embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.) *in vitro*. *Plant Cell Rep.* 3:220-225.
  - Gutierrez C (2005). Coupling cell proliferation and development in plants. *Nat. Cell Biol.* 7:535-541.
  - Gutierrez C, Ramirez Parra E, Castellano MM, del Pozo JC (2002). G<sub>1</sub> to S transition: more than a cell cycle engine switch. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5:480-486.
  - Hake S, Smith HMS, Holtan H, Magnani E, Mele G, Ramirez J (2004). The role of *KNOX* genes in plant development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20:125-151.
  - Harding EW, Tang W, Nichols KW, Fernandez DE, Perry SE (2003). Expression and maintenance of embryogenic potential is enhanced through constitutive expression of *AGAMOUS*-like 15. *Plant Physiol.* 133:653-663.
  - Hartmann HT, Kester DE, Davies FT, Geneve RL (1997). *Plant propagation principles and practices*, sixth edition. New Jersey: Prentice Hall, pp 125-146.
  - Hecht V, Vielle-Calzada J-P, Hartong MV, Schmidt EDL, Boutilier K, Grossniklaus U, de Vries SC (2001). The *Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1* Gene is expressed in developing ovules and embryos and enhancer embryogenic competence in culture. *Plant Physiol.* 127:803-816.
  - Hita O, Lafarga C, Guerra H (1997). Somatic embryogenesis from chickpea (*Cicer arietium* L.) immature cotyledons: The effect of zeatin, gibberellic acid and indole-3-butyric acid. *Acta Physiol. Plant.* 19:333-338.
  - Hjortswang HI, Larsson AS, Bharathan G, Bozhkov PV,

- von Arnold S, Vakala T (2002). KNOTTED1-like homeobox genes of a gymnosperm, Norway spruce, expressed during somatic embryogenesis. *Plant Physiol. Biochem.* 40:837-843.
- Hornung R (1995). Micropropagation of *Cocos nucifera* (L.) from plumular tissue excised from mature zygotic embryos. *Plant. Rech. Dev.* 2:38-41.
  - Hutchinson MJ, KrishnaRaj S, and Saxena PK (1997). Inhibitory effect of GA<sub>3</sub> on the development of thidiazuron-induced somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey) hypocotyl cultures. *Plant Cell Rep.* 16:435-438.
  - Jouannic S., Collin M., Vidal B., Verdeil JL, Treger W (2007). A class I *KNOX* gene from the palm species *Elaeis guineensis* (*Arecaceae*) is associated with meristem function and a distinct mode of leaf dissection. *New Phytologist* 174:551-568.
  - Karunaratne S, Gamage C, Kovoov A (1991). Leaf maturity, a critical factor in embryogenesis. *J. Plant Physiol.* 139:27-31.
  - Laux T, Mayer KFX, Berger J, Jürgens G (1996). The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Dev.* 122:87-96.
  - Lefebvre B, Arango M, Oufattole M, Crouzet J, Purnelle B, Boutry M (2005). Identification of *Nicotiana plumbaginifolia* plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase gene expressed in the pollen tube. *Plant Mol. Biol.* 58:775-787.
  - Lewin B (2001). *Genes VII*, 2<sup>nd</sup> edition. Oxford Bios Scientific Publishers.
  - Li H-C, Chuang K, Henderson JT, Rider Jr SD, Bai Y, Zhang H, Fountain M, Gerber J, Ogas J (2005). PICKLE acts during germination to repress expression of

- embryonic traits. *The Plant J.* 44:1010-1022.
- Li R, Bruneau AH, Qu R (2006). Improved plant regeneration and *in vitro* somatic embryogenesis of St Augustinegrass [*Stenotaphrum secundatum* (Walt.) Kuntze]. *Plant Breed.* 125:52-56.
  - Long JA, Barton MK (1998). The development of apical embryogenic pattern in *Arabidopsis*. *Dev.* 125:3027-35.
  - Long JA, Moan EI, Medford JI, Barton MK (1996). A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the *SHOOTMERISTEMLESS* gene of *Arabidopsis*. *Nat.* 379:66-69.
  - Lotan T, Ohto M, Yee KM, West MAL, Lo R, Kwong RW, Yamagishi K, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ (1998). *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell* 93:1195-1205.
  - Magyar Z, De Veylder L, Atanassova A, Bakó L, Inzé D, Bögre L (2005). The Role of the *Arabidopsis* E2FB Transcription Factor in regulating Auxin-Dependent Cell Division. *The Plant Cell* 17:2527-2541.
  - Mayer KFX, Schoof H, Haecker A, Lenhard M, Jürgens G, Laux T (1998). Role of *WUSCHEL* in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell* 95: 805-815.
  - McCoy RE, Howard FW, Tsai JH, Dolseman HM, Thomas DL, Basham HG, Atilano RA, Eskafi FM, Britt L, Collins MB (1983). Lethal yellowing of palms. No 8. University of Florida: Agricultural Experiment Station Bulletin. Florida, USA. 100 p.
  - Mordhorst AP, Voerman KJ, Hartong MV, Meijer EA, van Went JV, Koornneef M, de Vries SC (1998). Somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* is facilitated by mutations in genes repressing meristematic cell

- divisions. Genet. 149:549-563.
- Neumann KH (2000). Some studies on somatic embryogenesis, a tool in plant biotechnology, Proceedings of the 87<sup>th</sup> Indian Science Congress Pune, India. Disponible via DIALOG. <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2000/321/pdf/p000004.pdf>.  
Acesado en Enero 2008.
  - Nguyen T, Thanh-Tuken, de Guzmán EV (1983). Formation of pollen embryos in cultured anthers of coconut (*Cocos nucifera* L.). Plant Sci. Lett. 29:81-88.
  - Nonogaki H, Gee OH, Bradford K (2000). A germination-specific endo- $\beta$ -mannanase gene is expressed in the micropylar endosperm cap of tomato seeds. Plant Physiol. 123: 1235-1245.
  - Obroucheva NV (1999). Seed germination: A guide to the early stages, Leiden: Backhuys Publisher, p 156.
  - Obroucheva NV, Antipova OV (1997). Physiology of the initiation of seed germination. Russ. J. Plant Physiol. 44:250-264.
  - Obroucheva NV, Antipova OV (1999). Common physiological mechanisms prepare seed with different dormancy types for germination. Russ. J Plant Physiol. 46:363-368.
  - Obroucheva NV, Antipova OV (2004). Role of water supply in transition of recalcitrant seed from dormancy to germination. Russ. J Plant Physiol 51:942-951.
  - Ogas J, Kaufmann S, Henderson J, Somerville C (1999). PICKLE is a CHD3 chromatin-remodeling factor that regulates the transition from embryonic to vegetative development in *Arabidopsis*. PNAS 96:13839-13844.
  - Ogawa M, Hanada A., Yamuchi Y, Kuwahara A, Kamiya Y, Yamaguchi S (2003). Gibberellin biosintesis and

response during *Arabidopsis* seed germination. The Plant Cell 15:1591-1604.

- Pannetier C, Buffard MJ (1986). First results of somatic embryo production from leaf tissue of coconut (*Cocos nucifera* L.). Ol. 37:352-353.
- Parternak TP, Prinsen E, Ayaydin F, Miskolczi P, Potters G, Asard H, Van Onckelen HA, Dudits D, Fehér A (2002). The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. Plant Physiol. 129:1807-1819.
- Perera PIP, Hoche V, Verdeil JL, Doubeau S, Yakandawala DMD, Weerakoon LK (2006) Unfertilized ovary: a novel explant for coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryogenesis. Plant Cell Rep 26: 21-28
- Pérez-Nuñez MT, Chan JL, Sáenz L, González T, Verdeil JL and Oropeza C (2006). Improved somatic embryogenesis from *Cocos nucifera* (L.) Plumule explants. *In Vitro* Cell. Dev. Biol. 42:37-43.
- Portillo L, Santacruz-Ruvalcaba F, Gutiérrez-Mora A, Rodríguez-Garay B (2007). Somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar azul. *In Vitro* Cell Development Biology Plant 43:569-575.
- Pozo JC, Lopez-Matas MA, Ramirez-Parra E, Gutierrez C (2005). Hormonal control of the plant cell cycle. *Physiol. Plant.* 123:173-183.
- Pullman GS, Zhang Y, Phan BH (2003) Brassinolide improves embryogenic tissue initiation in conifers and rice. *Plant Cell Rep.* 22:96-104.
- Punchihewa PG (1999). Current status of the coconut industry. In Oropeza C, Verdeil JL, Asbrner R, Cardeña R and Santamaría JM (eds). *Current advances in coconut biotechnology.* Kluwer Academia Publishers Netherlands p. 7.

- Quiroz-Figueroa FR, Rojas-Herrera R, Galaz-Avalos RM, Loyola-Vargas VM (2006). Embryo production through somatic embriogénesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* 86:285-301.
- Raju CR, Kumar P, Chandramohan M, Lyer RD (1984). Coconut plantlets from leaf tissue cultures. *Plant. Crop.* 12:75-81.
- Ramirez-Parra E, Desvoyes B, Gutierrez C (2005). Balance between cell division and differentiation during plant development. *Int. J. Dev. Biol.* 49:467-477.
- Rider SD, Henderson JT, Jerome RE, Edenberg HJ, Romero-Severson J, Ogas J (2003). Coordinate repression of regulators of embryonic identity by PICKLE during germination in *Arabidopsis*. *The Plant J.* 35:33-43.
- Rochon M, Piola F, Deunff E, Mol R, Dumas C (1998). *In vitro* development of maize immature embryos: A tool for embryogenesis analysis. *J. Exp. Bot.* 49:839-845.
- Rogelio-Flores F (2006). Alternativas tecnológicas del cocotero de Asia-Pacífico, ventaja competitiva para el cocotero de México. Tesis de Doctorado. Universidad de Colima, México p 4-6, pp 254.
- Rudus I, Kepczynska E and Kepczynski J (2000). Regulation of *Mendicago sativa* L. somatic embryogenesis by gibberellins. *Plant Growth Regul.* 36:01-95.
- Saéñz L, Azpeitia A, Chuc-Armendariz B, Chan JL, Verdeil JL, Hocher V, Oropeza C (2006). Morphological and histological changes during somatic embryo formation from coconut plumule explant. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 42:19-25.
- Saéñz L, Chan JL, Souza R, Hornung R, Rillo E, Verdeil JL, Oropeza C (1999). Somatic embryogenesis and

regeneration in coconut from plumular explants. In: Current Advances in Coconut Biotechnology. Oropeza C, Verdeil JL, Ashburner GR, Cardeña R, Santamaría J (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands p 309-319.

- Sánchez MP, Gurusinghe SH, Bradford KJ, Vázquez-Ramos JM (2005). Differential response of PCNA and Cdk-A proteins and associated kinase activities to benzyladenine and abscisic acid during maize seed germination. *J. Exp. Bot.* 56: 515-523.
- Sandoval A, Hocher V, Verdeil J-L (2003). Flow cytometric analysis of the cell cycle in different coconut palm (*Cocos nucifera* L.) tissue cultured *in vitro*. *Plant Cell Rep.* 22:25-31.
- SARH. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. 1997. Programa Agropecuario y de Desarrollo Rural 1995-2000, México.
- Schmidt DL, Guzzo F, Toonen MAJ, Vries SC (1997). A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase mark somatic plant cell competent to form embryos. *Dev.* 124:2049-2062.
- Shanko AV, Mesenko MM, Klychnikov OI, Nosov AV, Ivanov VB (2003). Proton Pumping in Growing Part of maize root: Its correlation with 14-3-3 Protein content and changes in response to osmotic stress, *Biochemistry (Moscow)* 68:1320-1326.
- Stone SL, Kwong LW, Yee MK, Pelletier J, Lepiniec L, Fischer RL, Golberg RB, Harada JJ (2001). LEAFY COTYLEDON2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *PNAS* 98:11806-11811.
- Tisserat B (1980). Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) *in vitro*. *J. Exp. Bot.* 30:1275-1283.

- Veisseire P, Linossier L and Coudret A (1994). Effect of abscisic acid and cytokinins on the development of somatic in *Hevea brasiliensis*. *Plant Cell, Tiss. Organ Cult.* 39:219-223.
- Verdeil JL, Huet C, Grosdemange F, Buffard-Morel J (1994). Plant regeneration from cultured immature inflorescences of coconut (*Cocos nucifera* L.): evidence for somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.* 13:218-221.
- von Arnold S, Sabala I, Bozhkov P, Dyachok J, Filova L (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tiss. Organ Cult.* 69:233-249.
- Wen F, Zhu Y, Hawes MC (1999). Effect of pectin methylesterase gene expresión on pea root development. *The Plant Cell* 11:1129-1140.
- Wolpert L, Beddington R, Brockes J, Jessel T, Lawrence P, Meyerowitz E (1998). *Principles of Development.* Oxford University Press, pp 203-213.
- Wu CT, Leubner-Metzger G, Meins F Jr, Bradford KJ (2001). Class I  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase are expressed in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radicle emergence. *Plant Physiol.* 126:1299-1313.
- Zimmerman JL (1993). Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *The Plant Cell* 5:1411-1423.
- Zizumbo D, Fernandez M, Torres N, Cardeña R (1999). Lethal yellowing resistance in coconut germplasm from México. In: *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture.* Oropeza C, Verdeil JL, Asburner R, Cardeña R, Santamaría JM (eds). Kluwer Academic Publishers Netherlands p 131-143.
- Zizumbo-Villarreal D (1997). El cocotero en México Historia, variación morfofisiológica y diversidad genética.

Tesis de Doctorado. Instituto de Ecología UNAM.

- Zuo J, Niu Q-W, Frugis G, Chua N-H (2002). The *WUSCHEL* gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*. *The Plant J.* 30:349-359.



## CAPÍTULO 3

### 3.1. Efecto del ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) en la formación y germinación de embriones somáticos de cocotero

El cocotero es uno de los cultivos más importantes en áreas tropicales, lamentablemente en los últimos años la superficie cultivada con esta especie ha disminuido debido a enfermedades letales, senescencia, entre otros factores, requiriéndose una pronta replantación (Batugal *et al.*, 1998). El desarrollo de estos programas de replantación requiere de técnicas eficientes de multiplicación vegetal y en el caso de cocotero, la velocidad de multiplicación de la palma es particularmente lenta y el tamaño de la semilla es un factor limitante para su propagación (Ashmore, 1997). Una alternativa es la micropropagación *in vitro*, una técnica de propagación vegetativa que ofrece la obtención de plantas de un genotipo deseado en un periodo más corto comparado con la propagación tradicional (Arnol *et al.*, 2002).

En este aspecto, se han desarrollado protocolos de regeneración empleando diferentes tejidos como explantes (ver antecedentes). En el Centro de Investigación Científica de Yucatán se desarrolló el protocolo de embriogénesis somática primaria (explante inicial plúmula), que inicialmente presentó una baja generación de embriones somáticos por plúmula (Chan *et al.*, 1998), lo que llevó a la búsqueda y desarrollo de nuevas estrategias que aumentaran la eficiencia del protocolo.

El empleo de reguladores de crecimiento como brasinoesteroides y la combinación de ABA/PEG incrementó la

generación de embriones somáticos por plúmula, pero su eficiencia era aún baja (Azpeitia, 2003). Posteriormente, se desarrolló un protocolo con base a ciclos sucesivos de embriogénesis somática secundaria y multiplicación de callo, que en forma combinada, pueden aumentar radicalmente el número de embriones somáticos hasta con 98,000 ES por plúmula (Pérez-Nuñez *et al.*, 2006). Sin embargo, la eficiencia de formación de callo embriogénico, el número de ES/CE, la germinación y la conversión de los embriones somáticos es baja por cada ciclo de cultivo (entiéndase por ciclo, la formación de CE a partir de un explante inicial, para la generación de ES y su conversión). Una alternativa para incrementar la formación de ES, podría ser mediante la adición de AG<sub>3</sub> al medio de cultivo, lo que en algunas especies favorece la embriogénesis somática.

La aplicación externa de ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) puede estimular la embriogénesis somática en algunas especies como *Cicer arietium* L. (cultivo de cotiledones inmaduros) y *Hardwickia binata* Roxb (Hita *et al.*, 1997; Das *et al.*, 1995), y se ha reportado que la adición de inhibidores de la biosíntesis de AGs (giberelinas) inhibe la producción de embriones somáticos (Hita *et al.*, 1997; Hutchinson *et al.*, 1997; Rudus *et al.*, 2002). En el caso de *Medicago sativa*, la adición de GAs promueve tanto la formación como la diferenciación de embriones somáticos a partir de callos (Rudús *et al.*, 2002).

En el caso de cocotero, durante la embriogénesis somática primaria (explante inicial plúmula), empleando como material vegetal Enano Malayo, se realizó un estudio preliminar en el que se adicionó ácido giberélico durante la formación de ES y se observó un aumento de los porcentajes de CE con ES germinados, pero no se profundizó en el estudio y no se

determinó el efecto de AG<sub>3</sub> en la formación de ES. Por otro lado, se desconoce si la adición de ácido giberélico en callos embriogénicos generados a partir del protocolo de multiplicación (explante inicial centros meristemáticos de CE) pudiera favorecer la formación de ES y su germinación empleando material vegetal de la variedad Alto del Pacífico. Por lo que en este trabajo se estudió el efecto de AG<sub>3</sub> en la formación de ES y su posterior germinación durante la embriogénesis somática de cocotero a partir del protocolo de multiplicación empleando como material vegetal Alto del Pacífico.

## **3.2. Materiales y métodos**

### **3.2.1. Material vegetal y condiciones de cultivo**

Se colectaron semillas de palmas de la variedad Alto del Pacífico de 9-12 meses después de su fecundación, posteriormente se realizó la extracción y desinfección de los embriones cigóticos; la obtención y siembra de plúmulas se realizó con base en lo reportado por Chan *et al.* (1998). Las condiciones de cultivo durante la embriogénesis somática consisten de dos etapas; la etapa I involucra la fase de formación de callo embriogénico, en la que se emplea el medio de cultivo Y3 de acuerdo a Eeuwens (1976), adicionado con sacarosa (50 g l<sup>-1</sup>), gelrite (3 g l<sup>-1</sup>), carbón activado (2.5 g l<sup>-1</sup>) y 600 μM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Todos los explantes fueron cultivados en frasco de vidrio con capacidad de 35 ml conteniendo 10 ml de medio de cultivo y en condiciones I, que consiste en un periodo de oscuridad durante tres meses a 27 ± 2 °C.

La etapa II comprende la formación de embriones somáticos, en esta etapa se emplea el medio de cultivo II (medio Y3), con sacarosa (50 g l<sup>-1</sup>), gelrite (3 g l<sup>-1</sup>), carbón activado (2.5 g l<sup>-1</sup>), 6 μM de 2,4-D y 300 μM de 6-bencilaminopurina (6-BAP). Todos los callos embriogénicos fueron cultivados en frascos de capacidad de 100 ml, conteniendo 30 ml de medio de cultivo, en condiciones II en fotoperiodo de 16 h de iluminación (45-60 μ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> ppfd)/ 8 h de oscuridad a 27 ± 2 °C y con subcultivos cada dos meses.

### **3.2.2. Embriogénesis somática primaria (ESP)**

Se realizó la inducción de la embriogénesis somática primaria (ESP) a partir de explantes de plúmula en medio de fase I y condición I durante tres meses, posteriormente los callos embriogénicos fueron transferidos al medio II y condición II para inducir la formación de embriones somáticos primarios.

### **3.2.3. Multiplicación de callo embriogénico (MCE)**

Los callos embriogénicos generados después de 3 meses en medio I en la condición I durante la ESP, se multiplicaron mediante el aislamiento de estructuras embriogénicas. Estas estructuras embriogénicas aisladas fueron transferidas nuevamente al medio I y condición I para inducir la formación de nuevo CE.

### **3.2.4. Experimentos con giberelina**

En la segunda etapa se probaron diferentes concentraciones de ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) para evaluar su

efecto en la formación y germinación de embriones somáticos. Las concentraciones de ácido giberélico que se analizaron fueron 0, 0.5, 5 y 20  $\mu\text{M}$ . Para este experimento, la giberelina se esterilizó por filtración (filtro millipore 0.22  $\mu\text{M}$ ) y se agregó al medio de cultivo estéril antes de solidificar. Se emplearon 30 callos embriogénicos por tratamiento (120 callos embriogénicos en total).

**Porcentaje de callos embriogénicos con embriones somáticos:** Por medio de observación con ayuda del estereoscopio y bajo condiciones esteriles se detectó y contabilizó cada 30 días los 120 callos embriogénicos (totales) que formaron ES; los ES fueron identificados por su morfología. La cantidad de CE que presentó embriones somáticos se dividió entre el número de  $\text{CE}_{\text{TOTAL}}$  (se consideró tanto el callo embriogénico que generó ES como el que no formó ES) y se expresó en por ciento de CE con ES.

**Número de embriones somáticos por callo embriogénico que respondió:** Se contabilizó cada 30 días la generación de embriones somáticos en los callos embriogénicos bajo condiciones de esterilidad y con ayuda de un estereoscopio. El número de embriones formados se dividió entre el número de callos embriogénicos que formaron ES, excluyéndose los callos embriogénicos que no generaron ES.

**Porcentaje de callo embriogénico con embriones somáticos germinados:** Se evaluó cada 30 días el número de CE que presentaban ES germinados (bajo condiciones estériles y con el estereoscopio). La cantidad de CE que formó ES germinados se dividió entre el número de  $\text{CE}_{\text{TOTAL}}$  (se consideró tanto el callo embriogénico que generó ES como el que no formó ES) y se expresó en por ciento de CE con ES

germinados.

**Número de embriones somáticos germinados por callo embriogénico que respondió:** Se realizó el conteo de ES germinados en los callos embriogénicos (bajo condiciones estériles y con el estereoscopio). El número de ES germinados se dividió entre el número de CE que formaron ES, excluyéndose los callos embriogénicos que no generaron ES.

### **3.2.5. Análisis estadístico**

Se realizó una estadística básica que consistió en la obtención de promedios y el error estándar en cada tratamiento, donde  $n = 3$ , cada repetición estuvo conformada por 10 CE. Los datos experimentales fueron analizados con un análisis de varianza (ANOVA). La comparación de medias, en los tratamientos se efectuó mediante la prueba de Diferencia Mínima Significativa ( $p < 0.5$ ) entre tratamientos por día. Para el cálculo se empleó el paquete SPSS, versión 11.5.

### **3.3. Resultados**

#### **3.3.1. Efecto de AG<sub>3</sub> en la formación de embriones somáticos de cocotero**

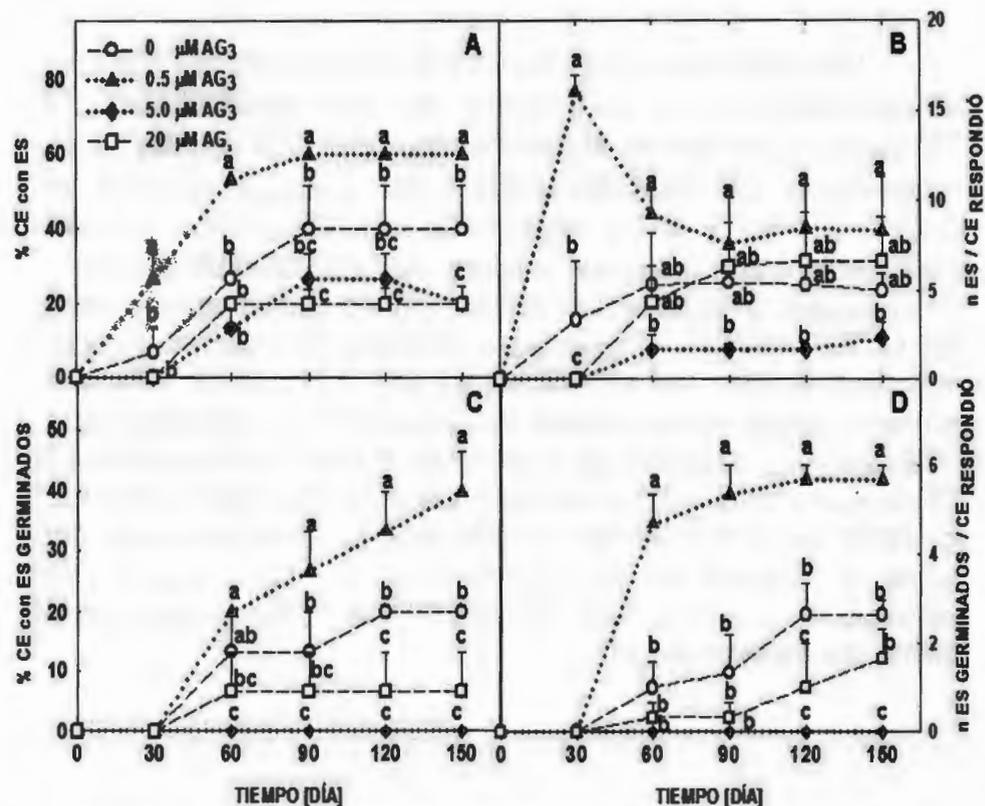
Empleando el protocolo de MCE, los callos embriogénicos generados en la etapa I (en el medio I con las condiciones I) después de 90 días de cultivo, se subcultivaron en el medio II (adicionado con AG<sub>3</sub>) bajo la condición II.

En la Figura 3.1A se puede observar que los tratamientos con 0 y 0.5  $\mu$ M presentaron CE con ES desde el día 30, mientras que los tratamientos con 5 y 20  $\mu$ M mostraron CE con ES hasta el día 60 del cultivo *in vitro*. Durante el cultivo *in vitro*, todos los tratamientos mostraron un incremento del porcentaje de CE con ES hasta el día 60, posteriormente presentaron un ligero incremento y/o se mantuvo el por ciento de CE con ES. Los tratamientos con 5 y 20  $\mu$ M de AG<sub>3</sub> fueron los que presentaron menor formación de CE con ES, generando en el día 150 de cultivo 20 % de CE con ES en ambos tratamientos. El tratamiento con 0.5  $\mu$ M de AG<sub>3</sub> fue el que presentó el mayor porcentaje de CE con ES a lo largo del cultivo, generando en el día 150 de cultivo hasta 60 % de CE con ES, mientras que en el control se obtuvo 40 % de CE con ES. Es decir, la adición de 0.5  $\mu$ M de AG<sub>3</sub> logró incrementar en el día 150 de cultivo hasta 1.5 veces más el por ciento de CE con ES respecto al control.

