



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**DESARROLLO DE UN PROTOCOLO PARA LA
COLECTA, EXTRACCIÓN Y CONSERVACIÓN DE
MUESTRAS DE ADN DE COCOTERO (*Cocos
nucifera* L.) PARA ESTUDIOS GENÉTICOS
BASADOS EN MARCADORES MOLECULARES**

Tesis que presenta

DAMARIS GUADALUPE ORTEGÓN RIVERO

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

Mayo de 2013





Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Programa en Ciencias Biológicas

DESARROLLO DE UN PROTOCOLO PARA LA
COLECTA, EXTRACCIÓN Y CONSERVACIÓN DE
MUESTRAS DE ADN DE COCOTERO (Cocos
nucifera L.) PARA ESTUDIOS GENÉTICOS
BASADOS EN MARCADORES MOLECULARES

Tesis que presenta

DAMARIS GUADALUPE ORTEGÓN RIVERO

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

Mayo de 2013



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



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado "DESARROLLO DE UN PROTOCOLO PARA LA COLECTA, EXTRACCIÓN Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS DE ADN DE COCOTERO (*Cocos nucifera* L.) PARA ESTUDIOS GENÉTICOS BASADOS EN MARCADORES MOLECULARES" fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Carlos Oropeza Salín, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Felipe A. Vázquez Flota

Coordinador de docencia

Centro de Investigación Científica de Yucatán, AC.

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO, MAYO DEL 2013.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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



IBQ. Damaris Guadalupe Ortegón Rivero

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por la beca mensual con número 254753 otorgada durante estos dos años de la maestría.

Al proyecto **Common Fund for Commodities (CFC) Ámsterdam Clave FIGOOF/22**, por los fondos brindados para llevar a cabo este proyecto de investigación.

Al **Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY)**, por todas las facilidades otorgadas en el uso de sus instalaciones para el desarrollo de este trabajo, en especial a la unidad de Biotecnología y al laboratorio de cocotero.

Al **Dr. Carlos Oropeza Salín** por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por la confianza brindada para el desarrollo de este proyecto, por todo su apoyo y guía para mi formación en la investigación y por su trato siempre amable y cordial.

A mis asesores, el **Dr. Carlos Oropeza Salín** y el **Dr. Daniel Zizumbo Villarreal** por todos sus conocimientos transmitidos, por los buenos consejos brindados y por todo su valioso tiempo, paciencia y dedicación para la revisión de la tesis. ¡Muchas Gracias!

A los miembros de mi comité tutorial conformado por el **Dr. Luis Sáenz Carbonell** y el **Dr. Gabriel Lizama Uc**, por sus valiosos comentarios y observaciones realizadas en cada tutorial.

A mi comité revisor, **Dr. Felipe Sánchez Teyer**, **Dr. Luis Sáenz Carbonell** y el **Dr. Gabriel Lizama Uc**, por los valiosos comentarios y sugerencias aportados para la realización de este documento.

Al **Dr. Felipe Sánchez Teyer**, por la colaboración brindada y por permitirme usar el secuenciador ubicado en el laboratorio de Marcadores Moleculares y Genómica Funcional para llevar a cabo los análisis finales de la tesis. ¡Muchas Gracias!

A la **M. en C. María Narváez**, por toda la asesoría brindada en el laboratorio, por su valioso tiempo y dedicación en la revisión de la tesis, por sus observaciones y comentarios que fueron de gran importancia para concluirla. ¡Gracias Mari!

A la **Ing. Bioq. Ana María Collí** por todo su apoyo en el laboratorio, especialmente por la asesoría en la realización de la técnica de PCR con microsátélites; por tu linda amistad y confianza que siempre me brindaste. ¡Gracias amiga!

A la **M. en C. Adriana Quiroz Moreno**, por su valioso apoyo y asesoría en el uso del secuenciador y en el análisis de resultados; por su paciencia, dedicación, por los conocimientos transmitidos y sobre todo por darme la confianza de trabajar en el laboratorio. ¡Gracias por todo Adrianita!

Al **M. en C. Víctor Canché Ek**, por su valiosa ayuda en la realización de los análisis genéticos, por su tiempo y la asesoría brindada en los programas bioinformáticos. ¡Muchas Gracias!

A la **Biol. Verónica Limones** por sus observaciones y comentarios realizados en el documento y por su trato siempre amable y gentil.

A todos mis compañeros del laboratorio de cocotero, al M. en C. Ivan, Dr. Celso, Yajima, Nayeli, Gaby, Ana, Candy, Gorety, Carlos, German, Gustavo, Luis y Rafael, gracias por su amistad y por los lindos momentos vividos durante estos dos años.