Al evaluar el número de embriones somáticos por callo embriogénico que respondió a la formación de ES (n ES/

CE<sub>RESPONDIÓ</sub>) hasta los 150 días de cultivo *in vitro* (Figura 3.1B), se observó que los tratamientos con 0, 0.5 y 20  $\mu$ M de AG<sub>3</sub> generaron un número de ES/CE<sub>RESPONDIÓ</sub> similar durante el cultivo *in vitro*; esto quiere decir que los callos embriogénicos que formaron ES generaron entre 5 y 10 ES en estos tratamientos; sin embargo, en la Figura 3.1A se puede observar que en presencia de 0.5  $\mu$ M de AG<sub>3</sub> se estimuló la formación de más CE con ES comparado con el control. Es decir que aunque no exista diferencia en el número de ES/ CE<sub>RESPONDIÓ</sub> en ausencia y presencia de AG<sub>3</sub> (0.5  $\mu$ M), la adición de AG<sub>3</sub> estimuló hasta 1.5 veces más % de CE con ES respecto al control (Figura 3.1A), promoviendo la formación de más ES en presencia de AG<sub>3</sub> (0.5  $\mu$ M).

En la Figura 3.1C se puede observar que durante el cultivo *in vitro*, todos los tratamientos presentaron %CE con ES GERMINADOS hasta el día 60 de cultivo *in vitro*. Durante el cultivo *in vitro*, el tratamiento con 5  $\mu$ M de AG<sub>3</sub> no presentó CE con ES GERMINADOS hasta el día 150 de cultivo y en el caso del tratamiento con 20  $\mu$ M de AG<sub>3</sub> se generó aproximadamente 7% CE con ES GERMINADOS. El mejor tratamiento fue en presencia de 0.5  $\mu$ M de AG<sub>3</sub> durante el cultivo, logrando hasta 40% CE con ES GERMINADOS en el día 150 de cultivo, es decir, fue superior en este último día de evaluación hasta 2 veces más con respecto al control (20% de CE con ES GERMINADOS). En la Figura 3.1D se muestra el número de ES germinados por CE<sub>RESPONDIÓ</sub> de los diferentes tratamientos hasta los 150 días de cultivo.



**Figura 3.1. Curso temporal del efecto de AG<sub>3</sub> en la formación y germinación de embriones somáticos de cocotero en cultivo in vitro (medio II, condición II) con material Alto del Pacífico. (A) Porcentaje de callo embriogénico con embriones somáticos (% CE con ES). (B) Número de embriones somáticos por callo embriogénico que respondió a la formación de ES (n ES / CE<sub>RESPONDÍO</sub>). (C) Porcentaje de callo embriogénico con embriones somáticos germinados (% CE con ES GERMINADOS). (D) Número de embriones somáticos germinados por callo embriogénico que respondió a la formación de ES (n ES GERMINADOS / CE<sub>RESPONDÍO</sub>). Donde n= 3, cada repetición estuvo conformada por 10 CE. Tratamientos con 0, 0.5, 5.0 y 20 μM de AG<sub>3</sub>. Los datos mostrados son las medias y las barras muestran el error estándar. Los valores con la misma letra no son estadísticamente diferentes entre tratamiento por día (p<0.05).**

Los tratamientos con 5 y 20  $\mu$  M de  $AG_3$  parecen tener un efecto negativo en el número de ES GERMINADOS /  $CE_{RESPONDIÓ}$ , ya que en el tratamiento con 5  $\mu$  M de  $AG_3$  no se presentaron ES GERMINADOS /  $CE_{RESPONDIÓ}$  durante el cultivo *in vitro* y en el tratamiento con 20  $\mu$  M de  $AG_3$  se presentaron los menores valores de ES GERMINADOS /  $CE_{RESPONDIÓ}$ , generando en el día 150 de cultivo menos de 2 ES GERMINADOS /  $CE_{RESPONDIÓ}$ . El mejor tratamiento durante el cultivo *in vitro* fue el tratamiento con 0.5  $\mu$  M de  $AG_3$  que presentó desde el día sesenta de cultivo 4.7 ES GERMINADOS /  $CE_{RESPONDIÓ}$ , y generó un máximo de 5.7 ES GERMINADOS /  $CE_{RESPONDIÓ}$  en el último día de evaluación (día 150 de cultivo). Es decir que la adición de 0.5  $\mu$  M de  $AG_3$  incrementó más del doble el número de ES GERMINADOS /  $CE_{RESPONDIÓ}$  con respecto al control (2.7 ES GERMINADOS /  $CE_{RESPONDIÓ}$ ) en el último día de evaluación.

### 3.4 Discusión

Los resultados de este estudio indican que la adición de AG<sub>3</sub> (0.5 μM) promueve tanto la formación como la germinación de los embriones somáticos en *Cocos nucifera*. Se ha reportado que la adición de AG<sub>3</sub> al medio de cultivo incrementa la formación de ES en especies como *Cicer arietinum*, *Hardwickia binata*, *Iris germanica* L., así como en *Tylophora indica* (Hita *et al.*, 1997; Das *et al.*, 1995; Shimizu *et al.*, 1997; Thomas, 2006). En garbanzo, se postula que la aplicación de AG<sub>3</sub> es necesaria para la producción de embriones somáticos. En los géneros *Iris*, *Hardwickia* y *Tylophora* la adición de AG<sub>3</sub> incrementa el número de embriones somáticos. Sin embargo, existen otros estudios en geranio, zanahoria, mandarina y anís, en los que la aplicación de AG<sub>3</sub> reduce la formación de ES, inhibiendo la iniciación y diferenciación (Fujimura & Komamine 1975; Tisserat & Murashinge 1977; Norma *et al.*, 1979; Hutchinson *et al.* 1997).

En contraste con el efecto positivo de AG<sub>3</sub> (0.5 μM) durante la embriogénesis somática de cocotero en la etapa de formación de embriones somáticos, la giberelina adicionada al medio de cultivo puede afectar negativamente la formación de embriones somáticos cuando se emplean concentraciones elevadas (5 y 20 μM), sugiriendo que los niveles endógenos de giberelinas que contiene el callo embriogénico son suficientes para generar embriones somáticos. La adición de AG<sub>3</sub> (0.5 μM) al medio de cultivo pudiera tener un efecto complementario a los niveles endógenos de AG<sub>3</sub> para la formación de embriones, pero la aplicación excesiva de AG<sub>3</sub>, puede tener un efecto

negativo en la formación de ES. Este efecto también se observa en *Medicago sativa*, ya que la aplicación de AG<sub>3</sub> (5 μM) promueve la formación de ES, pero el empleo de concentraciones elevadas (50 y 500 μM de AG<sub>3</sub>) inhibió la formación de ES (Rudus *et al.*, 2000).

El ácido giberélico, además de ser empleado en algunas especies para incrementar el número de ES, también se utiliza para estimular la germinación de embriones somáticos en *Eleutherococcus senticosus*, *Cynodon dactylon*, *Protea cynaroides* (Choi *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2002, Wu *et al.*, 2007). En cocotero (variedad Alto del Pacífico), la adición de AG<sub>3</sub> (0.5 μM) en el protocolo de MCE, además de incrementar el número de embriones somáticos, el AG<sub>3</sub> aceleró y aumentó su germinación.

### 3.5. Bibliografía

- Arnol S, Sabala I, Bozhkov P, Dyachok J and Filonova L (2002). Developmental pathway of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 69:233-249.
- Ashmore SE (1997). Status Report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetic resources. *International Plants Genetic Resources*, Rome, Italy p. 13.
- Azpeitia-Morales A (2003). Estudio de diferentes estrategias para promover la embriogénesis somática en cocotero a partir de plúmula. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatan, México p. 130.
- Batugal PA, Ramanatha V and Bong C (1998). Promoting multi-purpose uses and competitiveness of the coconut. *Proceeding of workshop*, 26-29 September 1996, Chumphon, Thailand. IPGRI-APO, Serdang.
- Chan JL, Saéñz L, Talavera C, Hornung R, Robert M and Oropeza C (1998). Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explant through somatic embryogenesis, *Plant Cell Rep.* 17:515-521.
- Choi YE, Kim JW, Yoon ES (1999). High frequency of plant production via somatic embryogenesis from callus or cell suspension cultures in *Eleutherococcus senticosus*. *Ann. Bot.* 83:309-314.
- Das, AB, Rout GR, Das P (1995). *In vitro* somatic embryogenesis from callus culture of the timber yielding tree *Hardwickia binata* Roxb. *Plant Cell Rep.* 15: 147-149.
- Eeuwens CJ (1976). Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured *in vitro*.

- Physiol. Plant. 36:23-28.
- Fujimuru T, Komamine A (1975). Effects of various growth regulators on the embryogenesis in carrot cell suspension culture. *Plant Sci. Lett.* 5:359-369.
  - Hita O, Lafarga C, Guerra H (1997). Somatic embryogenesis from chickpea (*Cicer arietium* L.) immature cotyledons: The effect of zeatin, gibberellic acid and indole-3-butyric acid. *Acta Physiol. Plant.* 19:333-338.
  - Hutchinson MJ, KrishnaRaj S, Saxena PK (1997). Inhibitory effect of GA<sub>3</sub> on the development of thidiazuron-induced somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey) hypocotyl cultures. *Plant Cell Rep.* 16:435-438.
  - Li L, Qu R (2002). *In vitro* somatic embryogenesis in turf-type bermudagrass roles of abscisic acid and gibberellic acid, and occurrence of secondary somatic embryogenesis. *Plant Breed.* 121:155-158.
  - Norma M, Huber J, Pharis RP (1979). Occurrence of 1(10) gibberellin A<sub>1</sub> counterpart, GA<sub>1</sub>, GA<sub>4</sub> and GA<sub>7</sub> in somatic cell embryo cultures of carrot and anise. *Agric. Biol. Chem.* 43:1793-1794.
  - Pérez-Nuñez MT, Chan JL, Sáenz L, González T, Verdeil JL, Oropeza C (2006). Improved somatic embryogenesis from *Cocos nucifera* (L.) Plumule explants. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 42:37-43.
  - Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE (1992) *Biología de las plantas*. Vol 2, Reverté, Barcelona. 480 p.
  - Rudus I, Kepczynska E, Kepczynski J (2000). Regulation of *Mendicago sativa* L. somatic embryogenesis by gibberellins. *Plant Growth Regul.* 36:1-5.
  - Shimizu K, Nagaike H, Yabuya T, Adachi T (1997). Plant regeneration from suspension culture of *Iris germanica*.

Plant Cell Tiss. Organ Cult. 50:27-31.

- Thomas TD (2006). Effect of sugars, Gibberellic Acid and Abscisic Acid Somatic Embryogenesis in *Tylophora indica* (Burm. f.) Merrill. Chin. J. Biotechnol. 22:465-471.
- Tisserat B, Murashige (1977). Repression of asexual embryogenesis *in vitro* by some plant growth regulators. *In Vitro* 13:799-805.
- Wu HC, Du Toit ES, Reinhardt CF (2007). A protocol for direct somatic embryogenesis of *Protea cynaroides* L. using zygotic embryos and cotyledon tissues. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 89:217-224.



## CAPÍTULO 4

### **4.1. Estudio de la expresión de genes del ciclo celular en la formación y germinación de embriones de cocotero.**

Las fitohormonas tienen un papel esencial durante el desarrollo y germinación de embriones, modificando la expresión de genes que intervienen en el control del ciclo celular. Fitohormonas como auxinas y citocininas promueven la activación del ciclo celular; en el caso de las giberelinas, éstas pueden promover la división celular, la elongación celular o ambos dependiendo de la especie, etapa de desarrollo y condiciones del cultivo (Francis & Sorrell, 2001; Sauter *et al.*, 1992).

La progresión de fases del ciclo celular es regulada cooperativamente por diversas clases de CDKs (Sherr & Roberts 1999). La transición entre la fase G1 y la fase S es consecuencia de la participación de CDKs en la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (pRb), que resulta en la disociación del complejo Rb-E2F, permitiendo que el factor de transcripción E2F se libere y active genes blanco necesarios para entrar a la fase S. La inactivación de Rb es mantenida a lo largo del ciclo celular por un aumento en la concentración de distintos complejos CDK-ciclina, pero cuando la ciclina se degrada, Rb se activa y se une a E2F (Boer & Murray, 2000).

En plantas la proliferación celular parece estar coordinada con los programas de diferenciación celular y crecimiento en los diferentes procesos (desarrollo,

germinación). En los primeros estados de desarrollo del embrión, la división celular no representa un mecanismo de crecimiento, debido a que se producen células pequeñas sin incrementos significativos en el volumen del embrión (Jürgens & Mayer, 1994; Mansfield & Briarty, 1991). En estados posteriores, la intensidad de la proliferación celular es modulada por el crecimiento del embrión (Hemerly *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 2006).

En general durante la embriogénesis se ha observado que en los estadios de maduración tardíos disminuye la división celular, presentándose una detención del ciclo celular en la fase G1 y, justo antes de la germinación, se reactiva la división celular tanto en semillas ortodoxas (presentan quiescencia) como en semillas vivíparas (Bino *et al.*, 1993; Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003; Sánchez *et al.*, 2005). En el caso de embriones somáticos, que presentan un desarrollo continuo como en las semillas vivíparas, se ha observado que en estadios de maduración se reduce la división celular y antes de la germinación (formación del meristemo vegetativo del tallo y raíces) se incrementa la división celular (Schmidt *et al.*, 2006). Durante la germinación de maíz (semilla ortodoxa), se ha reportado que el nivel de las proteínas PCNA y CDKA se estimula desde las primeras horas del proceso (Sánchez *et al.*, 2005); mientras que, la expresión de la ciclina D2 se induce a partir de la sexta hora de la germinación de maíz (Gutiérrez *et al.*, 2005). Estos estudios parecen indicar que existe una relación y coordinación del ciclo celular con los procesos de la planta, por lo que estudios a nivel molecular y bioquímico relacionados con la regulación del ciclo celular durante el desarrollo y germinación de embriones son de gran importancia para entender los procesos involucrados en la regeneración de plantas. Además de que podrían servir como base para futuras

mejoras en la respuesta de cada proceso.

En cocotero se ha clonado una cinasa dependiente de ciclina (*CDKA*) y dos miembros de la familia de *E2F* a partir de una biblioteca de ADNc generada de plúmulas de embriones cigóticos cultivadas *in vitro*. Estudios de la expresión de genes que intervienen en la regulación del ciclo celular durante la formación y germinación de embriones de cocotero son de gran interés para conocer mejor estos procesos, por lo que en esta tesis se realizó el estudio de la expresión de genes que intervienen en la regulación del ciclo celular durante el desarrollo de embriones somáticos con la influencia de ácido giberélico ( $AG_3$ ), empleando la concentración de  $0.5 \mu M$  de  $AG_3$ , que favorece la formación, desarrollo y germinación de embriones somáticos.

## **4.2. Materiales y métodos**

El estudio de la expresión de genes que intervienen en la regulación del ciclo celular durante la germinación se realizó en embriones cigóticos, debido a que en estos momentos es complicado el estudio de la germinación de ES por la asincronía del sistema, sin embargo, estos resultados podrían servir como marco de referencia para la germinación de embriones somáticos. El estudio de la germinación de embriones cigóticos se realizó en presencia de AG<sub>3</sub>, que acelera e incrementa la germinación (Pech *et al.*, 2007). El estudio de la formación de ES y germinación de embriones cigóticos se realizó en presencia y ausencia de ácido giberélico.

### **4.2.1. Desarrollo de embriones somáticos**

Se empleó una línea de callos embriogénicos de la variedad Alto del Pacífico obtenidos por el protocolo de multiplicación de callo embriogénico de acuerdo a lo reportado por Pérez-Núñez *et al.*, (2006) (ver sección 3.2.2 y 3.2.3 del capítulo anterior) para la generación de embriones somáticos. Las condiciones de cultivo durante la embriogénesis somática constan de dos etapas; la etapa I involucra la fase de formación de callo embriogénico, en la que se emplea el medio de cultivo Y3 de acuerdo a Eeuwens (1976), adicionado con sacarosa (50 g l<sup>-1</sup>), Gelrite (3 g l<sup>-1</sup>), carbón activado (2.5 g l<sup>-1</sup>) y 600 μM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Todos los explantes fueron cultivados en frasco de vidrio con capacidad de 35 ml conteniendo 10 ml de medio de cultivo y en condiciones I (un periodo de oscuridad durante tres meses a 27 ± 2 °C).

La etapa II comprende la formación de embriones somáticos, en esta etapa se emplea el medio de cultivo II (medio Y3), con sacarosa (50 g l<sup>-1</sup>), gelrite (3 g l<sup>-1</sup>), carbón activado (2.5 g l<sup>-1</sup>), 6 μM de 2,4-D y 300 μM de 6-bencilaminopurina (6-BAP). Todos los callos embriogénicos fueron cultivados en frascos de 100 ml, conteniendo 30 ml de medio de cultivo, en condiciones II en fotoperiodo de 16 h de iluminación (45-60 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> ppfd) / 8 h de oscuridad a 27 ± 2 °C y con subcultivos cada dos meses. El protocolo se modificó adicionando en el medio II AG<sub>3</sub> a la concentración de 0.5 μM. Los CE en el medio II condiciones II se dejaron durante 150 días con resiembras en el mismo medio cada dos meses. A lo largo de este periodo se aislaron embriones en diferentes estadios: preglobular, globular, escutelar y germinado, posteriormente se congelaron en N<sub>2</sub> líquido y se conservaron a -80 °C para su análisis posterior.

#### **4.2.2. Germinación de embriones cigóticos**

Se emplearon embriones cigóticos de *Cocos nucifera L.*, los cuales fueron cultivados *in vitro* en medio Y3 con 0.3% de gelrite sin reguladores de crecimiento de acuerdo a las condiciones reportadas por Pech y Ake *et al.*, (2007) para su germinación (utilizando una concentración óptima de 4.6 μM de AG<sub>3</sub>). Se realizaron muestreos cada dos días (3 replicas) desde el día cero hasta el día 20 después de la imbibición. Los embriones cigóticos se congelaron en N<sub>2</sub> líquido y conservaron a -80 °C para su análisis posterior.

### 4.2.3. Extracción y cuantificación de ácidos nucleicos

El ARN se extrajo utilizando el método empleado por Herrera en el 2000, que consiste en el uso del amortiguador de extracción conformado por Tris-HCl 0.1M, pH 8.0; EDTA 0.2 mM, pH 8.0; SDS 2% y  $\alpha$  monotioglicerol 0.15%. Después de triturado el tejido se añadió el amortiguador de extracción y se agregó fenol-cloroformo (1:1), posteriormente se incubó la mezcla a 70 °C durante 5 min, después se centrifugó y se colectó el sobrenadante. Se agregó isopropanol frío al sobrenadante en una relación de volumen 1:1. Se incubó la mezcla a -20 °C por 10 minutos y se centrifugó para eliminar el sobrenadante. Finalmente, se lavó la pastilla con etanol al 75%, se centrifugó y se eliminó el exceso de etanol para hidratar la pastilla. Se sometieron las muestras de ARN a una nucleasa de ADN (ADNasa, Ambion) siguiendo las recomendaciones del proveedor para eliminar la contaminación por ADN. La concentración de ARN se determinó por fluorescencia empleando el paquete Quant-it Ribogreen RNA reagent (Molecular Probes-Invitrogen detection technologies) de acuerdo a las instrucciones del proveedor y la calidad del ARN aislado se determinó mediante electroforesis.

### 4.2.4. Síntesis de ADN complementario

Para la síntesis de ADN complementario se empleo la enzima retrotranscriptasa superscript II (Invitrogen), a partir de 1  $\mu$ g de RNA total, en un volumen total de 20  $\mu$ L, que contiene 4  $\mu$ L de amortiguador 5X (20 mM Tris-HCl, pH7.5; 100 mM NaCl; 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.01% v/v NP-40; 50% v/v glicerol), 1  $\mu$ L de la mezcla de dNTPs (10 mM cada uno), 2  $\mu$ L de DTT (0.1 M), 1  $\mu$ L de RNaseOUT (40 unidades/  $\mu$ L), 1  $\mu$ L

de random primers (250 ng). La mezcla se incubó a 42 °C por 1h y después se inactivó la retrotranscriptasa por calentamiento (70 °C por 15 min). Posteriormente se realizó el análisis de la calidad del ADNc de cada una de las muestras mediante la amplificación del gen que codifica la subunidad ribosomal 18S.

#### **4.2.5. Amplificación por PCR-Tiempo Real**

Para la amplificación se utilizaron 4  $\mu$ L de la mezcla de la retrotranscripción (ADNc), 25  $\mu$ L de la mezcla de Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen), 2  $\mu$ L de la mezcla de los cebadores sentido y antisentido (10  $\mu$ M cada uno) y 1  $\mu$ L de colorante de referencia FAM. Los cebadores empleados para cada gen amplificado se muestran en el Cuadro 4.1. Las muestras primero se sometieron a una temperatura de 50 °C por 2 min, después se desnaturalizaron a 94 °C por 4 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 2 min, 62 °C por 40 s, y 70 °C por 40 s. Para finalizar la reacción se da un paso de extensión de 72 °C por 10 min. El equipo empleado para efectuar el PCR-Tiempo Real fue una termocicladora marca iCycler BIO-RAD. Después del último ciclo del PCR-Tiempo Real, se realizó la curva de disociación para verificar la amplificación de un solo producto. Los valores de intensidad son con base en la incorporación del colorante fluorescente SYBR® Green (excitación 497, emisión 520 nm; Pruebas moleculares) en los productos del PCR de doble cadena y que son medidos por el equipo iCycler BIO-RAD. Todos los genes son normalizados con los niveles de expresión del gen que codifica para la subunidad ribosomal 18S.

**Cuadro 4.1** Secuencias de cebadores utilizados para la amplificación de genes del estudio de Tiempo Real-PCR.

Genes	Secuencias de cebadores	Tamaño de amplificación
<i>CnCDKA</i>	Cebador sentido 5'-TGGATCAGTATGAGAAGGTGGAGAAGAT-3'	571 pb
	Cebador antisentido 5'-TCGATCTCAGAATCTACAGGAAACAGT-3'	
<i>CnE2F1</i>	Cebador sentido 5'-GTTCAAGACTGTCAGAGGATGGACTCAG-3'	497 pb
	Cebador antisentido 5'-CTGTACATATGGACCGTGGCTGTTCT-3'	
<i>CnE2F2</i>	Cebador sentido 5'-TGGAAGACAGCACGTATCCTTCAC-3'	382 pb
	Cebador antisentido 5'-CCCAGCTAGAAGCTCTATTTTTGATGG-3'	
Subunidad ribosomal 18S	Cebador sentido 5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3'	186 pb
	Cebador antisentido 5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'	

La normalización se realizó mediante la expresión del gen de la subunidad ribosomal 18S como estándar interno. Los cálculos fueron realizados con base a lo reportado por Livak y Schittgen (2001), donde el cálculo del  $\Delta Ct$  se refiere a la resta del valor umbral (Ct) de la muestra con respecto al valor umbral del gen normalizador ( $\Delta Ct = Ct$  del gen a estudiar -  $Ct$  del gen normalizador). Posteriormente se determina el  $\Delta Ct$  más alto del gen de interés y se le denomina  $\Delta Ct$  de la línea base. Este valor es restado a los valores de  $\Delta Ct$  obtenidos del gen de interés ( $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  del gen de interés -  $\Delta Ct$  de la línea base), finalmente las unidades de expresión relativa se obtuvieron de la fórmula  $URE = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Los resultados son expresados en Niveles de Expresión Relativa (NER). Los niveles de expresión relativa durante el desarrollo de embriones somáticos son con

base en la expresión del CE para cada gen. En el caso de la germinación de embriones cigóticos, los niveles de expresión son con base al día cero del control (CTL).

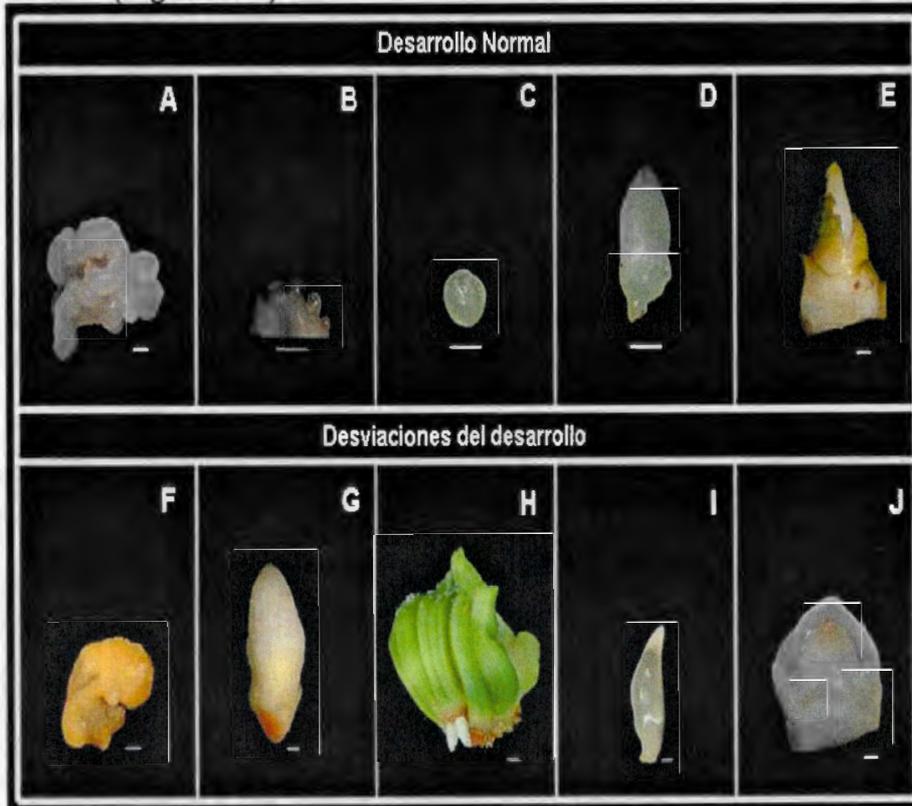
### **4.3. Resultados**

#### **4.3.1. Expresión de genes del ciclo celular durante el desarrollo de embriones somáticos en presencia de ácido giberélico.**

El estudio de la expresión de genes del ciclo celular se realizó durante el desarrollo normal de ES (ES en fase de proembrión, globular y escutelar), en ES germinados (Figura 4.1A – E) y en desviaciones del desarrollo (estructuras no deseadas generadas durante la embriogénesis somática) como: callo no embriogénico (CN), ES que perdieron su conformación, ES albinos y ES germinados albinos (Figura 4.1F – J). En este estudio el desarrollo de embriones somáticos fue en ausencia y presencia de AG<sub>3</sub>, en la segunda condición se empleó una concentración de 0.5  $\mu$  M de AG<sub>3</sub>, que favorece la formación y germinación de ES en cultivo *in vitro*.

Durante la embriogénesis somática de cocotero se observó que en los primeros estadios de desarrollo (proembriones y embriones globulares) se presentaron niveles de expresión de *CnE2F1* más elevados que en los embriones en fase escutelar (en ambos tratamientos, CTL y AG<sub>3</sub>), mientras que los embriones germinados presentaron los niveles más bajos de expresión comparado con los diferentes estadios de desarrollo de los ES (en ambos tratamientos). Cuando se compararon los niveles de expresión de *CnE2F1* en presencia y ausencia de AG<sub>3</sub> durante el desarrollo de embriones somáticos se conservó el mismo patrón de

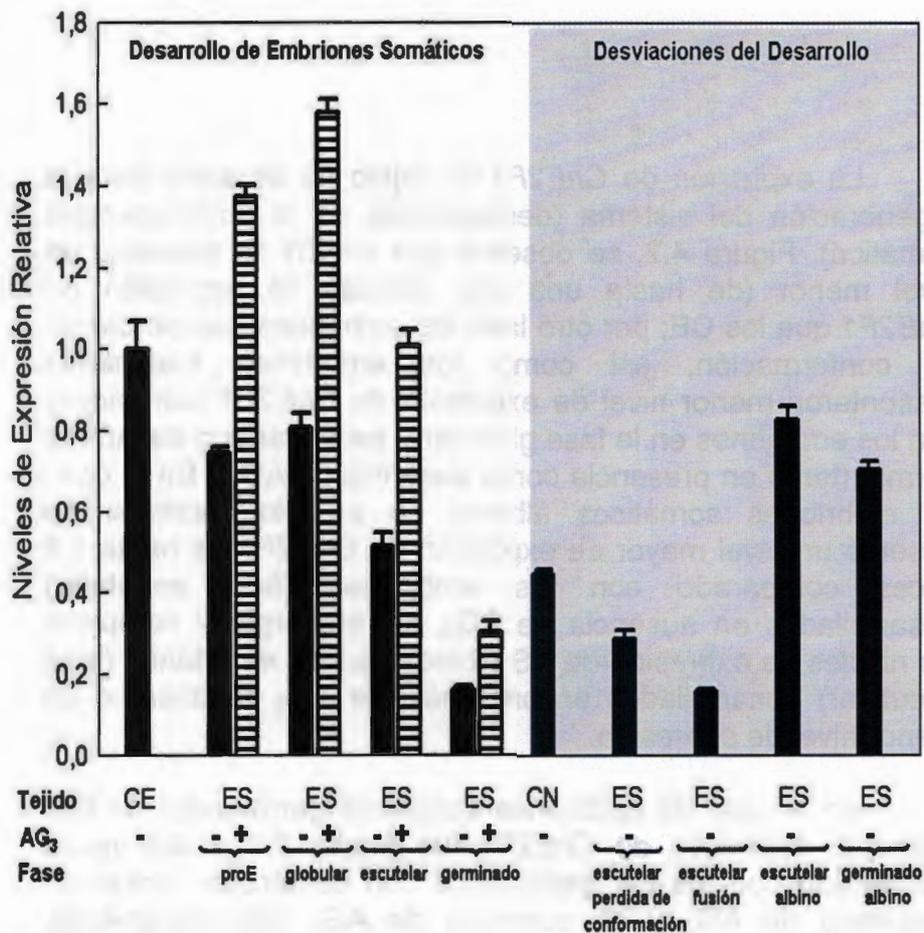
expresión; sin embargo, de forma general los embriones desarrollados en presencia de AG<sub>3</sub> presentaron mayores niveles de expresión (hasta 2 veces más) comparado con el control (Figura 4.2).



**Figura 4.1. Desarrollo normal y desviaciones del desarrollo durante la embriogénesis somática de cocotero.** Desarrollo normal (A, B, C, D, E). Desviaciones del desarrollo (F, G, H, I, J). (A) Callo embriogénico. (B) Pro-embrión. (C) Embrión somático en fase globular. (D) Embrión somático en fase escutelar. (E) Embrión somático germinado. (F) Callo no embriogénico. (G) Embrión somático que perdió su conformación. (H) Embrión somático fusionado. (I) Embrión somático albino en fase escutelar. (J) Embrión somático albino germinado (J). La barra representa 1 mm de longitud.

La expresión de *CnE2F1* en tejido no deseado para la regeneración del sistema (desviaciones de la embriogénesis somática), Figura 4.2, se observó que en CN se presentó un nivel menor (de hasta una vez menos) de expresión de *CnE2F1* que los CE; por otro lado los embriones que perdieron su conformación, así como los embriones fusionados presentaron menor nivel de expresión de *CnE2F1* comparado con los embriones en la fase globular y escutelar con desarrollo normal (tanto en presencia como ausencia de AG<sub>3</sub>). En el caso de embriones somáticos albinos en estadio escutelar se observó un nivel mayor de expresión de *CnE2F1* de hasta 1.6 veces comparado con los embriones (fase escutelar) desarrollados en ausencia de AG<sub>3</sub>, sin embargo al comparar los niveles de expresión de ES albinos con los embriones (fase escutelar) desarrollados en presencia de AG<sub>3</sub> se observó un menor nivel de expresión.

En el caso de embriones somáticos germinados de tipo albino la expresión de *CnE2F1* fue mayor 2.3 y 3.5 veces comparado con los ES germinados con desarrollo normal en presencia de AG<sub>3</sub> y en ausencia de AG<sub>3</sub> respectivamente, Figura 4.2.

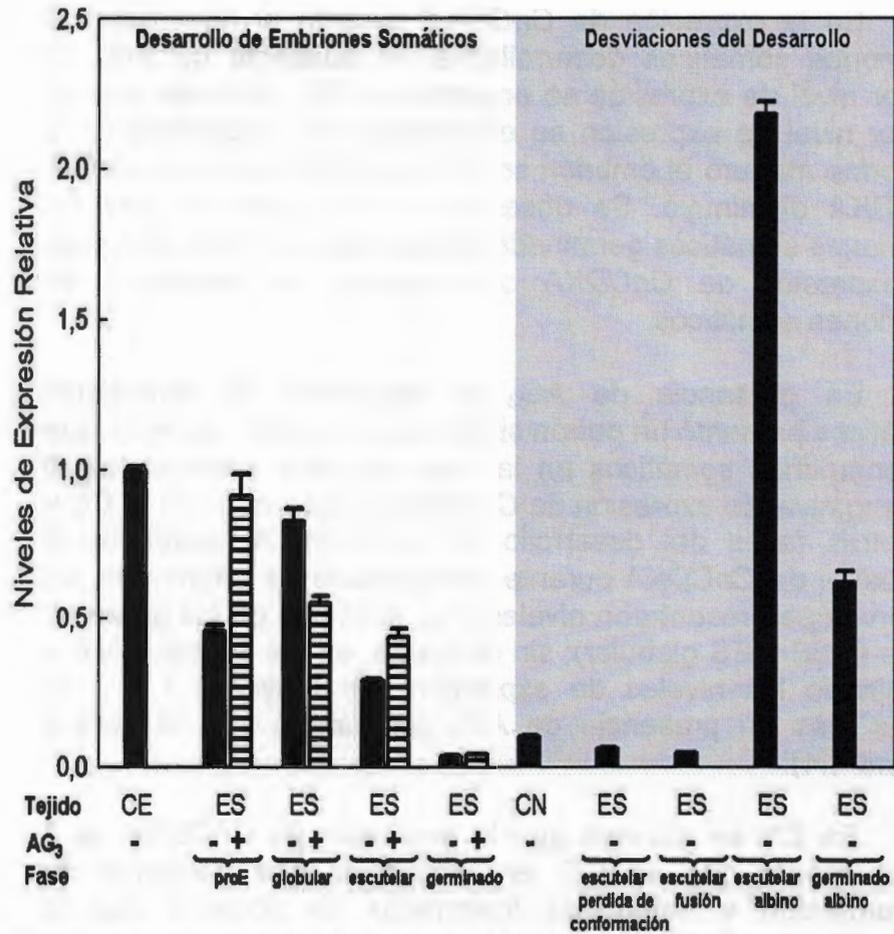


**Figura 4.2** Expresión de CnE2F1 durante el desarrollo normal de embriones somáticos así como en desviaciones del desarrollo (tejido no deseado para la formación de plantas). Expresión de CnE2F1 durante las diferentes fases de maduración del embrión somático (proembrión, globular, escutelar), en embriones germinados, así como en tejido no deseado para la regeneración de plantas (callo no embriogénico, embriones usionados, embriones albinos). Presencia de  $0.5 \mu M$  de AG<sub>3</sub> (+) y ausencia de AG<sub>3</sub> (-). Callo embriogénico (CE), proembrión (proE), embrión somático (ES), callo no embriogénico (CN), ácido giberélico (AG<sub>3</sub>).

En el caso de la expresión de *CnE2F2* (Figura 4.3) durante el desarrollo de embriones somáticos, en el control (ausencia de AG<sub>3</sub>) se puede observar que los niveles de expresión más elevados se tienen en callo embriogénico, después se presenta una disminución de la expresión en la fase de proembrión y en embriones somáticos globulares la expresión de *CnE2F2* se eleva hasta una vez más comparado con el proembrión, mientras que la expresión de *CnE2F2* en los embriones en la fase escutelar presentó una disminución comparando con el nivel de expresión en la fase de proembrión. La expresión de *CnE2F2* en embriones somáticos germinados presenta el nivel más bajo durante la embriogénesis somática.

En el caso del desarrollo de embriones somáticos en presencia de AG<sub>3</sub>, se puede observar que el nivel más alto de expresión de *CnE2F2* se presentó en callos embriogénicos comparado con las diferentes fases de maduración del ES. Se puede observar que en las diferentes fases de maduración del embrión, la fase de proembrión presenta los niveles más altos de expresión de *CnE2F2* y conforme madura el ES, la expresión de *CnE2F2* disminuye paulatinamente. El nivel de expresión más bajo de *CnE2F2* fue en los embriones somáticos germinados comparado con las diferentes fases del desarrollo de ES (Figura 4.3). La expresión de *CnE2F2* en presencia de AG<sub>3</sub> durante la embriogénesis somática indica que los proembriones y los embriones somáticos en la fase escutelar presentan niveles de expresión 0.8 y 0.3 veces más respectivamente comparado con el control, mientras que los embriones somáticos globulares desarrollados en presencia de AG<sub>3</sub> presentan un nivel de expresión menor (0.3 veces) que en el control (Figura 4.3).

En CN se presentó un nivel de expresión menor (10 veces) comparado con el CE. Por otro lado los embriones somáticos que perdieron su conformación y embriones fusionados también presentan niveles bajos de expresión de *CnE2F2* comparado con los embriones que presentan un desarrollo normal. Los embriones somáticos albinos en estadio escutelar muestran niveles de expresión de *CnE2F2* más elevados comparado con los embriones somáticos en fase escutelar con desarrollo normal (tanto en ausencia como en presencia de  $AG_3$ ); los embriones somáticos albinos germinados también presentan niveles de expresión de *CnE2F2* más elevados (15 veces más) que los embriones germinados con un desarrollo normal (tanto en ausencia como en presencia de  $AG_3$ ), (Figura 4.3).



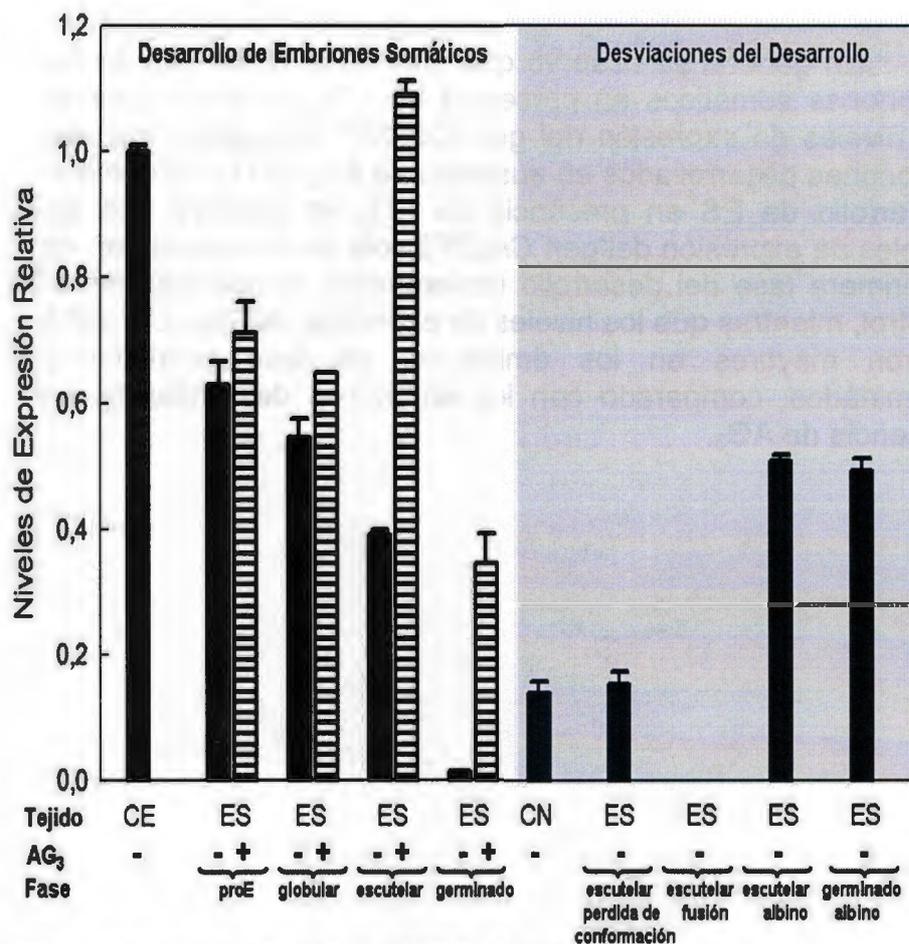
**Figura 4.3** Expresión de CnE2F2 durante el desarrollo normal de embriones somáticos así como en desviaciones del desarrollo (tejido no deseado para la formación de plantas). Expresión de CnE2F2 durante las diferentes fases de maduración del embrión somático (proembrión, globular, escutelar), en embriones germinados, así como en tejido no deseado para la regeneración de plantas (callo no embriogénico, embriones fusionados, embriones albinos). Presencia de  $0.5 \mu\text{M}$  de AG<sub>3</sub> (+) y ausencia de AG<sub>3</sub> (-). Callo embriogénico (CE), proembrión (proE), embrión somático (ES), callo no embriogénico (CN), ácido giberélico (AG<sub>3</sub>).

En la expresión de *CnCDKA* durante el desarrollo de embriones somáticos desarrollados en ausencia de AG<sub>3</sub>, el mayor nivel de expresión se presentó en CE, después con un menor nivel de expresión se encontraron los proembriones y conforme maduró el embrión somático el nivel de expresión de *CnCDKA* disminuyó. Se observó en la Figura 4.4 que los embriones somáticos germinados presentaron el nivel más bajo de expresión de *CnCDKA* con respecto al desarrollo de embriones somáticos.

En presencia de AG<sub>3</sub> el desarrollo de embriones somáticos presentó un patrón similar al del control, excepto que los embriones somáticos en la fase escutelar presentaron el máximo nivel de expresión de *CnCDKA* comparado con el CE y las otras fases del desarrollo del embrión. Al comparar la expresión de *CnCDKA* durante el desarrollo de embriones, se observó que presentaron niveles muy similares en las primeras fases (proE y ES globular); sin embargo, en los ES escutelar y germinado los niveles de expresión son mayores 1.5 y 29 veces más en presencia de AG<sub>3</sub> comparado con el control (Figura 4.4).

En CN se observó que la expresión de *CnCDKA* es 7 veces menor que en CE; en embriones que perdieron su conformación y embriones fusionados se observó que la expresión de *CnCDKA* es menor o nula comparado con los embriones que presentaron un desarrollo normal. En el caso de embriones somáticos albinos en la fase escutelar, presentaron una expresión mayor (hasta 1.25 veces) con respecto a los embriones (escutelar) desarrollados en ausencia de AG<sub>3</sub>, mientras que el nivel de expresión es menor (hasta 2 veces) comparado con los embriones (escutelar) desarrollados en presencia de AG<sub>3</sub> (Figura 4.4).

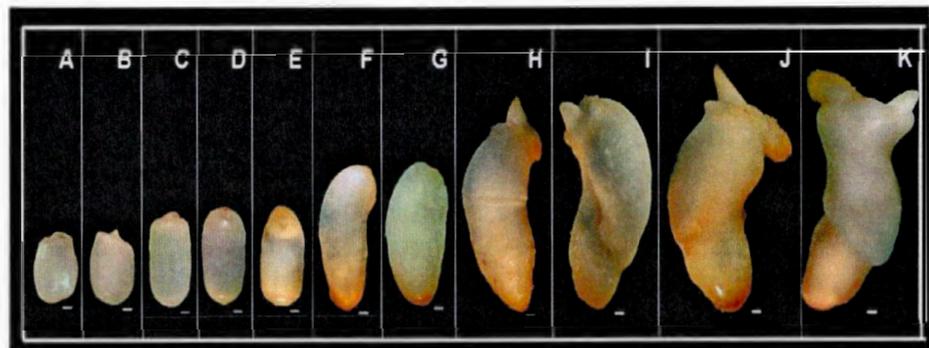
En general se observó que durante el desarrollo de los embriones somáticos en presencia de AG<sub>3</sub> se incrementaron los niveles de expresión del gen *CnE2F1* comparado con los embriones desarrollados en ausencia de AG<sub>3</sub> (CTL). Durante el desarrollo de ES en presencia de AG<sub>3</sub> se observó que los niveles de expresión del gen *CnE2F2* solo se incrementaron en la primera fase del desarrollo (proembrión) comparado con el control, mientras que los niveles de expresión del gen *CnCDKA* fueron mayores en los embriones en fase escutelar y germinados, comparado con los embriones desarrollados en ausencia de AG<sub>3</sub>.



**Figura 4.4** Expresión de CnCDKA durante el desarrollo normal de embriones somáticos así como en desviaciones del desarrollo (tejido no deseado para la formación de plantas). Expresión de CnCDKA durante las diferentes fases de maduración del embrión somático (proembrión, globular, escutelar), en embriones germinados, así como en tejido no deseado para la regeneración de plantas (callo no embriogénico, embriones fusionados, embriones albinos). Presencia de 0.5  $\mu$  M de AG<sub>3</sub> (+) y ausencia de AG<sub>3</sub> (-). Callo embriogénico (CE), proembrión (proE), embrión somático (ES), callo no embriogénico (CN), ácido giberélico (AG<sub>3</sub>).

### 4.3.2 Expresión de genes del ciclo celular durante la germinación de embriones cigóticos.

El estudio de la expresión de genes del ciclo celular se realizó durante el curso temporal de la germinación de embriones cigóticos de cocotero, cada 2 días hasta el día 20 de cultivo *in vitro* (Figura 4.5), presentando un crecimiento del embrión cigótico hasta el día que inicia su germinación (día 10, tanto en ausencia como en presencia de AG<sub>3</sub>, Figura 4.7A–B). De acuerdo a lo reportado por Pech y Ake *et al.* (2007), la adición de 4.6  $\mu\text{M}$  de AG<sub>3</sub> favorece la germinación de embriones cigóticos de cocotero comparado con el control.



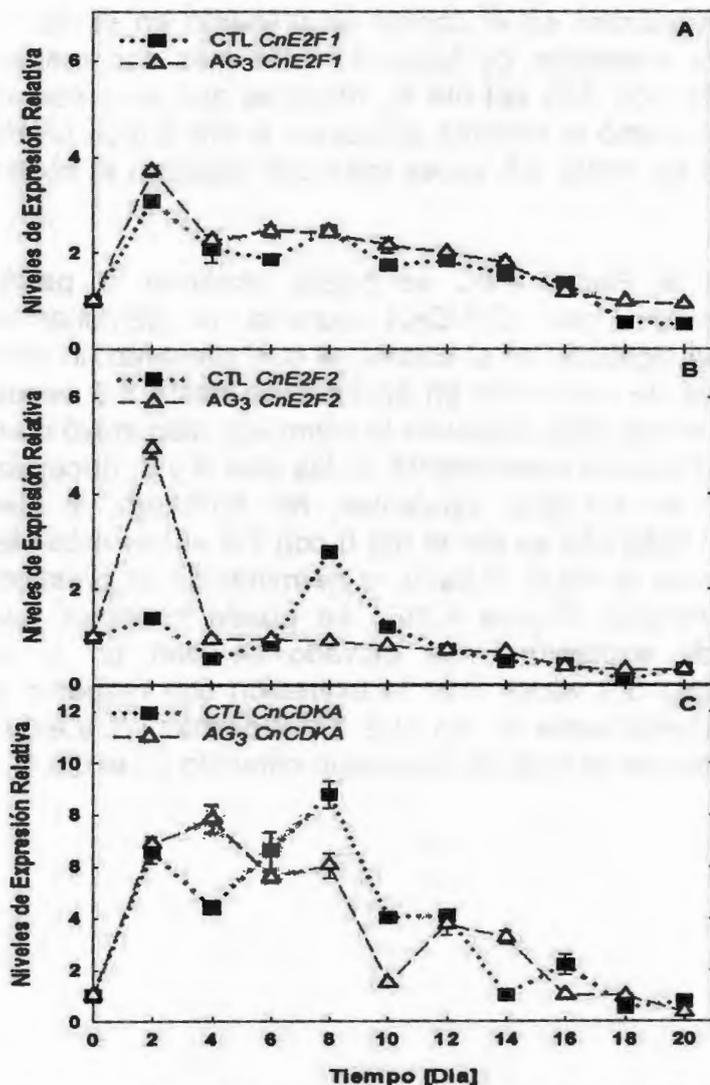
**Figura 4.5.** Germinación de embriones cigóticos de cocotero en cultivo *in vitro*. (A) Día cero de imbibición. (B) Día 2 después de la imbibición. (C) Día 4 después de la imbibición. (D) Día 6 después de la imbibición. (E) Día 8 después de la imbibición. (F) Día 10 después de la imbibición. (G) Día 12 después de la imbibición. (H) Día 14 después de la imbibición. (I) Día 16 después de la imbibición. (J) Día 18 después de la imbibición. (K) Día 20 después de la imbibición. La barra representa 1 mm de longitud.

El estudio de expresión de los genes *CnE2F1*, *CnE2F2* y *CnCDKA* durante la germinación de los embriones cigóticos se realizó en ausencia y en presencia de AG<sub>3</sub>, en la segunda condición se acelera y favorece la germinación de embriones cigóticos (Figura 4.7A–B). Durante la germinación de los embriones cigóticos, el patrón de expresión del gen *CnE2F1* obtenido en ausencia y presencia de AG<sub>3</sub> fue similar (Figura 4.6A), observándose un incremento en el nivel de expresión del gen *CnE2F1* en el día 2, tanto en el control como en el tratamiento (AG<sub>3</sub>) de 2 y 2.5 veces más, respectivamente, en relación al día 0 (Figura 4.6A). Posteriormente, la expresión disminuyó paulatinamente hasta alcanzar niveles inferiores a los obtenidos en el día cero.

La expresión del gen *CnE2F2* durante la germinación de los embriones (control), mostró un perfil diferente al de *CnE2F1*. En la Figura 4.6B se puede apreciar un aumento en la expresión al día 8 de hasta 1.8 veces más con respecto al día 0, después en el día 10 disminuyó la expresión de este gen y finalmente se presentó una disminución paulatina de la expresión de *CnE2F2* hasta alcanzar valores menores a los niveles de expresión inicial (día cero). En el caso de la expresión de *CnE2F2* en presencia de AG<sub>3</sub> (Figura 4.6-B), se observó un patrón diferente al del control, en el que se detectó un nivel de expresión máximo del gen en el día 2 de hasta 4 veces más con respecto al día cero. En el día 4 disminuyó la expresión y mantuvo ese nivel hasta el día 14, posteriormente se presentó una disminución gradual de la expresión de *CnE2F2* por debajo del nivel de expresión obtenido en el día cero. Al comparar la expresión del gen *CnE2F2* en ausencia y presencia de AG<sub>3</sub> (Figura 4.6B), se observó que el nivel de

expresión máximo en el control se presentó en el día 8 (con niveles de expresión de hasta 2 veces más con respecto al tratamiento con AG<sub>3</sub> del día 8), mientras que en presencia de AG<sub>3</sub> se adelantó la máxima expresión al día 2 (con niveles de expresión de hasta 3.5 veces más con respecto al control del día 2).