DEDICATORIAS

A **Dios**, por la vida, salud, y por ser mi fortaleza y mi escudo en los momentos difíciles de mi vida. "En donde esta Dios no hay derrota y el está aquí conmigo porque yo siempre estoy con él".

A mis padres, **Mildret y Manuel** por todo su cariño y amor que siempre me han brindado y por apoyarme en las metas que tengo en la vida, gracias a ustedes y a su incondicional apoyo hoy cumpla una meta más en mi vida profesional. ¡Muchas Gracias!

A mis hermanos **Natanael y Jorge** por ser los mejores hermanos y amigos. ¡Gracias por todo su cariño!

A mis tíos **José y Marita** por su gran apoyo y confianza que me han brindado para que pueda realizar esta meta que hoy termino satisfactoriamente, son favores que nunca voy a olvidar. ¡Gracias tíos!

A mi tía **Jacqueline** por su apoyo incondicional y por todo su cariño, amistad y por estar ahí cuando más la necesito. ¡Gracias tía!

A **Manuel**, gracias por estar siempre a mi lado en las buenas y en las malas, dándome tu cariño, amor, comprensión; te agradezco por apoyarme en mis metas y por seguir creciendo juntos profesionalmente, gracias también por tu valioso apoyo en la realización de la tesis.

A mis amigas de generación, **Ale, Lilia, Gloria, Yajima, Yamili, Ariana y Fátima** gracias chicas por brindarme su linda amistad y por compartir momentos inolvidables a su lado.

A mi gran amiga **Ale**, gracias por tu linda amistad, gracias por todo tu apoyo y por las observaciones que fueron importantes en la realización de la tesis, eres una persona muy valiosa. ¡Gracias amiga!

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE CUADROS	XI
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
CAPÍTULO I	7
1.1 ANTECEDENTES GENERALES	7
1.1.1 Descripción del cocotero.....	7
1.1.2 Importancia económica.....	9
1.1.3 Variedades del cocotero.....	12
1.1.4 Variedades de cocotero presentes en México.....	12
1.1.5 Problemática del cocotero en México.....	13
1.1.6 Amarillamiento Letal del cocotero (AL).....	14
1.1.7 Alternativa de solución.....	16
1.1.8 Métodos de caracterización molecular.....	17
1.1.8.1 Tipos de marcadores.....	18
1.1.8.2 Aplicación de los marcadores moleculares.....	19
1.1.8.3 Microsatélites o SSR (Secuencias Simples Repetitivas).....	20
1.1.8.4 Estudios en cocotero empleando microsatélites.....	22
1.1.8.5 Análisis genéticos utilizando datos moleculares.....	23
1.1.9 Problemática a estudiar.....	24
1.1.9.1 Problemática para la colecta de hoja.....	24
1.1.9.2 Alternativa al uso de hojas.....	24
1.1.9.3 Conservación y transporte de muestras cruzando fronteras.....	25
1.1.9.4 Alternativas para la conservación y el transporte de tejidos.....	25
1.1.9.5 Tarjetas FTA®.....	26
1.1.10 Secuenciadores automáticos capilares.....	27
1.1.10.1 Sistema para análisis genético CEQ™ 8800.....	28
1.2 PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	31

1.3 OBJETIVOS	31
1.3.1 Objetivo general.....	31
1.3.2 Objetivos específicos.....	31
1.4 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	32
1.5 REFERENCIAS	33

CAPITULO II. EVALUACIÓN COMPARATIVA DEL ANÁLISIS GENÉTICO CON MICROSATÉLITES A PARTIR DE ADN DE HOJA Y TRONCO

2.1 INTRODUCCIÓN	43
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	45
2.2.1 Colecta del material.....	45
2.2.2 Extracción y purificación de ADN.....	45
2.2.2.1 Protocolo del Kit ChargeSwitch®.....	46
2.2.3 Cuantificación de ADN.....	47
2.2.4 Amplificación por PCR.....	47
2.2.5 Electroforesis capilar.....	49
2.2.6 Obtención de datos.....	50
2.2.7 Análisis genéticos utilizando datos moleculares.....	50
2.2.7.1 Análisis de relaciones genéticas.....	50
2.2.8 Pruebas preliminares con microsatélites empleando el Kit de ChargeSwitch.....	50
2.2.9 Estandarización de la electroforesis capilar con los iniciadores WellRED.....	51
2.3. RESULTADOS	52
2.3.1 Comparación de los tres protocolos para la obtención de ADN de hoja y tronco.....	52
2.3.2 Pruebas preliminares con microsatélites empleando el Kit de ChargeSwitch y el secuenciador ABI 310.....	54
2.3.3 Estandarización de la electroforesis capilar con los iniciadores WellRED.....	56