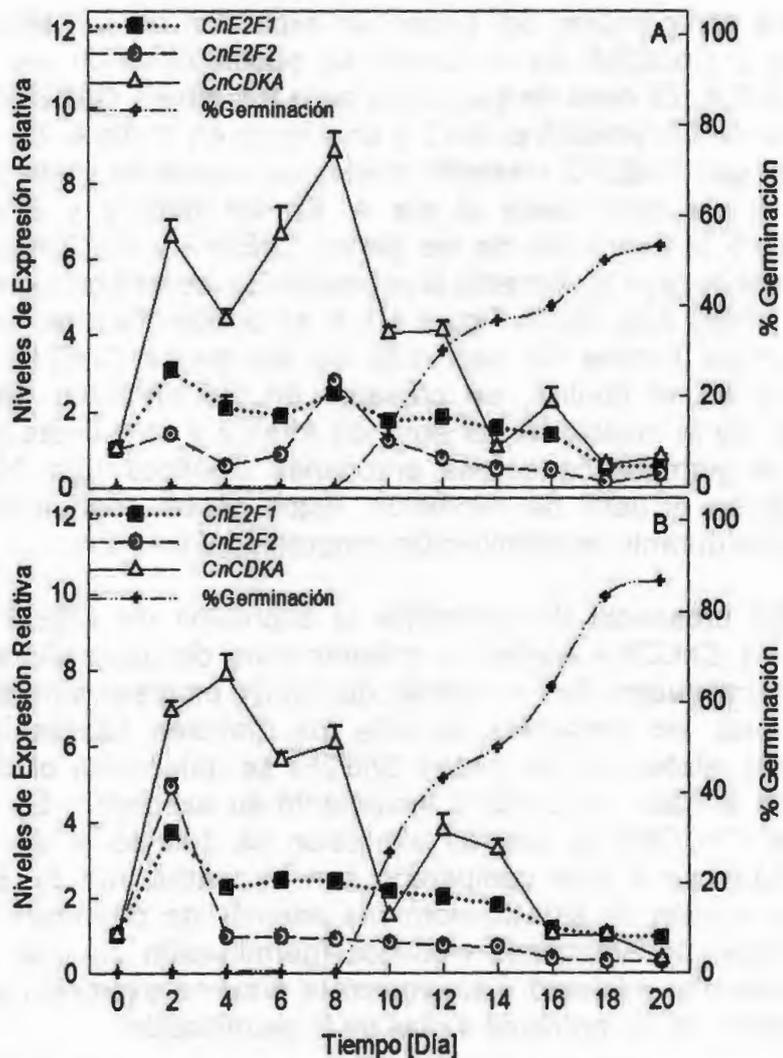
En la Figura 4.6C se puede observar el patrón de expresión del gen *CnCDKA* durante la germinación de embriones cigóticos en el control, el cual presentó un aumento en el nivel de expresión en el día 2 de hasta 5.6 veces con respecto al día cero. Después la expresión disminuyó en el día 4 y se incrementó nuevamente en los días 6 y 8, decayendo la expresión en los días siguientes. Sin embargo, el nivel de expresión más alto se dió el día 8 con 7.8 veces más elevado con respecto al día 0. Durante la germinación en presencia de ácido giberélico (Figura 4.6C), se puede observar que los niveles de expresión más elevado se dan en el día 4 presentando 5.9 veces más la expresión con respecto al día cero. Posteriormente en los días 6 y 8 disminuyó la expresión comparado con el nivel de expresión obtenido en el día 4.



**Figura 4.6** Expresión relativa de genes que regulan el ciclo celular durante la germinación de embriones cigóticos de cocotero en presencia y ausencia de AG<sub>3</sub>. (A) Niveles de expresión relativa del gen CnE2F1. (B) Niveles de expresión relativa del gen CnE2F2. (C) Niveles de expresión relativa del gen CnCDKA.

La comparación del patrón de expresión de los genes *CnE2Fs* y *CnCDKA* en el control se puede observar en la Figura 4.7-A. El nivel de expresión para los genes *CnE2F1* y *CnCDKA* se incrementó el día 2 y disminuyó en el día 4. En el caso del gen *CnE2F2* presentó niveles de expresión similares desde el día cero hasta el día 4. En los días 6 y 8 se incrementó la expresión de los genes *CnE2F2* y *CnCDKA* y finalmente decayó lentamente la expresión de los tres genes en los siguientes días. En la Figura 4.7-A, se puede observar que los mayores niveles de expresión de los genes *CnE2Fs* y *CnCDKA* en el control, se presentó en los primeros días después de la imbibición del embrión (días 2 y 8) y antes de iniciar la germinación de los embriones cigóticos (día 10). Basados en el perfil de expresión, estos genes podrían ser esenciales durante la germinación temprana del embrión.

En presencia de giberelina la expresión de *CnE2F1*, *CnE2F2* y *CnCDKA* aceleró el máximo nivel de expresión en los primeros cuatro días y después disminuyó progresivamente. En general, en presencia de  $AG_3$  los mayores niveles de expresión relativa de los genes *CnE2Fs* se detectaron al día dos y en el caso de *CnE2F2* incrementó su expresión. En el caso de *CnCDKA* la máxima expresión se detectó el día 4 (adelantándose 4 días comparado con el control, día 8). Es decir, la adición de esta fitohormona además de promover la germinación de embriones cigóticos (germinación día 10), a nivel molecular adelantó y sincronizó la máxima expresión de estos genes en los primeros 4 días de la germinación.



**Figura 4.7** Expresión relativa de genes que intervienen en la regulación del ciclo celular (CnE2Fs y CnCDKA) y porcentaje de germinación de embriones cigóticos de cocotero. (A) En ausencia de AG<sub>3</sub>. (B) En presencia de AG<sub>3</sub>.

## **4.4. Discusión**

### **4.4.1 Discusión del desarrollo de embriones somáticos**

La embriogénesis es un estado crítico en el ciclo de vida de las plantas; en esta etapa participan de forma coordinada un gran número de genes que aseguran el desarrollo y organización de una estructura multicelular para la generación de una planta. Tanto la embriogénesis cigótica como la somática constan de una fase inicial de morfogénesis que se caracteriza por presentar una alta división celular, que disminuye durante la maduración del embrión (incrementándose la diferenciación celular) y la germinación (Fukuda *et al.*, 1994; Meinke, 1995). En las primeras etapas de la embriogénesis se presenta una intensa proliferación celular (Tsukahara & Komamine, 1997; Stasolla *et al.*, 2003), así como la modulación de la expresión de genes que intervienen en la regulación del ciclo celular (Inze *et al.*, 2005). Las células con una alta actividad de división se caracterizan por tener un tamaño pequeño, con gránulos pequeños de almidón, un contenido citoplásmico denso, un núcleo grande con nucleolo prominente, vacuolas pequeñas y pared celular primaria delgada (Halperin & Wetherell 1964; Schwendiman *et al.*, 1990, Verdeil *et al.*, 1991).

En el caso de cocotero se ha observado por cortes histológicos que durante la embriogénesis somática el CE presenta varios centros meristemáticos que pueden llevar a la formación de embriones somáticos (Verdeil *et al.*, 2001; Pérez-Nuñez *et al.*, 2006; Saénz *et al.*, 2006). En las primeras fases del desarrollo del embrión somático (proembrión y embrión globular) se presenta un gran número de células con alta división celular en gran parte de cuerpo del embrión, y

conforme va madurando el embrión (embrión escutelar) estas células proliferativas se localizan principalmente en las zonas meristemáticas (Pérez, 2006; Saénz *et al.*, 2006). En este estudio a nivel molecular el CE presentó los niveles más elevados de expresión de los genes *CnE2F1*, *CnE2F2* y *CnCDKA* (involucrados en la progresión de fases G1-S del ciclo celular), lo que coincide con su alto potencial de división celular. Posteriormente en la fase de pro-E los niveles de expresión de los genes *CnE2Fs* y *CnCDKA* disminuyeron comparado con el CE, hecho que podría deberse al inicio de la diferenciación celular para la formación de un embrión somático. La presencia de un gran número de células meristemáticas en las primeras fases del desarrollo del embrión somático de cocotero, ES globular (Saénz *et al.*, 2006), sugiere una alta actividad de división celular, que coincide con los altos niveles de expresión de los genes *CnE2F1*, *CnE2F2* y *CnCDKA*; posteriormente conforme madura el embrión disminuyen los niveles de expresión de estos genes, lo que podría deberse a una disminución de la actividad de división celular para su diferenciación celular. Los embriones germinados presentan el menor nivel de expresión de los genes *CnE2F1*, *CnE2F2* y *CnCDKA*, factor que podría deberse a la reducción de la división celular, ubicándose únicamente en los meristemas apicales (del brote y la radícula).

La aplicación de AG<sub>3</sub> durante el desarrollo de embriones somáticos de cocotero, además de favorecer la formación y germinación de embriones somáticos en cultivo *in vitro*, promovió la expresión del gen *CnE2F1* durante las diferentes etapas de maduración de los embriones somáticos (pro-E, ES globular, ES escutelar, ES germinados). En contraste, el gen *CnE2F2* incrementó su expresión en los proE y en ES escutelares; en el caso de ES globulares *CnE2F2* disminuyó

sus niveles de expresión comparado con el control. La expresión de *CnCDKA* en presencia de  $AG_3$  solamente se promueve en ES escutelares y germinados comparado con el control.

La adición de  $AG_3$  en tejido vegetativo estimula el alargamiento celular, sin embargo también parece activar la división celular. En dicho estudio se propone una respuesta del crecimiento inicial basado en la elongación celular del meristemo (en presencia de  $AG_3$ ), que promueve la formación de nuevas células (división celular), para su posterior elongación en respuesta a la presencia de ácido giberélico (Sauter & Kende, 1992). En el caso de cocotero durante el desarrollo de embriones somáticos se observó que la adición de  $AG_3$  estimuló la expresión de genes que intervienen en la regulación del ciclo celular, tanto en las primeras etapas (*CnE2F1* y *CnE2F2*) como en las últimas etapas del desarrollo (*CnE2F1* y *CnCDKA*), lo que sugiere que estos genes podrían estar formando parte de los elementos que contribuyen en la promoción del desarrollo y germinación de los embriones somáticos en presencia de  $AG_3$ .

En desviaciones embriogénicas del desarrollo se observó que en los CN, los embriones en fase escutelar con pérdida de conformación, así como en los embriones fusionados se presentaron menores niveles de expresión de los genes *CnE2F1*, *CnE2F2* y *CnCDKA* comparado con su contraparte (CE y ES escutelar) con desarrollo normal (tanto con  $AG_3$  como en el CTL), lo que sugiere que en estas estructuras, al perder su identidad de embrión, decae la expresión de genes que intervienen en la activación del ciclo celular (*CnE2Fs* y *CnCDKA*) y desarrollan una estructura amorfa. En el caso del embrión albino en fase escutelar se

incrementan los niveles de expresión del gen *CnE2F2* y los embriones albinos germinados presentan mayores niveles de expresión de los genes *CnE2Fs* y *CnCDKA* comparado con los embriones germinados que presentaron un desarrollo normal. Este hecho parece indicar que aunque visualmente los embriones albinos mantienen su identidad, a nivel molecular parece alterarse la expresión de genes que intervienen en la regulación del ciclo celular (*CnE2Fs* y *CnCDKA*) y al final este tipo de embriones no logra su conversión a plántula.

#### **4.4.2. Discusión de la germinación de embriones cigóticos**

Durante la germinación de embriones se ha observado que en etapas de maduración tardía, los embriones (somáticos y cigóticos) disminuyen la división celular (Komamine *et al.*, 1992; Schmidt *et al.*, 2006) y justo antes de la germinación se incrementa la división celular (Levi *et al.*, 1992; Che *et al.*, 2006). En algunos estudios se ha cuantificado el DNA en fase de maduración tanto en semillas ortodoxas como en semillas recalcitrantes, en las que en la mayoría de las células se observa un bloqueo en la fase G1. El autor sugiere que la detención del ciclo celular en la fase G1 puede ser de gran importancia fisiológica y, al parecer, este control del ciclo celular no está directamente ligado con el estatus del agua en la semilla, pero el nivel de ABA en la semilla puede jugar un papel importante en arrestar la actividad del ciclo celular (Bino, 1993)

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la expresión de *CnE2F1* y *CnCDKA* se incrementa al segundo día después de la imbibición en ausencia de AG<sub>3</sub>. La expresión del gen *CnE2F2* presenta un ligero aumento en el día 2 y un nivel más alto en el día 8. En cuanto a la expresión de *CnCDKA*

también se presenta el mayor nivel de expresión al día 8. Como se puede observar durante la germinación, el nivel de expresión de los genes *CnE2Fs* y *CnCDKA* se incrementa desde los primeros días de la imbibición del embrión y antes de la protrusión de la plúmula, sugiriendo que el adelanto en la expresión máxima de estos genes conforma uno de los eventos tempranos de la germinación en cocotero.

Como se ha mencionado previamente, las fitohormonas tienen un papel esencial en el metabolismo de la planta y son un factor que puede influir en la expresión de genes que intervienen en el control del ciclo celular. Durante la germinación de maíz (semilla ortodoxa), se ha reportado que la bencil adenina (una citocinina) acelera el proceso e incrementa el nivel de las proteínas PCNA y CDKA desde las primeras horas del proceso (antes de la protrusión visible de la raíz) comparado con el control (Cruz-García *et al.*, 1998; Sánchez *et al.*, 2005). En el caso de giberelinas, también se ha observado que acelera y favorece la germinación en muchas especies (Baskin & Baskin, 1975; Chin *et al.*, 1988). En semillas mutantes de tomate (*Gib-1*), deficientes de giberelinas, no germinaron ni activaron el ciclo celular (G1/S), sino hasta después de la adición externa de AG<sub>3</sub> en el medio de cultivo. La adición de AG<sub>3</sub> aparentemente es necesaria para activar el ciclo celular e iniciar la replicación del DNA durante la germinación (Liu *et al.*, 1997).

En el caso de cocotero, la aplicación de AG<sub>3</sub> aceleró e incrementó la germinación de embriones cigóticos *in vitro* y a nivel molecular adelantó y estimuló la expresión de *CnE2F2* y *CnCDKA* comparado con el control. En general, los resultados presentados en este trabajo sugieren que: el aumento de la expresión de *CnE2Fs* y *CnCDKA* es uno de los eventos

tempranos de la germinación en cocotero (antes de la protrusión de la plúmula); la adición externa de AG<sub>3</sub> durante la germinación *in vitro* de embriones cigóticos de cocotero indujo la expresión temprana de los genes *CnE2Fs* y *CnCDKA* involucrados en la progresión de fases G1/S del ciclo celular. Esto coincide con los resultados obtenidos por Ogawa y colaboradores (2003), cuyo análisis por microarreglos indicó que los genes relacionados con la transición de fases G1/S son expresados después de adicionar AG<sub>3</sub> a semillas mutantes de *Arabidopsis ga1-3* (mutantes deficientes de giberelinas).

En general en este estudio se observó que durante la germinación de embriones cigóticos de cocotero se presentaron cambios de la expresión de genes que intervienen en la transición de fases G1/S del ciclo celular, con niveles de expresión máxima en los primeros días de la germinación (antes de la protrusión de la plúmula), y la adición de AG<sub>3</sub> aceleró la expresión de estos genes durante el proceso. Estos resultados sugieren que AG<sub>3</sub>, además de adelantar y sincronizar la germinación de los embriones cigóticos, podría involucrar un adelanto en la activación del ciclo celular.

#### 4.5 Bibliografía

- Baskin JM, Baskin CC (1975). Growth of *Ruellia humilis* plants from embryos of chilled, GA<sub>3</sub> -treated and laboratory stored seeds. Bot. Gaz. 136:299-305.
- Bino RJ, Lanteri S, Verhoeven HA, Kraak HL (1993). Flow cytometric determination of nuclear replication stages in seed tissues. Ann. Bot. 72:181-187.
- Boer BGW, Murray JAH (2000). Triggering the cell cycle in plants, Trends Cell Biol. 10:245-250.
- Che P, Love TM, Frame BR, Wang K, Carriquiry AL, Howell SH (2006). Gene expression patterns during somatic embryo development and germination in maize Hi II callus cultures. Plant Mol. Biol. 62:1-14
- Chin HF, Krishnapillay B, Alang ZC (1988). Breaking dormancy in kentia palm seed by infusion technique. Pertanika 11:137-141.
- Cruz-Garcia F, Zúñiga JJ, Vázquez-Ramos JM (1998). Effect of stimulating maize germination on cell cycle proteins. Physiol. Plant 102:573-581.
- Eeuwens CJ (1976). Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera* L.) and cultured *in vitro*. Physiol Plant 36:23-28.
- Farnsworth E (2000). The ecology and physiology of viviparous and recalcitrant seeds. Ann. Rev. Ecol. System. 31:107-138.
- Francis D, Sorrell DA (2001). The interface between the cell cycle and plant growth regulators: a mini review. Plant Growth Regul. 33:1-12.
- Fukuda H, Ito M, Sugiyama M, Komamine A (1994). Mechanisms of the proliferation and differentiation of

- plant cells in cell culture systems. *Int. J. Dev. Biol.* 38:287-299.
- Gutiérrez R, Quiroz-Figueroa F, Vázquez-Ramos JM (2005). Maize Cyclin D2 expression, associated kinase activity and effect of phytohormones during Germination. *Plant Cell Physiol.* 46:166–173
  - Halperin W, Wetherell DF (1964). Adventive embryos in tissue cultures of the wild carrot *Daucus carota*. *Am. J. Bot.* 51:274-283.
  - Hemerly AS, Ferreira PCG, Van Montagu M, Engler G, Inzé D (2000). Cell division events are essential for embryo patterning and morphogenesis: studies on dominant-negative *cdc2aAt* mutants of *Arabidopsis*. *The Plant J.* 23:123-130.
  - Herrera Isidró L (2000). RT-PCR en el diagnóstico del virus de la tristeza de los cítricos (CVT). Tesis de Doctorado. Centro de Investigación de Estudios Avanzados del IPN, Unidad Irapuato, México, 2000.
  - Inze D (2005). Green light for the cell cycle. *The EMBO J.* 24:657-662.
  - Jürgens G, Mayer U (1994). *Arabidopsis*. In: Bard JBL (ed), embryos. *Colour Atlas of Development*. Wolfe Publishing, London, UK, pp. 7-21.
  - Komamine A, Kawahara R, Matsomoto M, Sunabori S, Toya T, Fujiwara A, Tsukahara M, Smith J, Ito M, Fukuda H, Nomura K, Fujimura T (1992). Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures: Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology. *In vitro Cell. Dev. Biol.* 28P:11-14.
  - Levi M, Pasini E, Brusa P, Chiatante D, Sgorbati S, Sparvoli E (1992). Culture of pea embryo axes for studies on the reactivation of the cell cycle at germination. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 28P:20-24.

- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) Method. *Methods* 25:402-408.
- Liu Y, Hilhorst HWM, Groot SP, Bino RJ (1997). Amount of nuclear and Internal Morphology of Gibberellin- and Abscisic Acid deficient tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) seed during maturation, imbibition and germination. *Ann. Bot.* 79:161-168.
- Mansfield SG, Briarty LG (1991). Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* II. The developing embryo. *Can. J. Bot.* 69:447-476.
- Meinke DW (1995). Molecular genetics of plant embryogenesis. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46:369-394.
- Ogawa M, Hanada A, Yamauchi Y, Kuwahara A, Kamiya Y, Yamaguchi S (2003). Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination. *The Plant Cell* 15:1591-1604.
- Pech y Aké A, Maust B, Orozco Segovia A, Oropeza C (2007). Effect of gibberellic acid on the *in vitro* germination of coconut zygotic embryos and their conversion into plantlets. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 43:247-253.
- Pérez-Núñez MT, Chan JL, Sáenz L, González T, Verdeil JL, Oropeza C (2006). Improved somatic embryogenesis from *Cocos nucifera* (L.) plumule explants. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 42:37-43
- Saénz L, Azpeitia A, Chuc-Armendariz, Chan JL, Verdeil JL, Hocher V, Oropeza C (2006). Morphological and histological changes during somatic embryo formation from coconut plumule explant. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 42:19-25.

- Sánchez MP, Gurusinghe SH, Bradford KJ, Vázquez JM (2005). Differential response of PCNA and Cdk-A proteins and associated kinase activities to benzyladenine and abscisic acid during maize seed germination. *J. Exp. Bot.* 56: 515-523.
- Sauter M, Kende H (1992). Gibberellin-induced growth and regulation of the cell division cycle in deepwater rice. *Planta* 188:362-368.
- Schmidt Th, Ewald A, Seyring M, Hohe A (2006). Comparative analysis of cell cycle events in zygotic and somatic embryos of *Cyclamen persicum* indicates strong resemblance of somatic embryos to recalcitrant seeds. *Plant Cell Rep.* 25:643-650.
- Schwendiman J, Pannetier C, Michaux-Ferrière N (1990). Histology of embryogenic formation during *in vitro* culture of oil palm *Elaeis guineensis* Jacq. *Ol.* 45:409-418.
- Sherr CJ and Roberts JM (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes and Dev.* 13:1501-1512.
- Stasolla C, Loukanina N, Ashihara H, Yeung EC, Thorpe TA (2003). Pyrimidine deoxyribonucleotide metabolism during maturation and germination of white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos: metabolic fate of C-labelled cytidine, deoxycytidine and thymidine. *Physiol. Plant.* 118:499-506.
- Tsukahara M, Komamine A (1997). Separation and analysis of cell type involved in early stages of carrot somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 47:145-151.
- Vázquez-Ramos JM, Sánchez P (2003). The cell cycle and seed germination. *Seed Sci. Res.* 13:113-130.
- Verdeil JL, Hocher V, Huet C, Grosdemange F, Escoute

**J, Ferriere N, Nicole M (2001). Ultrastructural Changes in Coconut Calli Associated with the Acquisition of Embryogenic Competence. Ann. Bot. 88:9-18.**



## CAPÍTULO 5

### 5.1. Estudio de la expresión de los genes *CnKNOX* durante la formación y germinación de embriones de cocotero

Los genes homeóticos fueron identificados primero en *Drosophila* y son genes reguladores claves del patrón de formación y diferenciación morfológica en los organismos multicelulares; estos genes están ahora bien caracterizados en plantas como maíz, *Arabidopsis* y arroz (Hake *et al.*, 2004). La característica estructural conservada en los genes homeóticos es que poseen un dominio de aproximadamente 60 aminoácidos, el llamado homeodominio, a través del cual interaccionan con secuencias específicas de ADN. El primer gen de este tipo descubierto en plantas fue el gen *knotted* de maíz (*kn 1*). Este y los genes relacionados pertenecen a la familia de proteínas KNOX (KNOTTED1-like homeobox). Las proteínas KNOX, además del homeodominio, presentan dos regiones conservadas adicionales: el dominio ELK y el dominio KNOX, ambos ubicados en la región amino terminal de la proteína (Sakamoto *et al.*, 1999).

Los genes *KNOX* están divididos en dos clases, con base a sus secuencias y patrones de expresión. Los genes *KNOX* de clase I son expresados en tejidos meristemáticos, mientras que la expresión de los genes *KNOX* de clase II se encuentra en todos los órganos (Hake *et al.*, 2004). En diversas especies se ha identificado que los miembros de la familia *KNOX* son expresados diferencialmente en la embriogénesis y durante el desarrollo post-embriogénico, tienen un efecto cooperativo en la formación y mantenimiento del meristemo

apical de brotes e inflorescencias, estructuras responsables de desarrollar las partes aéreas de las plantas (Sentoku *et al.*, 1999, Vollbrecht *et al.* 2000; Hake *et al.* 2004).

*KNOTTED1* (*ZmKN1*) de maíz mostró tener un papel esencial en la formación y mantenimiento del meristemo apical (Vollbrecht *et al.* 1991; Kerstetter *et al.* 1997; Long *et al.* 1996). La mutación de genes *KNOX* como *ZnKN1* y *SHOOTMERISTEMLESS* (*STM*) de *Arabidopsis* resulta en plantas que carecen del meristemo apical del brote. El gen *EgKNOX* de clase I aislado de palma aceitera también parece estar involucrado en el desarrollo temprano de hojas (meristemo), así como en el control de un grupo de células madre de la región meristemática ubicada en el ápice de la planta (Jouannic *et al.*, 2007). La sobreexpresión de *ZnKN1*, *STM* y *EgKNOX* reduce la diferenciación celular y genera estructuras meristemoides en la vecindad de venas en hojas (Smith *et al.* 1992; Sinha *et al.* 1993, Jouannic *et al.*, 2007). Su sobreexpresión en diferentes especies de plantas altera la diferenciación celular originando cambios en toda la arquitectura de la planta, generando fenotipos morfológicamente parecidos a plantas que exhiben un desorden hormonal de citocininas y giberelinas (Hareven *et al.*, 1996; Tamaoki *et al.*, 1997; Frugis *et al.*, 2001; Hake *et al.*, 2004).

Durante la embriogénesis cigótica de *Arabidopsis* el gen *STM* de la familia *KNOX* I juega un papel importante en el establecimiento del meristemo apical del embrión al mantener a estas células en un estado indiferenciado (Laux *et al.*, 2004). En el caso de la embriogénesis somática diversos estudios han mostrado que los genes de la familia *KNOX 1* juegan un papel importante. Por ejemplo, se ha visto que en cultivos *in vitro* de

soya durante la transición de estadio acorazonado a torpedo, el gen *Sbh1*, con una alta homología al gen *kn1* de maíz, incrementa su expresión de manera significativa (Ma *et al.*, 1994). Durante la formación de los embriones somáticos de maíz el gen *kn1* se detectó a lo largo del desarrollo, especialmente en la región del meristemo apical, similar a lo que ocurre durante la embriogénesis cigótica (Zhang *et al.*, 2002). En cultivos *in vitro* del híbrido EMB-2 (*Helianthus annuus*-*H. tuberosus*), el gen *HtKNOT1* presenta niveles de expresión elevados en aquellos tejidos que inician y/o presentan el desarrollo del meristemo apical como son los embriones somáticos (Chiappetta *et al.*, 2006). En palma aceitera (*Aracaceae*) se expresa de manera importante *EgKNOX1* a lo largo del desarrollo de los embriones somáticos obtenidos a partir de células en suspensión (Jouannic *et al.*, 2007). También se ha reportado que la sobreexpresión de genes de la familia KNOX I promueve la formación de embriones somáticos en *Picea abies* (Belmonte *et al.*, 2007).

En *Cocos nucifera* se han aislado genes que presentan una alta homología con la familia KNOX 1, denominados *CnKNOX1* y *CnKNOX2* (Oropeza, datos no publicados). El primero codifica una proteína que presenta una alta identidad con la proteína *EgKNOX*, un gen de clase I (Jouannic *et al.* 2007). En este proyecto se estudió la expresión de los genes *CnKNOX1* y *CnKNOX2* durante la formación de embriones somáticos de cocotero. Debido a que en estos momentos es complicado el estudio de la germinación de ES por la asincronía del sistema, este proceso se estudió en embriones cigóticos de cocotero, y podría servir como marco de referencia para la germinación de embriones somáticos. El estudio de la formación y germinación de embriones se realizó en presencia y ausencia de ácido giberélico, en la primera condición se

emplearon concentraciones de AG<sub>3</sub> que favorecen tanto la formación de embriones somáticos como la germinación de embriones cigóticos.

## **5.2 Materiales y métodos**

### **5.2.1. Desarrollo de embriones somáticos**

Se empleó una línea de callos embriogénicos de la variedad Alto del Pacífico obtenidos por el protocolo de multiplicación de callo embriogénico de acuerdo a lo reportado por Pérez-Nuñez *et al.*, 2006 (ver materiales y métodos capítulo anterior) para la generación de embriones somáticos. Las condiciones de cultivo durante la embriogénesis somática consisten de dos etapas. La etapa I involucra la fase de formación de callo embriogénico, en la que se emplea el medio de cultivo Y3 de acuerdo a Eeuwens (1976), adicionado con sacarosa (50 g l<sup>-1</sup>), gelrite (3 g l<sup>-1</sup>), carbón activado (2.5 g l<sup>-1</sup>) y 600 μM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Todos los explantes fueron cultivados en frascos de vidrio con capacidad de 35 ml conteniendo 10 ml de medio de cultivo y en condición I, que consiste en un periodo de oscuridad durante tres meses a 27 ± 2 °C.

La etapa II comprende la formación de embriones somáticos; en esta etapa se emplea el medio de cultivo II (medio Y3) con sacarosa (50 g l<sup>-1</sup>), gelrite (3 g l<sup>-1</sup>), carbón activado (2.5 g l<sup>-1</sup>), 6 μM de 2,4-D y 300 μM de 6-bencilaminopurina (6-BAP). Todos los callos embriogénicos fueron cultivados en frascos de 100 ml, conteniendo 30 ml de medio de cultivo, en condición II en fotoperiodo de 16 h de iluminación (45-60 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> ppfd)/ 8 h de oscuridad a 27 ± 2 °C y con subcultivos cada dos meses. El protocolo se modificó

adicionando en el medio II AG<sub>3</sub> a la concentración de 0.5  $\mu$  M. Los CE en el medio II condición II se dejaron durante 150 días con resiembras cada dos meses. A lo largo de este período se aislaron embriones en los diferentes estadios: preglobular, globular, escutelar y germinado; posteriormente se congelaron en N<sub>2</sub> líquido y se conservaron a -80 °C para su análisis posterior.

### **5.2.2. Germinación de embriones cigóticos**

Se emplearon embriones cigóticos de *Cocos nucifera L.*, los cuales fueron cultivados *in vitro* en medio Y3 con 0.3% de gelrite sin reguladores de crecimiento de acuerdo a las condiciones reportadas por Pech y Ake *et al.*, (2007) para su germinación (utilizando una concentración óptima de 4.6  $\mu$  M de AG<sub>3</sub>). Se realizaron muestreos cada dos días (3 réplicas) desde el día cero hasta el día 20 después de la imbibición. Los embriones cigóticos se congelaron en N<sub>2</sub> líquido y se conservaron a -80 °C para su análisis posterior.

### **5.2.3 Extracción de ácidos nucleicos y síntesis de ADN complementario**

El ARN se extrajo siguiendo la metodología descrita por Herrera (2000); la síntesis de ADN complementario se realizó utilizando una transcriptasa reversa (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del proveedor. Ambos métodos han sido descritos en el capítulo anterior (ver sección 4.2.3 y 4.2.4).

#### 5.2.4 Amplificación por PCR-Tiempo Real

Para la amplificación se utilizaron 4  $\mu$ L de la mezcla de la retrotranscripción (ADNc), 25  $\mu$ L de la mezcla de Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen), 2  $\mu$ L de la mezcla del cebador sentido y antisentido (10  $\mu$ M cada uno) y 1  $\mu$ L de colorante de referencia FAM. Las muestras se sometieron a una temperatura de 50 °C por 2 min, posteriormente se elevó la temperatura a 72 °C por 2 min, después se programaron 35 ciclos en las condiciones que se especifican en el Cuadro 5.1 (para cada gen amplificado) y para finalizar, el programa se mantuvo a 72 °C por 10 min. El equipo empleado para el PCR-Tiempo Real fue una termocicladora marca iCycler BIO-RAD. Después del último ciclo del PCR-Tiempo Real, se realizó la curva de disociación para verificar la amplificación de un solo producto. Los valores de intensidad estuvieron basados en la incorporación del colorante fluorescente SYBR® Green (excitación 497, emisión 520nm; Pruebas moleculares) hacia los productos del PCR de doble cadena y que fueron medidos por el equipo iCycler BIO-RAD. Todos los genes fueron normalizados con los niveles de expresión del gen que codifica para la subunidad ribosomal 18S.

**Cuadro 5.1** Secuencias de cebadores utilizados para la amplificación de genes del estudio de Tiempo Real-PCR.

Genes	Secuencias de cebadores	Tamaño de amplificación
<i>CnKNOX1</i>	Cebador sentido 5'-CCCCAAACCCAGAGCTAAAA-3'	416 pb
	Cebador antisentido 5'-TTGCCTTGATGATGCTGTCA-3'	
<i>CnKNOX2</i>	Cebador sentido 5'-CAGTTCGCCCTCATGGAA-3'	173 pb
	Cebador antisentido 5'-CACATGAGCACCAAAGGAG-3'	
Subunidad ribosomal 18S	Cebador sentido 5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3'	186 pb
	Cebador antisentido 5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'	

La normalización se realizó mediante la expresión del gen de la subunidad ribosomal 18S como estándar interno. Los cálculos fueron realizados con base a lo reportado por Livak y Schmittgen (2001), donde el cálculo del  $\Delta Ct$  se refiere a la resta del valor umbral (Ct) de la muestra con respecto al valor umbral del gen normalizador ( $\Delta Ct = Ct$  del gen a estudiar -  $Ct$  del gen normalizador). Posteriormente se determina el  $\Delta Ct$  más alto del gen de interés y se le denomina  $\Delta Ct$  de la línea base. Este valor es restado a los valores de  $\Delta Ct$  obtenidos del gen de interés ( $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  del gen de interés -  $\Delta Ct$  de la línea base), finalmente los niveles de expresión relativa se obtuvieron de la fórmula  $URE = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Los resultados fueron

expresados en Niveles de Expresión Relativa (NER). Los niveles de expresión relativa durante el desarrollo de embriones somáticos son con base en la expresión del Embrión Somático Germinado (CTL) para cada gen. En el caso de la germinación de embriones cigóticos, los niveles de expresión son con base al día cero.

### **5.3. Resultados**

#### **5.3.1 Comparación de secuencias deducidas de aminoácidos**

En esta sección se puede observar en la Figura 5.1 que las secuencias deducidas de aminoácidos CnKNOX1 y CnKNOX2 conservan el dominio KNOX, el dominio ELK y el homeodominio de las proteínas tipo KNOX.

La alineación de las secuencias deducidas de aminoácidos tipo KNOX; AtSTM, CnKNOX1, CnKNOX2, EgKNOX1, Os\_OSH6 y Zm\_liguleless3 (Figura 5.1) reveló que la secuencia CnKNOX1 presentó valores de 96% y 64% de similitud con las secuencias completas de clase I, EgKNOX1 y AtSTM respectivamente. Al alinear las secuencias que abarcan las regiones de los dominios (KNOX, ELK y el homeodominio), se elevaron los valores de similitud de la secuencia CnKNOX1 con las proteínas EgKNOX1 y AtSTM (ver Cuadro 5.2).

La secuencia completa deducida de aminoácidos CnKNOX2 presentó mayores valores de similitud con las proteínas KNOX de clase II (Zmliguleless3 y OsOSH6) que con las proteínas KNOX de clase I (EgKNOX1 y AtSTM), ver Cuadro 5.2.

```

Zm_liguleless3 -----MEDLYS H E G I R V--
Os_OSH6 -----MEDLYS H E G I R--
CnKNOX2 -----MEDLYS H E G I GSGE
EgKNOX1 -----MVSQYTSRTDRQIAREMEGRGGSGGGDNSGLNGG-FSDGSGSLSPLMMLM SR--
CnKNOX1 -----MEGRGGSG--DNSGLNGG-FGDGSGSLSPLMMLM SR--
AtSTM MESGSNSTSCPHAFAGDNSDGPNCPMHMHPPIMTSHQHGHNDHQHQQZHDGYATQSHRQQSSSLFQSLA P Q I T K K

```

```

Zm_liguleless3 ---VGGAA-----EAS---VAGGAGGFPSPDLTELMKACIASHFRPPLSAYIE RRVGAPRHVTSLEEFVSR-
Os_OSH6 ---VGGAA-----EASGVGVVYGGGGSSSDLTLEMKACIASHFRPPLSAYIE RRVGAPREVAELKEIGR-
CnKNOX2 IAAVGTSSYPYFEADRSHSGGAAEAISDISGGGSDLTLEMKACIASHFRPPLSAYIE RRVGAPREVAELKEIGR-
EgKNOX1 --PVLPTPHMSNNGFLPLPPLSNAA-----ZDYDNTIKAKIMAHFQYPRLSAYIN RRVGAPREVAELKEIGR-
CnKNOX1 --SVLPTPHMSNNGFLPLPPPSNAG-----EDYDSTIKAKIMAHFQYPRLSAYIN RRVGAPREVAELKEIGR-
AtSTM VASSSSPSCAPAYSLMEIHNHIVAGINPCSSSSSSSIVYAKIMAHFHRLLAAYIN RRVGAPREVAELKEIGR-

```

#### DOMINIO-KNOX

```

Zm_liguleless3 -----ERRPDG---A SEI VDFELDEPMDAYCRVWRKKEILTRPFDEAASFSSQAQLSDICSGG-SSP-AATA
Os_OSH6 -----ERRAGGGGGGQI VDFELDEPMEAYCRVWRKKEILSRPFDEAASFSSQTLSNICSQA-TSFPAITA
CnKNOX2 -----RRYTSG---SEI VDFELDEPMEAYCRVWRKKEILSKPFDEAASFINSLEVLSNICKCYTSSSTTTA
EgKNOX1 SLHMGRASSSSAAAGDGGSGGGEDPDLQFMAYCEMLTKTEQELSKPKKAMLELSRDAFKSLSIST--PPFPQVY
CnKNOX1 SLHMGRASSSSAAAGDGGSGGGEDPDLQFMAYCEMLTKTEQELSKPKKAMLELSRDAFKSLSIST--PPFPQVY
AtSTM -----SAAAAASMGPTCL EDEELQFMAYCEMLTKTEQELSKPKKAMVLELQRTECFKSLSISS--PSSFSGY

```

#### DOMINIO-ELK

```

Zm_liguleless3 T---HSDDMVSSSEDEQCSDGTDVDFDMGQEHSSHLGQ ELKEMLLKYSGLSRLNSEFLKRRKKGKLPKQARTVLELW
Os_OSH6 T---HSDENVSSSEDEQCSDGTDMLDQGQSSRLAD ELKEMLLKYSGLSRLNSEFLKRRKKGKLPKQABALLW
CnKNOX2 TGNSPDEVVGSSEELSCGDVDASES-QESGRLAD ELKEMLLKYSGLSRLNREFLKRRKKGKLPKQARTLLDW
EgKNOX1 GEQLE---RNGSSEEB-----FGASENYVDFQAED ELKGQLLKYSGLSRLNREFLKRRKKGKLPKQARQLLDW
CnKNOX1 GEQLE---RNGSSEEB-----FGASGSYVDFQAED ELKGQLLKYSGLSRLNREFLKRRKKGKLPKQARQLLDW
AtSTM GETALDRNNGSSEEB-----YDHNNEFYVDFQAED ELKGQLLKYSGLSRLNREFLKRRKKGKLPKQARQLLDW

```

#### HOMEODOMINIO

```

Zm_liguleless3 NTHYKWPYFEEFVRLAARTGLDFQINNWFINQRKRHWKPEEDVRFALMEG-----VAGGSSSTLYFCTGTIGP-
Os_OSH6 NTHYKWPYFEEFLALARTGLDFQINNWFINQRKRHWKPEEDVRFALMEG-----VAGGSSSTLYFCTGTIGP-
CnKNOX2 NTHYKWPYFEEFVRLAARTGLDFQINNWFINQRKRHWKPEEDVRFALMEG-----VAGGSSSTLYFCTGTIGP-
EgKNOX1 NTHYKWPYFEEFVRLAARTGLDFQINNWFINQRKRHWKPEEDVRFALMEG-----VAGGSSSTLYFCTGTIGP-
CnKNOX1 NTHYKWPYFEEFVRLAARTGLDFQINNWFINQRKRHWKPEEDVRFALMEG-----VAGGSSSTLYFCTGTIGP-
AtSTM SRHYKWPYFEEFVRLAARTGLDFQINNWFINQRKRHWKPEEDVRFALMEG-----VAGGSSSTLYFCTGTIGP-

```

**Figura 5.1. Alineamiento de secuencias deducidas de aminoácidos de diferentes genes KNOX. EgKNOX;** secuencia de *Elaeis guineensis* (GenBank ABI74672.1), **AtSTM;** secuencia de *Arabidopsis thaliana* (Genbank NP176426.1), **CnKNOX1** y **CnKNOX2;** secuencia de *Cocos nucifera* L, **Zmliguleless;** secuencia de *Zea mays* (Genbank AAD13611.1), **OsOSH6;** secuencia de *Oryza sativa* (Genbank BAA79224.1). Las secuencias fueron alineadas empleando el programa CLUSTALW.

**Cuadro 5.2 Porcentaje de identidad de las secuencias deducidas de aminoácidos de diferentes genes *KNOXs*.** La comparación de las secuencias se realizó considerando a la proteína completa (a) y la región de la secuencia que contiene el homeodominio, el dominio ELK y el dominio *KNOX* (b).

	EgKNOX1 clase I		AtSTM clase I		Zmliguleless3 clase II		OsOSH6 clase II	
	a	b	a	b	A	b	a	b
CnKNOX1	96%	98%	64%	78%	43%	51%	45%	54%
CnKNOX2	42%	52%	42%	51%	71%	73%	70%	74%

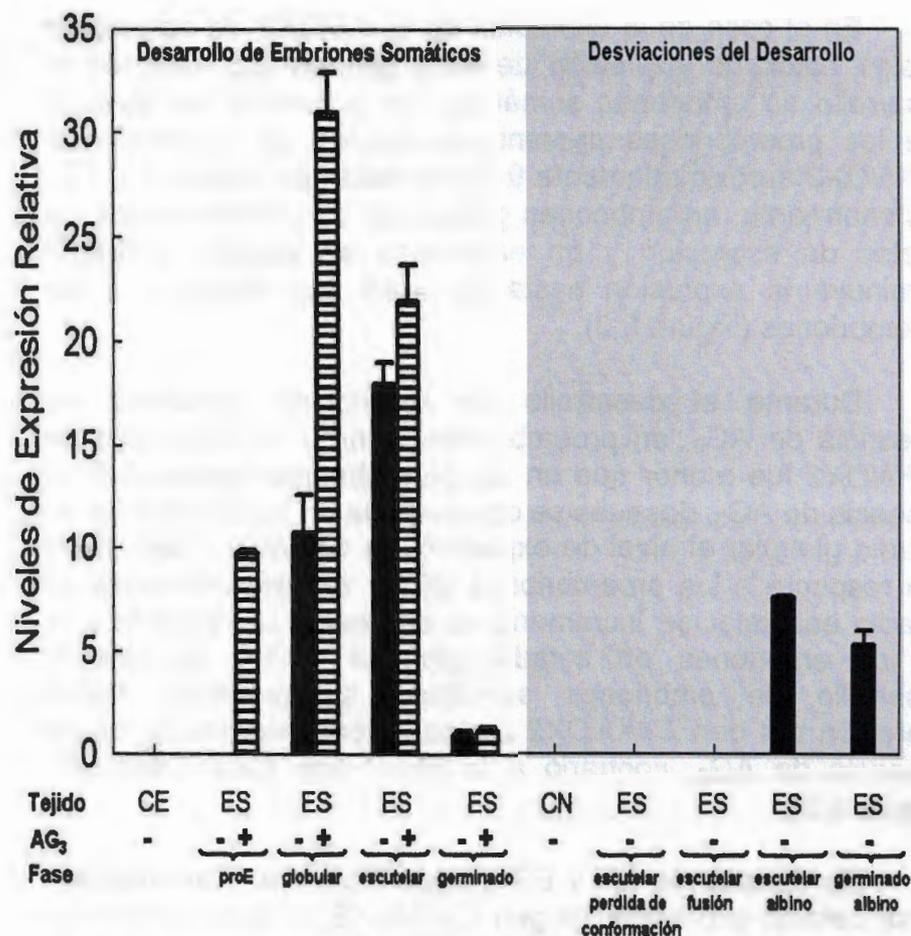
### 5.3.2 Expresión de los genes *CnKNOX* durante el desarrollo de embriones somáticos de cocotero

En este estudio se analizó la expresión de los genes *CnKNOX1* y *CnKNOX2* durante el desarrollo de embriones somáticos de cocotero en ausencia y presencia de AG<sub>3</sub>; se empleó la concentración de 0.5 μM de AG<sub>3</sub>, que favorece la formación y germinación de ES. Es importante mencionar que también se estudió la expresión de los genes *CnKNOXs* en desviaciones del desarrollo, es decir, tejido no deseado durante la embriogénesis somática (callo no embriogénico; CN y/o ES que presentan aberraciones).

En la expresión del gen *CnKNOX1* (Figura 5.2) durante la embriogénesis somática los CE no presentaron la expresión de este gen; por otro lado, en la fase de proembrión solamente se detectó la expresión de *CnKNOX1* en los proembriones generados en presencia de AG<sub>3</sub>. En el caso de embriones en fase globular se incrementaron los niveles de expresión de *CnKNOX1* comparado con la fase de proembrión, tanto en presencia como en ausencia de AG<sub>3</sub> en la fase escutelar la expresión de *CnKNOX1* disminuyó (CTL y AG<sub>3</sub>). Al comparar la expresión del gen *CnKNOX1* durante el desarrollo de

embriones somáticos en presencia y ausencia de AG<sub>3</sub>, los niveles de expresión siempre fueron mayores en presencia de AG<sub>3</sub> con respecto al control. En el caso de embriones somáticos germinados (CTL y AG<sub>3</sub>), los niveles de expresión de *CnKNOX1* fueron los más bajos comparado con las diferentes fases de desarrollo de ES.

En el caso de CN, en ES que perdieron su conformación, así como en embriones fusionados, no se detectó expresión de *CnKNOX1* (Figura 5.2). En el caso de embriones somáticos albinos, tanto en la fase escutelar como germinados, se detectaron niveles de expresión del gen *CnKNOX*; sin embargo, en embriones albinos en fase escutelar, el nivel de expresión de *CnKNOX1* es menor comparado con los embriones escutelares que tienen un desarrollo normal (Figura 5.2). En el caso del embrión somático germinado, se tiene un nivel de expresión de *CnKNOX1* de hasta 4 veces más con respecto a los embriones germinados (normales).

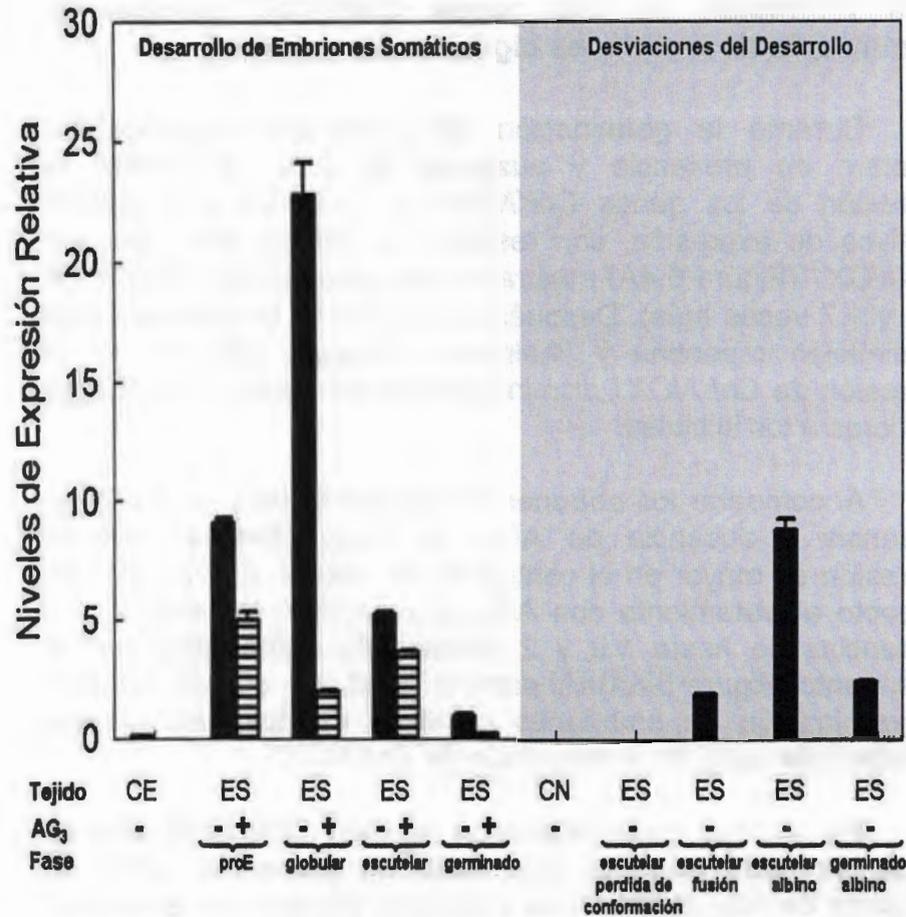


**Figura 5.2** Expresión de *CnKNOX1* durante el desarrollo normal de embriones somáticos así como en desviaciones del desarrollo (tejido no deseado para la formación de plantas). Expresión de *CnKNOX1* durante las diferentes fases de maduración del embrión somático (proembrión, globular, escutelar), en embriones germinados, así como en tejido no deseado para la regeneración de plantas (callo no embriogénico, embriones fusionados, embriones albinos). Presencia de  $0.5 \mu\text{M}$  de  $\text{AG}_3$  (+) y ausencia de  $\text{AG}_3$  (-). Callo embriogénico (CE), proembrión (proE), embrión somático (ES), callo no embriogénico (CN), ácido giberélico ( $\text{AG}_3$ ).

En el caso de la expresión de *CnKNOX2*, se detectaron niveles bajos de expresión de este gen en CE. Durante el desarrollo de embriones somáticos en el control, se observó que los proembriones presentaron niveles de expresión de *CnKNOX2* aproximadamente 9 veces más con respecto a CE; posteriormente, en embriones globulares se incrementaron los niveles de expresión y en embriones en estadio escutelar disminuyó la expresión hasta la mitad con respecto a los proembriones (Figura 5.3).

Durante el desarrollo de embriones somáticos en presencia de AG<sub>3</sub>, en proembriones el nivel de expresión de *CnKNOX2* fue menor que en los proembriones generados en ausencia de AG<sub>3</sub>, después se observó que en los embriones en estadio globular el nivel de expresión de *CnKNOX2* disminuyó con respecto a los proembriones (AG<sub>3</sub>); en los embriones en estadio escutelar se incrementó la expresión comparada a la de los embriones en estadio globular (AG<sub>3</sub>). Durante el desarrollo de embriones somáticos se presentó mayor expresión del gen *CnKNOX2* en los embriones generados en ausencia de AG<sub>3</sub>, contrario a lo observado para *CnKNOX1* (Figura 5.3).

En el caso de CN y ES que perdieron su conformación no se detectó expresión del gen *CnKNOX2*, pero en embriones fusionados, ES albinos y ES albinos germinados se observó la expresión del gen *CnKNOX2* (Figura 5.3). Por otro lado, se puede observar que los niveles de expresión del gen en el ES fusionado y en el albino fue menor con respecto a los ES con un desarrollo normal (en control y en presencia de AG<sub>3</sub>). En el caso del ES albino germinado, el nivel de expresión es más elevado con respecto a los ES germinados (normales), tanto en el control como en presencia de AG<sub>3</sub> (Figura 5.3).