2.3.4 Análisis genético utilizando datos moleculares obtenidos de muestras de hoja y tronco con fines comparativos.....	59
2.4 DISCUSIÓN.....	65
2.5 CONCLUSIONES.....	69
2.6 REFERENCIAS.....	70

CAPÍTULO III. EVALUACIÓN DEL USO DE TARJETAS FTA PARA LA CONSERVACIÓN DE MUESTRAS DE ADN DE TRONCO

3.1 INTRODUCCIÓN.....	75
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	77
3.2.1 Colecta de material.....	77
3.2.2 Aplicación de ADN a tarjetas FTA.....	77
3.2.2.1 Protocolo de tarjetas FTA.....	78
3.2.3 Cuantificación de ADN.....	79
3.2.4 Amplificación por PCR.....	79
3.2.5 Electroforesis capilar.....	80
3.2.6 Obtención de datos.....	80
3.2.7 cuantificación de ADN de discos eluidos.....	80
3.2.8 Pruebas preliminares con microsatélites empleando tarjetas FTA y el secuenciador ABI 310.....	81
3.2.9 PCR-tiempo real empleando discos y elución.....	81
3.2.10 Evaluación comparativa de dos tratamientos de elución con PCR convencional y PCR tiempo real.....	82
3.2.11 PCR tiempo real usando el equipo Rotor GeneQ.....	83
3.2.12 Análisis genéticos utilizando datos moleculares obtenidos de muestras de tejido de tronco aplicado en tarjetas FTA.....	83
3.3 RESULTADOS.....	84
3.3.1 Aplicación de ADN a tarjetas FTA.....	84
3.3.2 Cuantificación de ADN de discos eluidos.....	85
3.3.3 Pruebas preliminares con microsatélites empleando tarjetas FTA y el secuenciador ABI 310.....	86

3.3.4 Análisis comparativo de las muestras extraídas con el kit y tarjetas FTA con los iniciadores A3 y B12.....	88
3.3.5 PCR-tiempo real empleando discos y elución.....	90
3.3.6 Evaluación comparativa de dos tratamientos de elución con PCR convencional y PCR tiempo real.....	91
3.3.7. PCR tiempo real usando el equipo Rotor GeneQ.....	94
3.3.8 Análisis genéticos utilizando datos moleculares obtenidos de muestras de tejido de tronco con tarjetas FTA y Kit de ChargeSwitch..	95
3.4 DISCUSIÓN.....	98
3.5 CONCLUSIONES.....	101
3.6 REFERENCIAS.....	102
 CAPITULO IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES	
4.1 DISCUSIÓN GENERAL.....	105
4.2 CONCLUSIONES GENERALES.....	108
4.3 PERSPECTIVAS.....	108
4.4 REFERENCIAS.....	109
 ANEXOS.....	 111

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Alto del Atlántico
ADN	Acido desoxirribonucleico
AFLP	Polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados
AL	Amarillamiento letal
AP	Alto del Pacífico
CD	Codominantes
CIRAD	Centre Internationale de Recherches en Agronomie pour le Développement
CTAB	Bromuro de cetil trimetilamonio
D	Dominantes
D1	ChargeSwitch ® Detergent
EMA	Enano Malayo Amarillo
FTA	Flinders Technology Associates
H-W	Hardy-Weinberg
ISSR	Secuencia entre repeticiones simples o secuencia entre microsatélites
MXPTC	Alto del Pacífico de Colima
MXPTG	Alto del Pacífico de Guerrero
MXPTM	Alto del Pacífico de Michoacán
MYD	Enano Amarillo Malayo
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RAPD	ADN Polimórfico amplificado al azar
RFLP	Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción
SNP	Polimorfismo en un solo nucleótido
SSR	Secuencias Simples Repetidas
UPGMA	Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages
WAT	Alto Oeste Africano

11

7

7

7

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPITULO I

- Figura 1.1** Palmas de cocotero (Chan y Elevitch, 2006)..... 7
- Figura 1.2** Algunos productos obtenidos a partir de la palma de cocotero (Tan *et al.*, 2004; delos Reyes, 2007; Lao, 2008).....11
- Figura 1.3** Mortalidad total acumulada por ecotipo debido a la enfermedad del Amarillamiento Letal en San Crisanto, Yucatán, México (Zizumbo *et al.*, 2008)..... 14
- Figura 1.4** Fitoplasma causante del AL (izquierda), vector del AL (medio), palma enferma con AL (derecha)..... 15
- Figura 1.5** Cronología de síntomas del AL en la palma de coco. A). Caída prematura de los frutos; B). Inflorescencia necrótica; C). Clorosis y senescencia de las hojas más viejas; D). Clorosis de las hojas jóvenes y necrosis de la espata; E). Estado avanzado, caída de la corona de hojas quedando el tronco desnudo (poste telefónico) (McCoy *et al.*, 1982)..... 16
- Figura 1.6** Microsatélites, ejemplo de un dinucleótido (AC)_n (Aranguren *et al.*, 2005).. 20
- Figura 1.7** Obtención de tejido (tronco). A) Perforación de un orificio para la obtención de tejido de donde se extraerá ADN. B) Los tejidos son recibidos en una bolsa de polietileno evitando el contacto de estos con las manos..... 24
- Figura 1.8** A) Kit de FTA para plantas. B) Tarjeta FTA clásica. C) microfotografía electrónica que muestra el ADN atrapado en la matriz de FTA (ampliación x 10 000) (Whatman. FTA® protocols, 2002)..... 27
- Figura 1.9** Secuenciador CEQ™ 8800 de Beckman Coulter..... 29