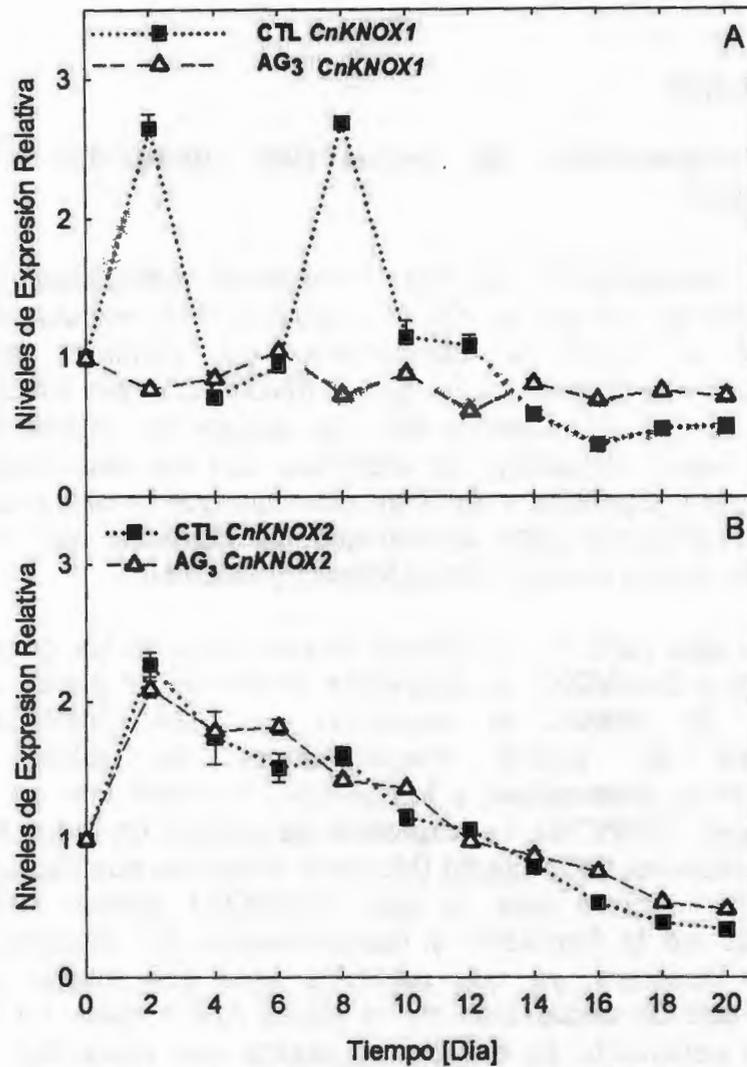
**Figura 5.3** Expresión de CnKNOX2 durante el desarrollo normal de embriones somáticos así como en desviaciones del desarrollo (tejido no deseado para la formación de plantas). Expresión de CnKNOX2 durante las diferentes fases de maduración del embrión somático (proembrión, globular, escutelar), en embriones germinados, así como en tejido no deseado para la regeneración de plantas (callo no embriogénico, embriones fusionados, embriones albinos). Presencia de 0.5  $\mu$  M de AG<sub>3</sub> (+) y ausencia de AG<sub>3</sub> (-). Callo embriogénico (CE), proembrión (proE), embrión somático (ES), callo no embriogénico (CN), ácido giberélico (AG<sub>3</sub>).

### 5.3.3 Expresión de los genes *CnKNOX1* durante la germinación de embriones cigóticos de cocotero

Durante la germinación de embriones cigóticos de cocotero en presencia y ausencia de AG<sub>3</sub> se analizó la expresión de los genes *CnKNOX1* y *CnKNOX*. Los niveles relativos de expresión, con respecto al tiempo cero, del gen *CnKNOX1* (Figura 5.4A) mostraron dos picos en los días 2 y 8 (1.6 y 1.7 veces más). Después, en el día 10 se presentó una disminución repentina y finalmente después del día 12 la expresión de *CnKNOX1* disminuyó gradualmente hasta niveles inferiores a los iniciales.

Al comparar los patrones de expresión de *CnKNOX1* en presencia y ausencia de AG<sub>3</sub>, se pudo observar que la expresión es mayor en el control en los días 2, 8, 10 y 12 con respecto al tratamiento con AG<sub>3</sub>, presentando los días 2 y 8 diferencias de hasta 1.9 y 2 veces más comparado con el tratamiento (Figura 5.4A). Al parecer la adición de AG<sub>3</sub> durante la germinación de embriones cigóticos mantuvo los niveles iniciales (día cero) de la expresión de *CnKNOX1*.

En el caso de la expresión del gen *CnKNOX2* (Figura 5.4B), se pudo observar que tanto en presencia como en ausencia de AG<sub>3</sub> el patrón de expresión *del gen* fue el mismo, presentando un incremento de los niveles de expresión en el día 2 y posteriormente se observó una disminución paulatina de la expresión, presentando en los días 14 hasta el día 20 niveles de expresión menores al del día cero.



**Figura 5.4** Expresión relativa de los genes *CnKNOXs* durante la germinación de embriones cigóticos de cocotero en presencia y ausencia de AG<sub>3</sub>. (A) Expresión relativa del gen *CnKNOX1*. (B) Expresión relativa *CnKNOX2*.

## 5.4. Discusión

### 5.4.1 Comparación de secuencias deducidas de aminoácidos

La comparación de las secuencias completas de aminoácidos de los genes *KNOX* mostró que las secuencias *CnKNOX1* y *CnKNOX2* conservaron los dominios que caracterizan a la familia de los genes *KNOX* (Dominio *KNOX*, Dominio *ELK* y Homeodominio). La secuencia *CnKNOX1* presentó mayor porcentaje de identidad con las secuencias *KNOX* clase I (*EgKNOX* y *AtSTM*), mientras que la secuencia *CnKNOX2* presenta altos porcentajes de identidad con las secuencias *KNOX* clase II (*Zmliguleless3* y *OsOSH6*).

Por otra parte se caracterizó la expresión de los genes *CnKNOX1* y *CnKNOX2* en diferentes partes de la planta de cocotero, se detectó la expresión del gen *CnKNOX1* únicamente en tejidos meristemáticos de tallos e inflorescencias (masculinas y femeninas), mientras que en el caso del gen *CnKNOX2*, la expresión se detectó en todas las partes analizadas de la planta (Montero, datos no publicados). Lo anterior sugiere que el gen *CnKNOX1* podría estar involucrado en la formación y mantenimiento del meristemo apical en cocotero, ya que presenta altos porcentajes de identidad con las secuencias de los genes *KNOX* clase I y su expresión solamente se detecta en tejidos que presentan el desarrollo de tejidos meristemáticos (tallo y flores).

#### 5.4.2 Desarrollo de embriones somáticos de cocotero.

En la embriogénesis el evento más importante es el establecimiento del patrón básico del cuerpo del embrión, en el que se desarrolla el meristemo apical de tallo y raíz. Por consiguiente, la elucidación de los mecanismos de formación y mantenimiento del meristemo apical de tallo es un punto fundamental de investigación en el desarrollo de la planta (Clark, 2001a y b). Diversos estudios moleculares revelan que los genes KNOX juegan un papel importante desde la embriogénesis temprana, en la formación y mantenimiento del meristemo apical de tallo (Reiser *et al.*, 2000), particularmente los genes KNOX de clase I, cuya expresión se detecta en el meristemo apical del brote.

En cultivo *in vitro* la expresión del gen *HtKNOT1* (gen KNOX de clase I), se detectó en niveles elevados en aquellos tejidos que inician y/o presentan el desarrollo del meristemo apical, embriones somáticos (Chiappetta *et al.*, 2006). En cocotero se detectó la expresión del gen *CnKNOX1* de clase I únicamente en tejidos que desarrollan el meristemo apical en cultivo *in vitro*, detectándose su expresión en embriones con desarrollo normal (desde la fase de proE hasta la escutelar y en ES germinados) y en embriones albinos, con un nivel de expresión menor que los embriones con desarrollo normal. En el caso del gen *CnKNOX2* clase II su expresión se detecta tanto en tejidos que desarrollan el meristemo apical (ES), así como en estructuras que carecen del meristemo apical (CE y en ES en fase escutelar fusionados). Lo anterior sugiere que el gen *CnKNOX1* podría servir como un gen marcador del desarrollo del meristemo apical durante la embriogénesis somática de cocotero.

En cocotero los embriones somáticos desarrollados bajo condiciones que promueven la formación y germinación de ES (adición de AG<sub>3</sub> en el medio de cultivo) presentaron mayores niveles de expresión del gen *CnKNOX1* (clase I) comparado con el control, mientras que el gen *CnKNOX2* (clase II) presentó un comportamiento inverso. Recientemente se ha sugerido que los factores de transcripción KNOX regulan el balance de múltiples fitohormonas y éstas a su vez también pueden activar la expresión de los genes *KNOX*. En el caso de giberelinas los genes *KNOX* presentaron una relación inversa; sin embargo, durante el desarrollo de embriones somáticos de cocotero en presencia de AG<sub>3</sub> se favoreció la expresión del gen *CnKNOX1*. Estos resultados parecen indicar que la adición de fitohormonas que favorecen la formación de embriones somáticos, a nivel molecular se promueve la expresión de genes que podrían estar involucrados en incrementar el potencial embriogénico y/o en el mantenimiento de la identidad del embrión.

En *Helianthus annuus* x *H. tuberosus* (EMB-2), la adición de citocinina (zeatina) en el medio de cultivo, que promueve la formación de embriones somáticos, también promueve la expresión del gen *HtKNOT1* de clase I (Chiappetta *et al.*, 2006) y la sobreexpresión del gen *HtKNOT1* promueve la formación de embriones somáticos (Belmonte *et al.*, 2007). En maíz la expresión ectópica de genes *KNOX* clase I, resulta en la formación de meristemoides originados de células de hoja. En *Arabidopsis* promueve la identidad de células meristemáticas en el meristemo apical del brote durante el desarrollo embriogénico y post-embriogénico (Vollbrecht *et al.*, 1991; Long *et al.*, 1996). Mientras que en cultivo de abeto la sobreexpresión de *HBK3* (*KNOX* clase I) incrementa el potencial embriogénico, promoviendo la formación de ES y

facilitando el desarrollo subsecuente del embrión en cultivo *in vitro* (Belmonte *et al.*, 2007). Por lo que el gen *CnKNOX1* de clase I además de que parece estar involucrado en la formación y mantenimiento del meristemo apical, también podría estar implicado en promover el potencial embriogénico en el protocolo de regeneración de cocotero.

#### **5.4.3 Germinación de embriones cigóticos de cocotero.**

En diversas especies de plantas se ha observado que la adición de AG<sub>3</sub> promueve la germinación; sin embargo, se conoce poco acerca de los mecanismos que se encienden una vez que se adiciona esta hormona de crecimiento. Por lo que, en los últimos años se han realizado esfuerzos para identificar genes que podrían participar y promover la germinación. Durante el proceso se promueve la expresión de genes que intervienen en la biosíntesis de giberelinas, en la elongación celular, en la activación del ciclo celular, así como genes que promueven la transición del desarrollo embriogénico al postembriogénico (Ogas *et al.*, 1999; Ogawa *et al.*, 2003). En el último punto, se ha identificado el gen *PICKLE (PKL)*, que codifica para un factor remodelador de cromatina, cuya expresión se detecta en células diferenciadas, y que además se ha propuesto como un factor necesario para reprimir la identidad embriogénica durante la germinación, inhibiendo la expresión de genes *LEC* (Rider *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2005) y limitando el acceso a los genes blanco de los genes *KNOX*. Durante la embriogénesis, los genes *LEC* y *KNOX* (clase I) además de que juegan un papel importante en el desarrollo del embrión, también podrían estar involucrados con incrementos en el potencial embriogénico en cultivo *in vitro* (Ori *et al.*, 2000; Curaba *et al.*, 2003; Hake *et al.*, 2004; Belmonte *et al.*, 2007; Michelotti, 2007).

Durante la germinación de cocotero se detectaron dos picos de expresión del gen *CnKNOX1* (días 2 y 8) y en el caso del gen *CnKNOX2* se incrementaron los niveles de expresión en el día 2, disminuyendo paulatinamente en los días subsecuentes. La adición de AG<sub>3</sub>, que acelera el proceso durante la germinación de embriones cigóticos, no modificó la expresión del gen *CnKNOX1*, mientras que en el caso del gen *CnKNOX2* no se afectó el patrón de expresión comparado con el control. Dichos resultados indican que durante la germinación de embriones cigóticos en presencia de AG<sub>3</sub>, se reprime la expresión del gen *CnKNOX1*, lo que podría estar indicando un antagonismo como se ha reportado en otras especies (Hake *et al.*, 2004), mientras que en el caso del gen *CnKNOX2* no se afecta el patrón de expresión, lo que sugiere que ambos genes (*CnKNOX1* y *CnKNOX2*) presentan diferentes vías de regulación durante la germinación de embriones cigóticos de cocotero.

En el caso de maíz se ha detectado que un mismo gen *Knox7* clase II puede ser sujeto de diferentes regulaciones, ya que éste puede generar dos transcritos alternativos (*Knox7L* y *Knox7S*), que presentan diferentes patrones de expresión dependiendo del proceso que está ocurriendo (embriogénesis o germinación). En la germinación se observó que la expresión del gen *Knox7L* incrementa, mientras que la del gen *Knox7S* disminuye. Por otro lado también se observó que la expresión del gen *Knox7S* puede ser modulada por tratamientos que afectan la germinación (ABA y AG<sub>3</sub>), estimulándose la expresión del gen en presencia de ABA, mientras que en presencia de AG<sub>3</sub> se inhibe su expresión. Por lo que el autor de dicho estudio propuso que los genes *KNOX* podrían estar involucrados en el control de la velocidad de germinación como

parte de la vía de transducción de señales de las hormonas de crecimiento (ABA y AG<sub>3</sub>) (Paven *et al.*, 2007).

En la germinación de cocotero los genes *CnKNOX1* y *CnKNOX2* parecen presentar diferentes vías de regulación. El gen *CnKNOX1*, podría estar relacionado con el potencial embriogénico; parece no ser un gen clave durante la germinación, ya que durante el proceso (control) sólo se detectaron incrementos de expresión en dos días y bajo condiciones que aceleran la germinación (presencia de AG<sub>3</sub>) se inhibe su expresión. En el caso del gen *CnKNOX2* se conserva el mismo patrón de expresión tanto en el tratamiento (AG<sub>3</sub>) como en el control, es decir, que la presencia de AG<sub>3</sub> no afecta la expresión del gen y sugiere que tiene una participación activa desde el inicio de la germinación de cocotero.

## 5.5. Bibliografia

- Belmonte MF, Tahir M, Schroeder D, Stasolla C (2007). Overexpression of HBK3, a class I KNOX homeobox gene, improves the development of Norway spruce (*Picea abies*) somatic embryos. J. Exp. Bot. Doi: 10.1093/jxb/erm099.
- Chiappetta A, Michelotti V, Fambrini M, Bruno L, Salvini M, Petrarulo M, Azmi A, Van Onckelen H, Pugliesi C, Bitonti MB (2006). Zeatin accumulation and misexpression of class I *knox* gene are intimately linked in the epiphyllous response of the interspecific hybrid EMB-2 (*Helianthus annuus* X *H. tuberosus*). Planta 223:917-931.
- Clark SE (2001a). Meristem: Start your signaling. Curr. Op. Plant Biol. 4: 28-32.
- Clark SE (2001b). Cell signalling at the shoot meristem. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2:276-284.
- Curaba J, Herzog M, Vachon G (2003). GeBP, the first member of new gene family in *Arabidopsis*, encodes a nuclear protein with DNA-binding activity and is regulated by KNAT1. The Plant J. 33:305-317.
- Eeuwens CJ (1976) Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera* L.) and cultured *in vitro*. Physiol Plant 36:23-28
- Frugis G, Giannino D, Mele G, Nicolodi C, Chiappetta A, Bisonti MB, Innocenti AM, Defitte W, Van Onckelen H, Mariotti D (2001). Overexpression of *KNAT1* in lettuce shifts leaf determinate growth to shoot-like indeterminate growth associated with an accumulation of isopentenyl-

type cytokinins. *Plant Physiol.* 126:1370-1380.

- Hake S, Smith HMS, Holtan H, Magnani E, Mele G and Ramirez J (2004). The Role of *KNOX* genes in Plant Development. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 20:125-51.
- Hareven D, Gutfinger t, Parnis A, Eshed Y, Lifschitz E (1996). The making of compound leaf: genetic manipulation of leaf architecture in tomato. *Cell* 84:735-744
- Herrera Isidrón L (2000). RT-PCR en el diagnóstico del virus de la tristeza de los cítricos (CVT). Tesis de Doctorado. Centro de Investigación de Estudios Avanzados del IPN, Unidad Irapuato, México.
- Jouannic S, Collin M, Vidal B, Verdeil JL, Tregler W (2007). A class I *KNOX* gene from the palm species *Elaeis guineensis* (*Arecaceae*) is associated with meristem function and a distinct mode of leaf dissection. *New Phytol.* 174:551-568.
- Kerstetter RA, Laudencia-Chingcuanco D, Smith LG, Hake S (1997) Loss-of function mutation in the maize homeobox gene, *Knotted1*, are defective in shoot meristem maintenance. *Dev.* 124:3045-3054.
- Laux T, Würschum T, Breuninger H (2004) Genetic Regulation of Embryonic Pattern Formation. *The Plant*

Rid. J. S. D. Bal  
2005). *PICK*. F.  
press expression.

Analysis of relative  
real-time quantitative PCR  
Act 00. Methods. 25:402-

(K) 196 (A)

- member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the *STM1* gene of *Arabidopsis*. Nat. 379:66-69.
- Ma H, McMullen MD, Finer JJ (1994). Identification of a homeobox-containing gene with enhanced expression during soybean (*Glycine max* L.) somatic embryo development. Plant Mol. Biol. 24:465-473.
  - Michelotti V, Giorgetti L, Geri C, Cionini G, Pugliesi C, Fambrini M (2007). Expression of HtKNOT, a class I KNOX gene, overlaps cell layers and development compartments of differentiating cells in stems and flowers of *Helianthus tuberosus*. Cell Biol. Int. 31:1280-1287.
  - Ogas J, Kaufmann S, Henderson J, Somerville C (1999). PICKLE in CHD3 chromatin-remodeling factor that regulates the transition from embryonic to vegetative development in *Arabidopsis*. PNAS 96:13839-13844.
  - Ogawa M, Hanada A, Yamauchi Y, Kuwahara A, Kamiya Y, Yamaguchi S (2003). Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination. The Plant Cell 15:1591-1604.
  - Ori N, Eshed Y, Chuck G, Bowman JL, Hake S (2000). Mechanisms that control *knox* gene expression in the *Arabidopsis* shoot. Dev. 127:5523-5532.
  - Paven M-C M-L, Anzala F, Rector A, Limami AM (2007). Differential transcription initiation and alternative RNA splicing of *Knox7* a class 2 homeobox gene of maize. Gene 401:71-79.
  - Pech y Aké A, Maust B, Orozco-Segovia A, Oropeza C (2007). The effect of gibberellic acid on the *in vitro* germination of coconut zygotic embryos and their conversion into plantlets. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 43:247-253.

- Pérez-Nuñez MT, Chan JL, Sáenz L, González T, Verdeil JL, Oropeza C (2006). Improved somatic embryogenesis from *Cocos nucifera* (L.) Plumule explants. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 42:37-43
- Reiser L, Sanchez-Baracaldo P, Hake S (2000). Knot in the family tree: evolutionary relationship and functions of *knox* homeobox genes. *Plant Mol. Biol.* 42:151-166.
- Rider SD, Henderson JT, Jerome RE, Edenberg HJ, Romero-Severson J, Ogas J (2003). Coordinate repression of regulators of embryonic identity by PICKLE during germination in *Arabidopsis*. *The Plant J.* 35:33-43.
- Sakamoto T, Nishimura M, Tamaoki M, Kuba M, Tanaka H, Iwahori S, Matsuoka M (1999). The conserved *KNOX* domain mediates specificity of tobacco *KNOTTED1*-type homeodomain proteins. *Plant Cell* 11:1419-1431.
- Sentoku N, Sato Y, Kurata N, Ito Y, Kitano H and Matsuoka M (1999). Regional Expression of the Rice *KN-1* Type homeobox gene family during embryo, shoot and flower development. *The Plant Cell*, 11:1651-1653.
- Sinha NR, Williams RE, Hake S (1993). Overexpression of the maize homeobox gene, *KNOTTED-1*, causes a switch from determinate to indeterminate cell fates. *Gene Dev.* 7:787-795.
- Smith LG, Greene B, Veit B, Hake S (1992). A dominant mutation in the maize homeobox gene, *Knotted-1*, causes its ectopic expression in leaf cells with altered fates. *Dev.* 116:21-30.
- Tamaoki M, Kusaba S, Kano-Murakami Y, Matsuoka M (1997). Ectopic expression of tobacco homeobox gene, *NTH15*, dramatically alters leaf morphology and hormone levels in transgenic tobacco. *Plant Cell Physiol.* 38:917-927.
- Vollbrecht E, Veit B, Sinha N, Hake S (1991). The

developmental gene *knotted-1* is a member of a maize homeobox gene family. Nat. 350:241-243.

- Vollbrecht E., Reiser L, Hake S (2000) Shoot meristem size is dependent on inbred background and presence of the maize homeobox gene, *knotted*. Dev. 127:3161-3172.
- Zhang S, Wong L, Meng L, Lemaux PG (2002). Similarity of expression patterns of *knotted1* and *ZmLEC1* during somatic and zygotic embryogenesis in maize (*Zea mays* L.). Planta 215:191-194

## CAPÍTULO 6

### **6.1. Addition of benzyladenine to coconut explants cultured *in vitro* improves the formation of somatic embryos and their germination**

Mayra Itzcalotzin Montero Cortés, José Luis Chan, Ivan Cordova Lara, Carlos Oropeza Salin, \*Luis Sáenz Carbonell  
Unidad de Biotecnología. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Calle 43 No. 130. Colonia Chuburna de Hidalgo, Mérida, Yucatán, México.

\*Corresponding autor: [vyca@cicy.mx](mailto:vyca@cicy.mx), 529999428330, fax number: 52-999-981-3900.

Running title: benzyladenine improves somatic embryogenesis  
**Sometido a la Revista Agrociencia en el 2009**

#### **6.1.1. Abstract**

Coconut (*Cocos nucifera* L.) surface and production has been declining in Mexico and other countries due to deadly diseases. Therefore there is a growing need of massive production of palms resistant to diseases for replanting and micropropagation will be very useful for this purpose. Explants (embryogenic structures) of Pacific Tall 2 ecotype, cultured in induction medium defined as I (semisolid Y3 medium containing 0.65 mM 2,4-dichlorophenoxyacetic acid) were treated with the cytokinin benzyladenine (BA) at 0, 25, 100 or 200  $\mu$ M to evaluate its effect on embryogenic callus formation. The BA treatments did not affect the percentage of embryogenic callus formation. Then, in order to evaluate the effect of the treatments on the later formation and germination of somatic embryos, embryogenic calluses obtained in medium I, were transferred to medium II (semisolid Y3 medium, containing 6  $\mu$ M 2,4-

dichlorophenoxyacetic acid and 300  $\mu\text{M}$  BA). The best treatment was 100  $\mu\text{M}$  BA with 72% of calluses forming embryos. Results with other treatments ranged from 24 to 36%. With 100  $\mu\text{M}$  BA 27 embryos were formed *per* responding callus at 150 days, while about 4 were formed with 25  $\mu\text{M}$  BA and the control (0  $\mu\text{M}$  BA). The highest percentage of calluses with embryos germinating occurred with 100  $\mu\text{M}$  BA with 50% at 150 days, and about 20% was reached with the other treatments. The amount of embryos germinating *per* callus was 10 with 100  $\mu\text{M}$  BA at 150 days, while with the other treatments it was 2-3. The total yield of embryos formed and embryos germinating from 100 explants were 73.6 and 19.0, respectively with 0  $\mu\text{M}$  BA, and 753.2 and 249.0 with 100  $\mu\text{M}$  BA respectively. These results represent a very important improvement in the efficiency of coconut somatic embryo formation and germination.

**Keywords:** *Cocos nucifera*, clonal propagation, somatic embryogenesis, cytokinin

### 6.1.2. Introduction

The coconut palm (*Cocos nucifera* L.) is a very important crop in tropical areas. Raw materials for several products can be obtained; historically, the most important is the oil from the solid endosperm, with different applications including the production of biodiesel, already a viable option to substitute fossil diesel in countries as Philippines (Tan *et al.*, 2004). Unfortunately, cultivation surface has been declining because millions of palms are dying mainly due to deadly diseases; in Mexico, particularly the lethal yellowing disease (LY) (Harrison and Oropeza, 2008). Therefore there is a growing need of palms resistant to these diseases for replanting.

In our country, a nearly ten-year study screening LY resistant coconut germplasm allowed the identification of highly resistant ecotypes, in particular Mexican Pacific Tall 2 (MPT2) (Zizumbo *et al.*, 1999). Then, in order to have enough selected palms for replanting purposes, we require propagation methods that are more efficient than what nature provides for coconut with a small number of seeds produced annually *per* palm. Such an alternative is micropropagation and already efforts for the development of protocols, *via* somatic embryogenesis, have been reported using different types of explants: immature leaf (Raju *et al.*, 1984), immature inflorescence (Verdeil *et al.*, 1994), plumule (Chan *et al.*, 1998) and more recently, unfertilized ovary (Perera *et al.*, 2006). The plumule explant when cultured in medium containing the synthetic auxin 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) without any other growth regulator, has so far resulted the most responsive for the production of embryogenic calluses and somatic embryos, although yields of embryos were very low (Chan *et al.*, 1998). In our laboratory, in order to overcome this limitation, we

developed a protocol with a cumulative effect on the number of somatic embryos produced, mainly by subsequent steps of embryogenic callus multiplication, for which embryogenic structures are used as explants (Perez-Nuñez *et al.*, 2006). However, each individual step still presents low efficiency: only 40-60% explants form embryogenic callus (EC), 1-7 somatic embryos are formed per EC and embryo germination is 12-28% (Perez-Nuñez *et al.*, 2006). Therefore, it is very important to find ways to improve these figures in order to obtain an efficient process for practical application to support replanting programs in Mexico.

Cytokinins such as BA are commonly included in media formulations in combination with auxins to induce embryogenic cultures (Gaj, 2004). BA and other cytokinins, added to a medium formulation that includes 2,4-D, have already been tested on plumule explants and found to be inhibitory for the formation of EC (Azpeitia, 2003; Chan *et al.*, 1998), but they have never been tested before on embryogenic structure explants derived from multiplying calluses. Therefore the objective of the present study was to determine the effect of BA on the formation of embryogenic callus, somatic embryos and their germination utilizing embryogenic structures as initial explants.

## **6.2 Materials and methods**

*Initial plant material.* Coconut fruit were harvested 12-14 months after controlled pollination of Mexican Pacific Tall palms at least 15 year old. Cylinders of endosperm containing the embryo were excised in the field and placed in a 0.6% NaClO (w/v) solution and then rinsed with sterile water. Under aseptic condition, the cylinders were washed in 70% ethanol for 3 min,

washed in a 6 % NaClO solution for 20 min and rinsed with sterile water. The embryos were excised from the endosperm and washed in a 0.6% NaClO solution for 10 min and rinsed with sterile water. The plumules were excised from these embryos under a stereoscopic microscope and placed directly on a culture medium.

*Media preparation and culture conditions.* Media preparation and culture conditions were set up according to Pérez-Nuñez *et al.* (2006). Media I and II were each prepared using Y3 medium (Eeuwens, 1976) supplemented with 3 g L<sup>-1</sup> gelrite and 2.5 g L<sup>-1</sup> charcoal (acid-washed, plant cell culture tested), but medium I contained 600 µM 2,4-D, while medium II contained 6 µM 2,4-D and 300 µM benzyladenine (BA). All chemicals were supplied by Sigma (USA). The medium pH was adjusted to 5.75 with KOH before autoclaving for 20 min at 120°C. For callus induction, each explant was cultured for 90 days in a 35 ml glass vessel containing 10 ml of medium I. Cultures were kept under complete darkness at 27 ± 2 °C without subculturing. For induction of somatic embryos, calli were subcultured in a 100 ml glass vessel containing 25 ml of medium II. Cultures were kept under 16 h photoperiod (45-60 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> PPFD) at 27 ± 2 °C, and explants were subcultured once every 2 months.

*Callus multiplication.* Embryogenic structures were excised from EC formed in medium I. These embryogenic structures were subcultured in medium I and formed EC. This operation was repeated twice and the resulting embryogenic calluses were subcultured in medium II for somatic embryo formation and germination. Media and conditions were as described above.

*Experiment with BA.* BA at different concentrations (0, 25, 50,

100 and 200  $\mu\text{M}$ ) was added to medium I (protocol callus multiplication). The effect of BA treatments was evaluated in the formation of EC. The embryogenic calluses formed in the different BA treatments were transferred to medium II (same formulation as above for all treatments) to allow the formation of somatic embryos and their germination. Sixty explants were used *per* treatment in medium I (three replicates with 20 explants) and then from each treatment batch 30 embryogenic calluses were subcultured into medium II (three replicates with 10 explants).

*Quantitative evaluation.* Every 30 days, under sterile conditions and utilizing a stereoscopic microscope, the following parameters were determined: percentage of explants forming EC, percentage of embryogenic calluses with somatic embryos, number of somatic embryos *per* EC responding, percentage of embryogenic calluses with somatic embryos germinating, number of somatic embryos germinating *per* EC responding, total yield of somatic embryos and total yield of somatic embryos germinating. In the case of the number of somatic embryos *per* EC responding and the number of somatic embryos germinating *per* EC responding, only the calluses that presented somatic embryos and somatic embryos germinating were considered, respectively.

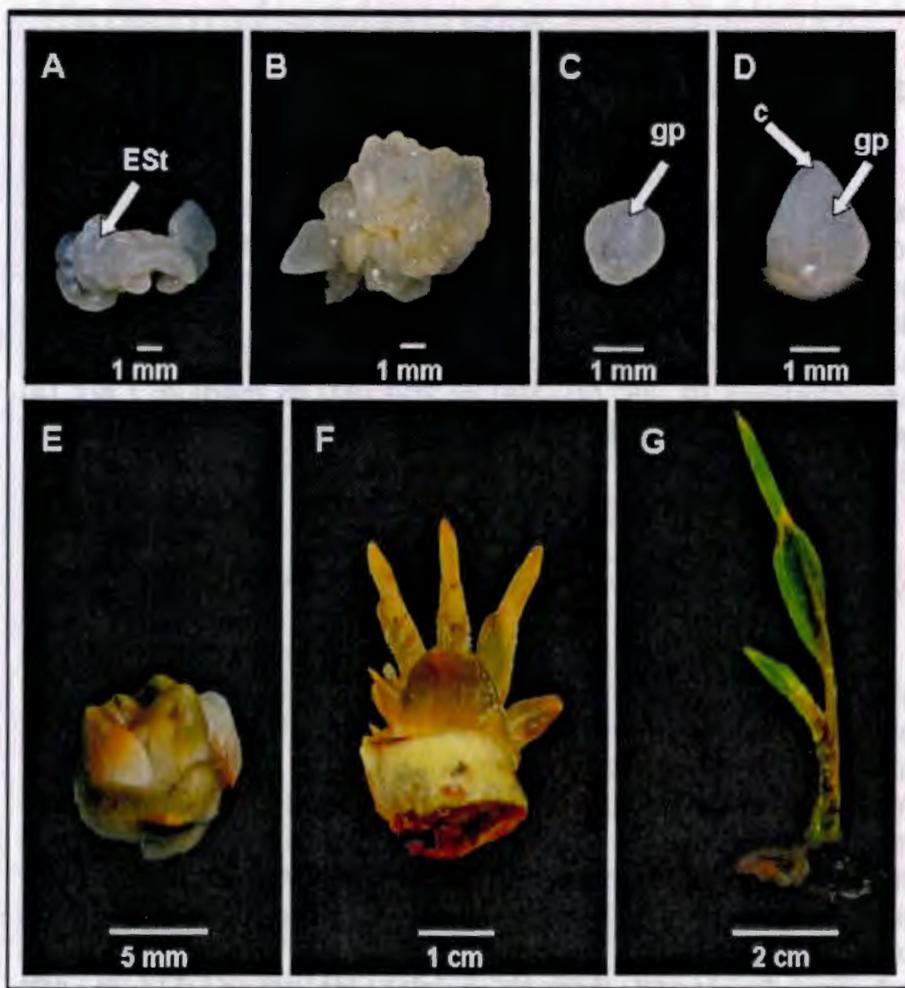
*Statistical analysis.* Data presented correspond to means  $\pm$  standard error (SE). A completely randomized design was utilized. Data were subjected to analysis of variance (ANOVA) and the procedure for mean comparisons (LSD test at  $P < 0.05$ ) was performed with SPSS, version 11.5 software.

### 6.3. Results and discussion

Coconut micropropagation has been the subject of research during four decades since this palm species is highly recalcitrant for *in vitro* culture. So far reports have shown somatic embryogenesis as the sole regeneration pathway for this species (Verdeil & Buffard-Morel, 1995). In the present study we evaluated the effect of the addition of BA at different concentrations (0, 25, 50, 100 or 200  $\mu\text{M}$ ) to medium I on: (a) the percentage of explants forming EC, and (b) the formation of somatic embryos and their germination on the calluses formed when transferred to medium II.

#### *Morphological development of coconut cultures*

In this study the explants used were embryogenic structures, protruding characteristic features of embryogenic coconut calluses (Figure 1A) after being detached from the calluses. When cultured in medium I, after 90 days, embryogenic structures in turn formed embryogenic calluses showing embryogenic structures as in Figure 1A. This occurred with media supplemented with any of the BA treatments. After transfer to medium II, these calluses were already forming somatic embryos at 30 days of culture (Figure 1B). The embryos developed through a globular stage (Figure 1C) followed by a scutellar stage (Figure 1D). Embryos on the calluses were already germinating at 60 days (Figure 1E) and later developed into shoots (Figure 1F) and plantlets (Figure 1G).



**Figure 6.1.** Development and germination of coconut somatic embryos in the presence of 100  $\mu\text{M}$  BA. (A) An embryogenic callus [EC] showing embryogenic structures [ESt]. (B) An EC with somatic embryos [SE]. (C) SE at the globular stage showing the germinative pore [gp]. (D) SE at the scutellar stage showing the coleoptile [c] and the gp. (E) Initial germination of SE. (F) Shoots forming. (G) A plantlet forming

From the developmental and morphological point of view, there were no differences between BA treatments and the control. Within 90 days of culture in medium I, a proportion of explants formed EC that first developed translucent structures with ear-like shape. Then, pearly globular structures appeared on the surface of translucent structures, and later they became elongated. This pattern of morphological development was the same as in the report by Sáenz *et al.*, 2006, that defined these elongated structures as embryogenic structures since somatic embryos eventually formed from them. Occurrence of these structures has also been reported for *Elaeis guinensis* (Schwendiman *et al.*, 1990) and *Hevea brasiliensis* (Michaux-Ferriere & Carron, 1989).

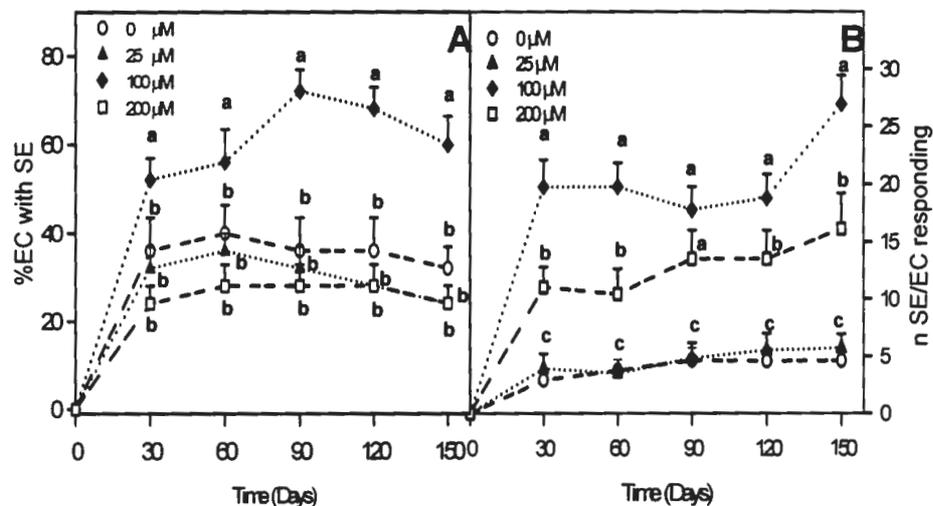
#### *Effect of BA on the formation of embryogenic callus*

Quantitative evaluation of the effect of BA (0, 25, 100 or 200  $\mu\text{M}$  in Medium I) on the formation of EC was carried out after 90 days of culture. No significant differences were observed with either of the BA concentrations used. The control with no BA had 50% of explants forming EC, whereas with 25, 100 or 200  $\mu\text{M}$  BA the responses were 50, 46 and 53%, respectively.

#### *Effect of BA on the formation of somatic embryos*

The embryogenic calluses obtained in medium I with different concentrations of BA, were transferred to medium II to evaluate if BA initial treatments affected the formation of SE over a 150 day culture. Somatic embryos on embryogenic calluses were already observed at 30 days of culture (Figure 2A). The percentages of EC forming embryos ranged from 24 to 36% for 25  $\mu\text{M}$  and 200  $\mu\text{M}$  BA and control (Figure 2A).

Percentage changes afterwards were not significant. With 100  $\mu\text{M}$  BA the percentage of calluses with embryos was already above 50% and kept increasing reaching a maximum of about 72% at 90 days.



**Figure 6.2.** The effect of BA on the formation of somatic embryos [SE] in embryogenic calluses [EC]. (A) Percentage of embryogenic calluses with somatic embryos. (B) Number of somatic embryos per embryogenic callus responding. Data shown are means and bars denote standard error. Different letters at each time of culture denote significant differences among treatments ( $P < 0.05$ ).

The amount of somatic embryos formed *per* EC was measured. With 100  $\mu\text{M}$  BA, responding calluses had already 20 embryos at 30 days (Figure 2B) and then it increased to 27 at 150 days. A similar pattern was observed with the other treatments but with lower amounts of embryos *per* callus. With 200  $\mu\text{M}$  BA, responding calluses had 16 embryos at 150 days (Figure 2B). With 25  $\mu\text{M}$  BA and the control, responding calluses had about 4 embryos at 30 days and practically no

change afterwards (Figure 2B).

The total yield of somatic embryos formed from 100 explants was calculated at 150 days (Table 1). For the control treatments it was 73.6 and for the best treatment with 100  $\mu\text{M}$  BA it was 753.2, representing a percentage increase of 923%.

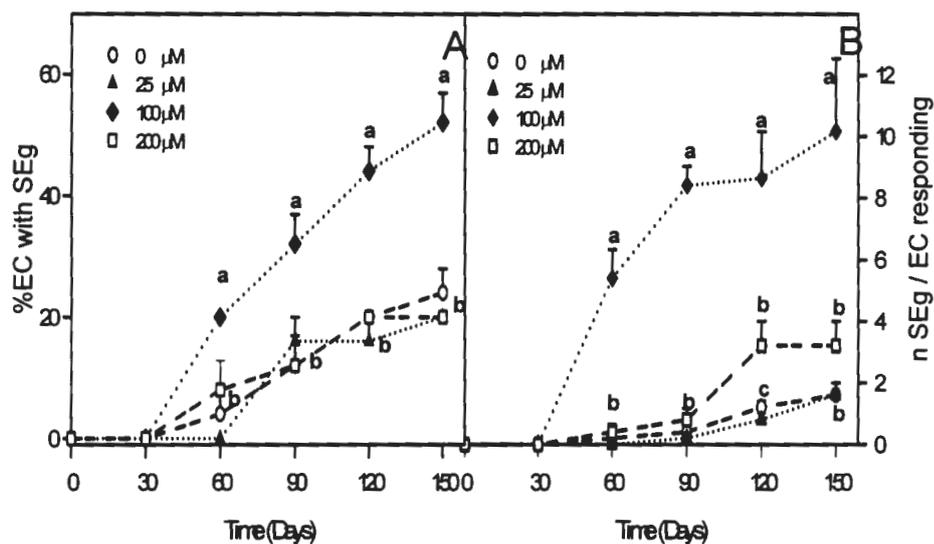
**Table 6.1.** Comparative summary of results of quantitative morphogenic changes with the control treatment (0  $\mu\text{M}$  BA) and the best treatment (100  $\mu\text{M}$  BA) at day 150, and yields of total somatic embryos and total somatic embryos germinating.

<b>Summary</b>	<b>0 <math>\mu\text{M}</math> BA</b>	<b>100 <math>\mu\text{M}</math> BA</b>	<b>% Increment</b>
Explants at start	100.0	100.0	0
Explants forming EC <sup>Φ</sup>	49.0 ± 9.6a	47.0 ± 11.5a	0
Explants forming EC <sup>Φ</sup> with SE <sup>Ψ</sup>	16.0 ± 4.9a	28.0 ± 6.3b	75
Explants forming EC <sup>Φ</sup> with SEg <sup>Δ</sup>	12.0 ± 2.0a	24.0 ± 2.4b	100
<b>Yields per responding callus</b>			
nSE <sup>Ψ</sup> / EC <sup>Φ</sup> responding	04.6 ± 1.0a	26.9 ± 2.5b	484
nSEg <sup>Δ</sup> / EC <sup>Φ</sup> responding	01.6 ± 0.4a	10.2 ± 2.4b	537
<b>Total yields per 100 explants</b>			
Total yield SE <sup>Ψ</sup>	73.6	753.2	923
Total yield SEg <sup>Δ</sup>	19.0	249.0	1210

Means with different letter in a row are statistically different (LSD,  $p \leq 0.05$ ). Abbreviations: embryogenic callus, <sup>Φ</sup>EC; somatic embryos, <sup>Ψ</sup>SE; and somatic embryos germinating, <sup>Δ</sup>SEg.

## Effect of BA on the germination of somatic embryos

Embryogenic calluses with somatic embryos germinating were already observed at 60 days of culture (Figure 3A). The highest percentages of calluses with embryos germinating occurred with 100  $\mu\text{M}$  BA with 20% at 60 days and reached about 50% at 150 days (Figure 3C). With 25  $\mu\text{M}$  BA, 200  $\mu\text{M}$  BA and control percentages, they ranged from 1 to 10% at 60 days and reached about 20% at 150 days (Figure 3A).



**Figure 6.3.** The effect of BA on the germination of somatic embryos [SE]. (A) Percentage of embryogenic calluses [EC] with somatic embryos germinating [SEg]. (B) Number of somatic embryos germinating per embryogenic callus responding. Data shown are means and bars denote standard error. Different letters at each time of culture denote significant differences between treatments ( $P < 0.05$ ).

The amount of somatic embryos germinating *per* EC was also measured. With 100  $\mu\text{M}$  BA, responding calluses had already 5 embryos germinating at 60 days (Figure 3B), and increased to 10 at 150 days. With 25  $\mu\text{M}$  BA and the control, responding calluses had less than 2 embryos germinating at 150 days (Figure 3B). The amount of calluses with germinating embryos with 100  $\mu\text{M}$  BA was three-fold those with the other treatments. When looking at the amount of germinating embryos *per* responding callus there was also a large difference between 100  $\mu\text{M}$  BA and the other treatments. The total yield of somatic embryos germinating obtained from 100 explants was calculated at 150 days (Table 1). For the control treatments it was 19.0 and for the best treatment with 100  $\mu\text{M}$  BA it was 249.0, representing a percentage increase of 1210%.

These results contrast with previous communications from our laboratory. We reported that the formation of embryogenic calluses required only medium supplemented with 2,4-D and no BA, since its addition decreased EC formation (Chan *et al.*, 1998). Also, other cytokinins were tested and, similarly, they decreased EC formation (Azpeitia, 2003). In those reports, the explant used was plumule and the effect was on the direct formation of EC. The difference here is that the explant was not plumule but embryogenic structures excised from calluses that were obtained after three callus multiplication cycles *in vitro*. One way to explain this is that the endogenous cytokinin content of plumule explants might be higher than that of embryogenic structures. Similarly, a response to BA dependant on the type of explant was observed during the regeneration of *Stenotaphrum secundatum*. The use of different concentrations of BA did not affect the formation of callus in different tissues used as initial explant: early immature embryo, immature embryo and shoot base of young seedlings; however,

the ability to regenerate was dependent of the type of explant used and the initial concentration of BA added to the culture medium (Li *et al.*, 2006).

Although usually 2,4-D alone induces somatic embryogenesis in monocot species (Bhaskaran & Smith, 1990; Krishnaraj & Vasil, 1995), similarly to the present case, in some such as *Cynodon dactylon* x *Cynodon transvaalensis* (Li & Qu, 2002), *Ophiorrhiza prostrata* (Martin *et al.*, 2007), and *Stenotaphrum secundatum* (Li *et al.*, 2006), the use of a low concentration of benzyladenine in the callus induction medium enhanced the formation of somatic embryos and high concentrations of BA inhibited the embryogenic response (Debeaujon and Branchard, 1993; Martin *et al.*, 2007).

The present results show that although BA did not change the percentage of explants forming callus, its effect at 100  $\mu$ M BA represents a very important improvement in the efficiency of embryo formation and germination. This improvement should be introduced to the propagation scheme proposed by Pérez-Núñez *et al.* (2006) to increase yields in a cumulative fashion. This is particularly relevant because the focus of the present and previous efforts (Chan *et al.*, 1998; Sáenz *et al.*, 2006; Pérez-Núñez *et al.*, 2006) is in the development of an efficient process for practical applications to support replanting programs in Mexico, as planned by the National Association of Coconut Farmers (CONACOCO) and based on the use of MPT2 coconut palms.

#### **6.4. Conclusion**

The addition of benzyladenine (100  $\mu\text{M}$ ) in medium I conditions I, increased the formation and germination of somatic embryos based on the protocol of EC multiplication. These results improve the overall efficiency of the system for the regeneration of coconut palm, which could have a practical application.

**Acknowledgments** The authors would like to thank CONACYT, Mexico for partial funding for the research reported here (Program grant 43834-Z) and for an scholarship for M. Montero (Grant 183253).

## 6.5. References

- Azpeitia A, Chan JL, Sáenz J, Oropeza C (2003). Effect of 22(S), 23(S)- homobrassinolide on somatic embryogenesis in plumule explants of *Cocos nucifera* (L.) cultured *in vitro*. J Hortic Sci Biotechnol. 78:591-596.
- Azpeitia A (2003). Different strategies to improve somatic embryogenesis on coconut palm using plumule as explants. Ph. D thesis. Centro de Investigación Científica de Yucatán, México.
- Bhaskaran S, Smith RH (1990). Regeneration in cereal tissue culture: a review. Crop. Sci. 30:1328-1336.
- Chan JL, Sáenz L, Talavera C, Hornung R, Robert M, Oropeza C (1998). Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explant through somatic embryogenesis. Plant. Cell. Rep. 17: 515-521.
- Debeaujon I, Branchard M (1993). Somatic embryogenesis in *Cucurbitaceae*. Plant. Cell. Tiss. Organ Cult. 34:91-100.
- Eeuwens CJ (1976). Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera* L.) and cultured *in vitro*. Physiol. Plant 36:23-28.
- Gaj MD (2004). Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Plant Growth Regul. 43:27-47.
- Harrison NA, Oropeza C (2008). Phytoplasmas associated with coconut lethal yellowing. In: Harrison NA, Rao GP and Marcone C (eds) Characterization, Diagnosis and Management of Phytoplasmas. Studium Press LLC, Houston, USA, pp 219-248.

- Krishnaraj RS, Vasil IK (1995). Somatic embryogenesis in herbaceous monocots. In: Thorpe TA (ed) *In vitro Embryogenesis in Plants*, Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers, pp 471-540.
- Li L, Qu R (2002). *In vitro* somatic embryogenesis in turf-type bermudagrass: roles of abscisic acid and gibberellic acid, and occurrence of secondary somatic embryogenesis. *Plant Breed.* 121:155-158.
- Li R, Bruneau AH, Qu R (2006). Improved plant regeneration and *in vitro* somatic embryogenesis of St Augustinegrass [*Stenotaphrum secundatum* (Walt.) Kuntze]. *Plant Breed.* 125:52-56.
- Martin KP, Beegum S, Zhang CL Slater A, Madhusoodanan PV (2007). *In vitro* propagation of *Ophiorthiza prostrata* through somatic embryogenesis. *Biol. Plant* 51:769-772.
- Michaux-Ferriere N and Carron MP (1989). Histology of early somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*: The importance of the timing of subculturing. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 19:243-256.
- Perera PIP, Hoher V, Verdeil JL, Doubeau S, Yakandawala DMD, Weerakoon LK (2006). Unfertilized ovary: a novel explant for coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.* 26: 21-28.
- Pérez-Nuñez MT, Chan JL, Sáenz L, González T, Verdeil JL, Oropeza C (2006). Improved somatic embryogenesis from *Cocos nucifera* (L.) Plumule explants. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 42:37-43.
- Raju CR, Kumar P, Chandramohan M, Lyer RD (1984) Coconut plantlets from leaf tissue cultures. *Plant Crop* 12:75-81
- Sáenz L, Azpeitia A, Chuc-Armendariz B, Chan JL, Verdeil J-L, Hoher V, Oropeza C (2006) Morphological

and histological changes during somatic embryo formation from coconut plumule explants. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 42:19-25

- Schwendiman J, Pannetier C, Michaux-Ferriere N (1990) Histology of embryogenic formation during *in vitro* culture of oil palm *Elaeis guineensis* Jacq. *Ol.* 45:409-415
- Tan RR, Culaba AB and Purvis MRI (2004). Carbon balance implications of coconut biodiesel utilization in the Philippine automotive transport sector. *Biomass Bioenerg.* 26:579-585.
- Verdeil J-L, Buffard-Morel J (1995) Somatic embryogenesis in coconut (*Cocos nucifera* L.): In: Bajaj YPS (ed) *Biotechnology in agriculture and forestry, Somatic embryogenesis and synthetic seed I*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Alemania, pp 299-317
- Verdeil J-L, Huet C, Grosdemange F, Buffard-Morel J (1994) Plant regeneration from cultured immature inflorescence of coconut (*Cocos nucifera* L.): evidence for somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.* 3:218-221
- Zizumbo D, Fernandez M, Torres N, Cardeña R (1999). Lethal yellowing resistance in coconut germplasm from México. In: Oropeza C, Verdeil JL., Asburner R, Cardeña R, Santamaría JM (eds). *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*. Kluwer Academic Publishers Netherlands p 131-143.

## CAPÍTULO 7

### 7.1. Discusión general y perspectivas

#### 7.1.1 Efecto de AG<sub>3</sub> y benciladenina (BA) en la formación de embriones y su germinación

En México el cocotero es uno de los cultivos más importantes económicamente en zonas costeras de áreas tropicales; sin embargo, en los últimos años se han reducido considerablemente las áreas de plantación de coco, en gran medida a causa de enfermedades devastadoras como el amarillamiento letal (Domínguez *et al.*, 1999; FAO, 2006). Actualmente se requiere la replantación masiva del cocotero en zonas costeras con material altamente productivo y con resistencia al amarillamiento letal. Desgraciadamente la propagación tradicional es lenta (Ashmore, 1997), por lo que en los últimos años se ha desarrollado el protocolo de regeneración *in vitro* de cocotero a partir de explantes de inflorescencia y plúmula (Verdeil *et al.*, 1994; Chan *et al.*, 1998). El empleo de este último explante presenta una mayor eficiencia para la generación de embriones somáticos y conversión de plantas comparado con el otro tipo de explante, sin embargo su eficiencia es baja, por lo que se ha buscado desarrollar diversas alternativas para incrementar la eficiencia del protocolo de regeneración, logrando incrementar la formación de callo embriogénico y el número de embriones somáticos por plúmula.

El protocolo de regeneración (empleando como explante inicial la plúmula) se estableció utilizando cocotero variedad Enano Malayo, que tiene una mejor respuesta en cultivo *in vitro* pero sus características agronómicas para la producción

de copra no son las deseables, una mejor opción es el empleo de cruza de cocoteros Alto del Pacífico con un alto grado de resistencia al amarillamiento letal, las cuales presentan mejores características productivas, y con ello aumentan su valor económico (Zizumbo *et al.*, 1999). En el CICY se ha iniciado la micropropagación de cocoteros Alto del Pacífico a partir del protocolo de regeneración, a través de embriogénesis somática primaria, ESP (explante inicial plúmula) y combinando los protocolos de multiplicación de callo embriogénico (MCE) con la embriogénesis somática secundaria (ESS) (Pérez-Nuñez *et al.*, 2006). En el caso del cocotero Alto del Pacífico, al ser un ecotipo diferente al Enano Malayo, éste puede requerir condiciones particulares (diferente composición del medio de cultivo) dependiendo del protocolo empleado (ESP, MCE, ESS) para mejorar la eficiencia de su regeneración. En cultivo *in vitro* la respuesta de regeneración puede variar dependiendo del genotipo empleado, la composición del medio de cultivo y el tipo de explante inicial utilizado (Brown *et al.*, 1995).

En esta tesis se realizaron diferentes estrategias para incrementar la eficiencia de regeneración del cocotero Alto del Pacífico, empleando el protocolo de MCE, en el que se evaluó el efecto independiente de la giberelina ( $AG_3$ ) y la citocinina (BA) en la embriogénesis somática. En el caso de  $AG_3$  ( $0.5 \mu M$ ) durante la embriogénesis somática ésta promovió la formación y germinación de ES, pero el empleo de concentraciones elevadas tiene un efecto negativo en ambos procesos. La aplicación de  $AG_3$  durante la embriogénesis somática puede tener efectos variados (favoreciendo o inhibiendo la formación de ES) dependiendo de la especie y la concentración empleada. En el caso de *Cicer arietinum*, *Hardwickia binata Roxb*, *Mendicago sativa* (Hita *et al.*, 1997; Das *et al.*, 1995; Rudús *et al.*, 2002), la adición de  $AG_3$

favorece la formación de embriones somáticos, lo que sugiere que en las especies antes mencionadas, así como en cocotero, la adición de esta fitohormona podría estar promoviendo la diferenciación de embriones somáticos durante el desarrollo para favorecer su germinación. De acuerdo con los resultados de esta tesis y un cálculo con base a 100 explantes iniciales (Cuadro 7.1), la adición de AG<sub>3</sub> (0.5 μM) puede llegar a generar 240 embriones somáticos totales, mientras que en el control sólo se generan 100 ES totales, lográndose con la adición de AG<sub>3</sub> hasta un 140% de incremento. En la germinación de ES también se pudo observar que la adición de AG<sub>3</sub> logró incrementar hasta un 322% la respuesta de la germinación (Cuadro 7.1).

La adición de 100 μM de BA al medio de cultivo durante la etapa I de la embriogénesis somática de cocotero, no afectó la formación de CE; sin embargo, promovió la formación y la germinación de ES. De acuerdo con los resultados obtenidos y un cálculo con base a 100 explantes iniciales (Cuadro 7.1), la adición de BA (100 μM) puede llegar a generar 753 embriones somáticos totales, mientras que en el control sólo se generan 73 ES totales, lográndose con la adición de BA hasta un 923% de incremento en la formación de ES. En la germinación de ES también se observó que la adición de BA promovió la respuesta de germinación hasta en un 1210% de incremento (Cuadro 7.1). En diferentes especies se ha observado que, durante la embriogénesis, la aplicación de citocinina promueve la diferenciación celular para el desarrollo de ES y su germinación (Merkle *et al.*, 1995; Martin, 2004; Haensch, 2007).

La adición independiente de AG<sub>3</sub> y BA durante la embriogénesis somática incrementó la formación y germinación de embriones somáticos (Cuadro 7.1), lo que aumentó la

eficiencia del sistema de regeneración en el ecotipo Alto del Pacífico. Dichos regenerantes podrían emplearse para la replantación de zonas costeras afectadas por el amarillamiento letal en México. Sin embargo, no hay que descartar la idea de mejorar el proceso, por lo que es importante la realización de diferentes estrategias para la optimización particular de cada ecotipo (de cocotero) y cada protocolo de regeneración (ESP, MCE, ESS) de cocotero. En el caso del cocotero Alto del Pacífico, sería interesante determinar el efecto combinado de BA y AG<sub>3</sub> durante la formación y germinación de embriones somáticos.

Cuadro 7.1 Cálculo del rendimiento en la formación y germinación de ES empleando el protocolo de multiplicación de CE de cocotero con base a 100 explantes iniciales.

RESUMEN DE RESULTADOS					RENDIMIENTO DEL NÚMERO de ES por CE <sub>RESPONDIÓ</sub>		RENDIMIENTO TOTAL	
Explante	Explante Inicial	% CE	% CE con ES	% CE con ES <sub>o</sub>	nES/CE <sub>RESPONDIÓ</sub>	nES <sub>o</sub> /CE <sub>RESPONDIÓ</sub>	n ES	n ES <sub>o</sub>
Control	100	49 ± 9.6	20 ± 11.5	10 ± 0.0	5 ± 1.0	2.7 ± 0.3	100	27
AG <sub>3</sub>	100	49 ± 9.6	29 ± 0.0	20 ± 6.7	8.3 ± 0.8	5.7 ± 0.3	240.7	114
Incremento [%]	0	0	45	100	66	111	140.7	322
Explante	Explante Inicial	% CE	% CE con ES	% CE con ES <sub>o</sub>	nES/CE <sub>RESPONDIÓ</sub>	nES <sub>o</sub> /CE <sub>RESPONDIÓ</sub>	n ES	n ES <sub>o</sub>
Control	100	49 ± 9.6	16 ± 4.9	12 ± 4.0	4.6 ± 1.0	1.6 ± 0.4	73.6	19
BA	100	47 ± 11.5	28 ± 6.3	24 ± 4.9	26.9 ± 2.5	10.2 ± 2.4	753.2	249
Incremento [%]	0	0	75	100	484	537	923	1210

Abreviaciones: Embrión somático germinado; ES<sub>o</sub>, ácido giberélico; AG<sub>3</sub>, Benciladenina; BA.

### 7.1.2 Estudios moleculares durante la embriogénesis

En la actualidad la embriogénesis somática se ha empleado como un protocolo de regeneración de plantas en diferentes especies con importancia económica. Por lo anterior se han buscado diversas alternativas que puedan mejorar la respuesta embriogénica de forma inmediata, modificando tanto la composición del medio como las condiciones de cultivo. La realización de estudios básicos durante la embriogénesis y la germinación podría contribuir al entendimiento de ambos procesos, hecho que en un futuro podría aportar información valiosa para su mejoramiento. En esta tesis se realizaron estudios a nivel molecular durante el desarrollo y germinación de embriones de cocotero, en los que se estudió la expresión de genes que intervienen en la regulación del ciclo celular (*CnE2F1*, *CnE2F2* y *CnCDKA*) y genes involucrados en el desarrollo (*CnKNOX1* y *CnKNOX2*), determinando su patrón de expresión durante el desarrollo (en embriones somáticos) y germinación de embriones (en embriones cigóticos). Los resultados obtenidos durante la germinación de embriones cigóticos podrían servir como marco de referencia para entender la germinación en embriones somáticos, ya que tanto los embriones cigóticos (semilla vivípara) como los embriones somáticos de cocotero, carecen de una fase de quiescencia y presentan un desarrollo continuo hasta su germinación.

Durante la embriogénesis somática de cocotero, un grupo de células somáticas son inducidas a entrar a una vía de desarrollo completamente diferente, involucrando una reprogramación a nivel molecular, que puede llevar a una reorganización celular para la formación de callos embriogénicos y posteriormente para la formación de

estructuras bipolares, embriones somáticos (Fehér *et al.*, 2003). Durante el desarrollo del embrión, se pasa por una fase de morfogénesis en la que se establece el cuerpo del embrión (proE), posteriormente atraviesa por las diferentes fases de maduración (globular, escutelar) para lograr su germinación y conversión a plántulas.

Estudios histológicos muestran que en callos embriogénicos se presenta un gran número de células con características embriogénicas, que presentan una proliferación celular activa (Sáenz *et al.*, 2006). En esta tesis los resultados a nivel molecular en callos embriogénicos (que presentan una alta proliferación), coinciden con una alta expresión de los genes que regulan la transición de las fases G1/S del ciclo celular (*CnE2Fs* y *CnCDKA*, datos no presentados), que podrían estar involucrados en promover la proliferación celular en el callo embriogénico. Posteriormente durante el desarrollo y maduración de embriones somáticos, la expresión de estos genes disminuyó gradualmente. En la fase de maduración tardía (ES escutelar) se presentaron los menores niveles de expresión de estos genes. Estos resultados podrían estar indicando que durante la formación del embrión somático del cocotero la proliferación celular disminuye y las células se diferencian y alargan.

Durante el desarrollo de la planta, los genes que intervienen en la regulación del ciclo celular pueden ser influidos por diversas fitohormonas (del Pozo *et al.*, 2005); en el caso de giberelinas, éstas pueden promover la división celular, la elongación celular o ambos (Butcher & Street, 1960; Shininger, 1975; Métraux *et al.*, 1983; Bleeker *et al.*, 1986; Sauter & Kende 1992) dependiendo de la etapa de desarrollo, la especie y condiciones del cultivo. En el caso de cocotero la

adición de AG<sub>3</sub> durante la embriogénesis somática (incrementa la formación y germinación de ES) incrementó los patrones de expresión de genes *CnE2F1* (en todas las fases del ES), *CnE2F2* (en las fases de proE y escutelar) y *CnCDKA* (en la fase escutelar y ES germinado), que intervienen en la modulación del ciclo celular comparado con los embriones desarrollados en ausencia de AG<sub>3</sub>.

El incremento de la expresión de genes que intervienen en la regulación del ciclo celular durante el desarrollo de embriones somáticos en presencia de AG<sub>3</sub>, podría estar contribuyendo en promover el desarrollo de embriones somáticos, en las etapas de pro-E y globular (genes *CnE2F1*, *CnE2F2*) o en la germinación de ES, en la etapa escutelar (maduración para la germinación) y ES germinados (genes *CnE2F1* y *CnCDKA*). Sin embargo, es importante que en un futuro se realicen estudios combinados de proliferación celular y detección *in situ* de genes que intervienen en la regulación del ciclo celular durante el desarrollo de embriones somáticos, para conocer los patrones de proliferación y expresión de estos genes durante el desarrollo, de modo que estos resultados nos permitan predecir su probable contribución al desarrollo y/o germinación de embriones somáticos.

La división y expansión celular juegan un papel continuo durante el desarrollo, en el que participan genes que intervienen en la regulación de la proliferación celular y desarrollo de la planta (Meijer & Murray, 2001). En el caso de plantas mutantes (*rootmeristemless1*), en las que se disminuye o detiene el ciclo celular, esto puede llevar a la pérdida de estructuras que contienen células meristemáticas (Laufs *et al.*, 1998; Vernoux *et al.*, 2000; Hemerly *et al.*, 1999). Este hecho podría inhibir la expresión de genes del desarrollo (genes

*KNOX*) que intervienen en el mantenimiento del meristemo apical. Aunque en la actualidad se desconoce la relación que presentan los genes que regulan el ciclo celular con los genes del desarrollo, se sabe que es necesaria la coordinación continua de ambos tipos de genes para el desarrollo normal de la planta. En la embriogénesis los genes *KNOX* son fundamentales para el desarrollo normal de embriones como se ha encontrado en *Arabidopsis* (Laux *et al.*, 2004) y otras especies como *Glycine max* (Ma *et al.*, 1994), *Norway spruce* (Hjortswang *et al.*, 2002) y *Zea mays* (Zhang *et al.*, 2002); por otro lado, también juegan un papel fundamental durante la organogénesis en *Brassica oleracea* (Teo *et al.*, 2001). En palma aceitera la expresión del gen *EgKNOX1* está ligado con la iniciación y desarrollo del meristemo del brote durante la embriogénesis somática (Jouannic *et al.*, 2007).

En la embriogénesis somática de cocotero, el gen *CnKNOX1* clase I solamente se presentó en aquellas estructuras que desarrollan el meristemo apical del brote (ES). En el caso del gen *CnKNOX2* clase II, su expresión se detectó en la mayoría de los tejidos analizados de cultivo *in vitro* (tanto en estructuras amorfas, como en estructuras bipolares). Por otro lado, durante el desarrollo de embriones somáticos los genes *CnKNOX1* y *CnKNOX2* parecen tener una participación activa durante el desarrollo de ES de cocotero, ya que en el proceso (desarrollo de ES) se detectan los mayores niveles de expresión de ambos genes. No se detectó la expresión de *CnKNOX1* en embriones aberrantes y podría servir como gen marcador de un desarrollo normal del embrión somático.

La adición de AG<sub>3</sub> durante la formación de ES de cocotero (en todas las etapas del desarrollo del ES) promovió la expresión del gen *CnKNOX1*, detectándose su expresión

desde la etapa de proE; mientras que la expresión del gen *CnKNOX2* se reduce durante el desarrollo de ES comparado con el control. Diversos estudios han mostrado la relación inversa de los genes *KNOX* con giberelinas. Sin embargo, durante la formación de embriones somáticos de cocotero en presencia de AG<sub>3</sub>, se promueve la expresión del gen *CnKNOX1*, el cual podría estar involucrado en el incremento del potencial embriogénico en cultivo *in vitro*, por lo que sería de gran interés evaluar el efecto de su sobreexpresión durante la embriogénesis somática en estudios futuros.

Los embriones somáticos y cigóticos de cocotero carecen de una fase de quiescencia, presentando un desarrollo continuo hasta su germinación para la generación de plántulas. En la embriogénesis somática de cocotero se presenta un bajo porcentaje de germinación de embriones, es decir el desarrollo de raíz y meristemo apical de tallo (12-28%), en gran medida por el desarrollo anormal de embriones somáticos (embriones fusionados, que carecen de meristemo apical, embriones albinos, embriones con pérdida de conformación). Sin embargo, en embriones cigóticos los porcentajes de germinación son mayores (80-90% de germinación) (Pech y Ake *et al.*, 2007), debido a que la mayoría de éstos presentan un desarrollo normal, incrementando las posibilidades de germinación para la formación de plántulas, por lo que estudios en embriones cigóticos de cocotero durante su germinación podrían servir como marco de referencia para la germinación de embriones somáticos de cocotero.

Al inicio del proceso de germinación de cocotero en cultivo *in vitro*, el embrión cigótico incrementa paulatinamente su tamaño y peso, observándose aproximadamente en el día 10 la emergencia de la plúmula, seguida de la radícula,

posteriormente el embrión continúa su desarrollo hasta la formación de plántula. En general durante la imbibición de la semilla (en diferentes especies) se incrementan los niveles de ARN mensajeros y posteriormente la síntesis de proteínas (Bray, 1995; Mullen *et al.*, 1996; Bewley, 1997). En el caso de cocotero, desde los primeros días del proceso de la germinación (días 2 y 8) a nivel molecular se observaron, incrementos de la expresión de los genes que intervienen en la regulación del ciclo celular (*CnE2Fs* y *CnCDKA*), así como de los genes que intervienen en el desarrollo (*CnKNOX1* y *CnKNOX2*), ver Figura 7.1.

En diferentes especies que presentan quiescencia se ha observado que en las primeras etapas de la germinación se incrementa la expresión de genes que promueven la división celular (Levi *et al.*, 1992; Georgieva *et al.*, 1994; Sanchez *et al.*, 2005; Gendreau *et al.*, 2008) y aunque el cocotero no presenta una fase de quiescencia (presenta un desarrollo continuo), durante la germinación también se observaron incrementos de la expresión de genes que intervienen en la regulación del ciclo celular, los cuales podrían estar involucrados en promover la proliferación celular durante el proceso.

En cocotero, la adición de AG<sub>3</sub> en el medio de cultivo promovió la germinación de embriones cigóticos (Pech *et al.*, 2007), acelerando e incrementando el porcentaje de embriones germinados. A nivel molecular, la aplicación de AG<sub>3</sub> en embriones cigóticos de cocotero durante la germinación, aumentó y adelantó la expresión de los genes que intervienen en la regulación del ciclo celular (*CnE2Fs* y *CnCDKA*), ver Figura 7.1, lo que sugiere que la acción de AG<sub>3</sub> en la germinación de embriones cigóticos de cocotero es sincronizar y promover la división celular en la germinación. Para

comprobar la aceleración de la división celular durante la germinación de embriones cigóticos de cocotero es importante la realización de estudios que nos permitan monitorear la proliferación celular durante el proceso de germinación, ya que podría ayudar a esclarecer si el incremento en la expresión de genes que intervienen en la regulación del ciclo celular en semillas vivíparas podría estar relacionado con la división celular.

En el caso de los genes *KNOXs* durante la germinación de embriones cigóticos de cocotero, se inhibió la expresión del gen *CnKNOX* clase I (presencia de AG<sub>3</sub>), mientras que el patrón de expresión del gen *CnKNOX2* clase II fue el mismo (tanto en presencia como en ausencia de AG<sub>3</sub>), lo que sugiere que aunque pertenecen a la misma familia (*KNOX*), parecen presentar diferentes mecanismos de regulación y función durante la germinación.



**Figura 7.1** Esquema de la expresión de genes que intervienen en la regulación del ciclo celular (CnE2F1, CnE2F2 y CnCDKA) y genes que intervienen en el desarrollo (CnKNOX1 y CnKNOX2) durante el desarrollo de embriones somáticos y germinación de embriones cigóticos de cocotero, en presencia y ausencia de AG<sub>3</sub>.

## 7.2 Conclusiones generales

Los resultados de esta tesis mostraron que los genes que intervienen en la regulación del ciclo celular (*CnE2F1*, *CnE2F2* y *CnCDKA*) y genes del desarrollo (*CnKNOX1* y *CnKNOX2*) se expresan de manera importante tanto en la embriogénesis somática como en la germinación de embriones cigóticos (Figura 7.1). Por otro lado la adición de ácido giberélico que favoreció ambos procesos estimuló los perfiles de expresión de los genes *CnE2Fs* y *CnCDKA* y *CnKNOX1* (en embriones somáticos), de tal forma que podría estar vinculado con la promoción de la formación de los embriones somáticos, así como en su germinación.

Además, se obtuvieron resultados favorables en el mejoramiento del protocolo de MCE, utilizando el ecotipo Alto del Pacífico Mexicano. La adición de ácido giberélico en el medio de formación de embriones somáticos (medio II) promovió la formación y especialmente el porcentaje de germinación de los embriones somáticos; mientras que la adición de BA en el medio de inducción (medio I) promovió de manera importante la formación y germinación de los embriones somáticos.

El efecto del  $AG_3$  y BA por separado representan un paso importante en el mejoramiento de la eficiencia de la formación y germinación de embriones somáticos. Estas modificaciones deben ser introducidas en el esquema de propagación clonal propuesto por Pérez-Núñez *et al.*, (2006). En un futuro cercano podrían probarse el efecto del BA y  $AG_3$  en conjunto, ya que podría tener un impacto favorable en este esquema en las etapas finales, incrementando de manera importante la germinación y conversión a plántulas.

### 7.3 Bibliografía

- Ashmore SE (1997). Status Report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetic resources International Plants Genetic Resources, Rome, Italy, p 14.
- Bewley JD (1997). Seed germination and dormancy. *The Plant Cell* 9:1055-1066.
- Bleeker AB, Schuette JL, Kende H (1986). Anatomical analysis of growth and developmental patterns of deepwater rice. *Planta* 169:490-497.
- Bray CM (1995). Biochemical processes during the osmopriming of seed. In: Kigel J, Galili G, eds. *Seed development and germination*. New York: Marcel Dekker, 767-789.
- Brown DCW, Finstad KI, Watson EM (1995). Somatic Embryogenesis in Herbaceous Dicots. In: *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture "In vitro Embryogenesis in Plants"*. Volume 20. Thorpe TA (ed). Kluwer Academic Publishers. p. 345-353.
- Butcher DN, Street HE (1960). The effect of gibberellins on the growth of excised tomato root. *J. Exp. Bot.* 11:206-216.
- Chan JL, Saéñz L, Talavera C, Hornung R, Robert M, Oropeza C (1998). Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explant through somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.* 17:515-521.
- Das AB, Rout GR, Das P (1995). *In vitro* somatic embryogenesis from callus culture of the timber yielding tree *Hardwickia binata* Roxb. *Plant Cell Rep.* 15: 147-149.
- Del Pozo JC, López-Matas A, Ramirez-Parra E,

- Gutierrez C (2005). Hormonal control of the cell cycle. *Physiol. Plant.* 123:173-183.
- Dominguez-Castillo E, López-Arroyo JI, Castillo-González RA., Ruíz-Beltrán P (1999). El cocotero *Cocos nucifera* L. Manual para la producción en México. INIFAP. CIRGOC. Campo experimental Huimanguillo. Libro Técnico 6. Tabasco. México. 132 p.
  - FAOSTAT AGRICULTURE DATA 2006. Disponible via DIALOG. <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567>
  - Fehér A, Pasternak TP, Dudits D (2003). Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 74:201-228.
  - Gendreau E, Romaniello S, Barad S, Leymarie J, Benech-Arnold R, Corbineau F (2008). Regulation of cell cycle activity in the embryo of barley seeds during germination as related to grain hydration. *J. Exp. Bot.* 59:203-212.
  - Georgieva EI, López Rodas G, Hittmair A, Feichtinger H, Brosch G, Loidl P (1994). Maize embryo germination. *Planta* 192:118-124.
  - Haensch K-T (2007). Influence of 2,4-D and BAP on callus growth and the subsequent regeneration of somatic embryos in long-term cultures of *Pelargonium x domesticum* cv. Madame Loyal. *Electron. J. Biotechnolog.* 10: 71-77.
  - Hemerly AS, Ferreira PCG, Van Monague M, Inze D (1999). Cell cycle control and plant morphogenesis: is there an essential link?. *BioEssay* 21:29-37.
  - Hita O, Lafarga C, and Guerra H (1997). Somatic embryogenesis from chickpea (*Cicer arietium* L.) immature cotyledons: The effect of zeatin, gibberellic

- acid and indole-3-butyric acid. *Acta Physiol. Plant.* 19:333-338.
- Hjortswang HI, Filonova LH, Vahala T, von Arnold S (2002). Modified expression of the Pa18 gene interferes with somatic embryo development in *Norway spruce*. *Plant Growth Reg.* 38:75-82.
  - Jouannic S, Collin M, Vidal B, Verdeil JL, Treger W (2007). A class I *KNOX* gene from the palm species *Elaeis guineensis* (Arecaceae) is associated with meristem function and a distinct mode of leaf dissection. *New Phytol.* 174:551-568.
  - Laux T, Würschum T, Breuninger H (2004) Genetic Regulation of Embryonic Pattern Formation. *The Plant Cell* 16:S190–S202, Supplement
  - Laufs P, Grandjean O, Jonak C, Kieu K, Traas J (1998). Cellular parameters of the shoot apical meristem in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10:1375-1390.
  - Levi M, Pasini E, Brusa P, Chiatante D, Sgorbati S, Sparvoli E (1992). Culture of Pea Embryo Axes for studies on the reactivation of the cell cycle at germination. *In vitro Cell. Dev. Biol.* 28P: 20-24.
  - Ma H, McMullen MD, Finer JJ (1994). Identification of a homeobox-containing gene with enhanced expression during soybean (*Glycine max* L.) somatic embryo development. *Plant Mol. Biol.* 24:465-473.
  - Martin KP (2004). Plant regeneration protocol of medicinally important *andrographis paniculata* (Burm. F.) wallich ex nees via somatic embryogenesis. *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant* 40:204-209.
  - Meijer M, Murray JAM (2001). Cell cycle controls and the development of plant form. *Curr. Opin. Plant Biol* 4:44-49.
  - Merkle SA, Parrott WA, Flinn BS (1995). Morphogenic

- aspects of Somatic Embryogenesis. In Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture "In vitro Embryogenesis in Plants". Volume 20. Thorpe TA (ed). Kluwer Academic Publishers. p. 173.
- Métraux J-P, Kende H (1983). The role of ethylene in the growth response of submerged deep water rice. *Plant Physiol.* 72:441-446.
  - Mullen RT, King JE, Gifford DJ (1996). Changes in mRNA populations during loblolly pine (*Pinus taeda*) seed stratification, germination and post-germinative growth. *Physiol. Plant.* 97:545-553.
  - Pech y Aké A, Maust B, Orozco Segovia A, Oropeza C (2007). Effect of gibberellic acid on the *in vitro* germination of coconut zygotic embryos and their conversion into plantlets. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 43:247-253.
  - Pérez-Nuñez MT, Chan JL, Sáenz L, González T, Verdeil JL and Oropeza C (2006). Improved somatic embryogenesis from *Cocos nucifera* (L.) Plumule explants. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 42:37-43.
  - Rudus I, Kepczynska E, Kepczynski J (2000). Regulation of *Mendicago sativa* L. somatic embryogenesis by gibberellins. *Plant Growth Regul.* 36:91-95.
  - Saézn L, Azpeitia A, Chuc-Armendariz B, Chan JL, Verdeil JL, Hocher V, Oropeza C (2006). Morphological and histological changes during somatic embryo formation from coconut plumule explant. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 42:19-25.
  - Sánchez MP, Gurusinghe SH, Bradford KJ, Vázquez-Ramos JM (2005). Differential response of PCNA and Cdk-A proteins and associated kinase activities to benzyladenine and abscisic acid during maize seed germination. *J. Exp. Bot.* 56:515-523.

- Sauter M, Kende H (1992). Gibberellin-induced growth and regulation of the cell division cycle in deepwater rice. *Plant* 188:362-368.
- Shininger TL (1975). The morphological, anatomical and cytological effects of gibberellins. In: *Gibberellins and Plant Growth*. Ed. Krishnamoorthy HN. New York: John Wiley and Sons. p. 203-219.
- Teo WL, Kumar P, Goh CJ, Swarup S (2001). The expression of *Brostm*, a *KNOTTED1-like* gene, marks the cell type and timing of *in vitro* shoot induction in *Brassica oleracea*. *Plant Mol. Biol.* 46:567-580.
- Verdeil JL, Huet C, Grosdemange F, Buffard-Morel J (1994). Plant regeneration from cultured immature inflorescence of coconut (*Cocos nucifera* L.): evidence for somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.* 13:218-221.
- Vernoux T, Wilson RC, Seeley Ka, Reichheld JP, Muroy S, Brown S, Maughan SC, Cobbett CS, Van Montagu M, Inze D, May MJ, Sung ZR (2000). The rootmeristemless 1/cadmium sensitive2 gene defines a glutatione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of the cell division during postembryonic root. *Plant Cell* 12: 97-110.
- Zhang S, Wong L, Meng L, Lemaux PG (2002). Similarity of expression patterns of *knotted1* and *ZmLEC1* during somatic and zygotic embryogenesis in maize (*Zea mays* L.). *Planta* 215:191-194
- Zizumbo D, Fernandez M, Torres N, Cardeña R (1999). Lethal yellowing resistance in coconut germplasm from México. In: *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*. Oropeza C., Verdeil JL., Asburner R, Cardeña R, Santamaría JM (eds.). Kluwer Academic Publishers Netherlands. P 131-143.