CAPITULO II

- Figura 2.1** A) MagnaRack™ B) Pastilla de perlas magnéticas que se forma a un lado de cada tubo y permite una fácil extracción del sobrenadante. C) Perlas magnéticas..... 47

- Figura 2.2** Geles de agarosa que muestran ADN extraído de hoja y tronco con tres diferentes protocolos. M: marcador molecular de 1 kb (invitrogen). Carriles del 1 al 5: ADN de 5 individuos de la variedad Enano Malayo Amarillo. La flecha roja indica el ADN extraído..... 52
- Figura 2.3** Electroforesis en gel de agarosa al 3% del producto amplificado obtenido con el ADN extraído con el Kit de ChargeSwitch. M: marcador de 100pb (invitrogen). Carriles de 1 a 4: producto de PCR con 1µl de ADN. Carriles de 5 a 8: producto de PCR con 2µl de ADN..... 54
- Figura 2.4** Imagen del gel obtenido con electroforesis capilar. Se muestran los fragmentos amplificados con los iniciadores A3 y B12 con dos muestras: WAT 2 y G4-171 (muestra obtenida con el kit de ChargeSwitch)..... 55
- Figura 2.5** Imagen del gel obtenido con electroforesis capilar con el software GeneMarker. La corrida se realizó con los iniciadores A3 y C7 (bandas azules), B12 y H4 (bandas verdes)..... 57
- Figura 2.6** Electroferogramas en el que se compara el resultado que se obtiene con el iniciador A3, con un alelo de 230 pb para ambos tejidos. La presentación homocigota de los alelos se muestra respectivamente..... 57
- Figura 2.7** Electroferogramas en el que se compara el resultado que se obtiene con el iniciador B12, con un alelo de 160 pb para ambos tejidos. La presentación homocigota de los alelos se muestra respectivamente..... 58
- Figura 2.8** Electroferogramas en el que se compara el resultado que se obtiene con el iniciador C7, con dos alelos uno de 167 pb y otro de 169 pb para ambos tejidos. La presentación heterocigota de los alelos se muestran respectivamente..... 58
- Figura 2.9** Electroferogramas en el que se compara el resultado que se obtiene con el iniciador H4, con un alelo de 230 pb para ambos tejidos. La presentación homocigota de los alelos se muestra respectivamente..... 59
- Figura 2.10** Dendograma de análisis de poblaciones basado en las distancias genéticas de Nei *et al.*, (1978) y el método de agrupamiento UPGMA en dos poblaciones de cocotero (WAT y EMA): se emplearon cinco muestras de la variedad Alto Oeste Africano (WAT) y cinco muestras de la variedad Enano Malayo Amarillo (EMA) para ambas variedades se usaron los

	tejidos de hoja y tronco extraídos con el Kit de ChargeSwitch con fines comparativos.....	61
Figura 2.11	Dendograma de análisis de poblaciones basado en las distancias genéticas de Nei <i>et al.</i> , (1978) y el método de agrupamiento UPGMA en siete poblaciones de cocotero: Alto Oeste Africano (WAT), Enano Malayo Amarillo (EMA) y cinco variedades de México: MXPTC, MXPTG, MXPTM, MXAT y EMA (pertenecientes a la base de datos CIRAD).....	63
Figura 2.12	Dendograma de análisis de poblaciones basado en las distancias genéticas de Nei <i>et al.</i> , (1978) y el método de agrupamiento UPGMA en siete poblaciones de cocotero: Alto Oeste Africano (WAT) y Enano Malayo Amarillo (EMA) utilizando tejido de tronco, comparadas con cinco variedades de México: MXPTC, MXPTG, MXPTM, MXAT y EMA (pertenecientes a la base de datos CIRAD).....	64
CAPITULO III		
Figura 3.1	Cinética de la reacción de PCR tiempo real. Columna 1: forma de aplicación de ADN de tronco a tarjetas FTA. Columna 2: No. de muestras. Columna 3: CT y desviación estándar. (+) Control positivo. (-) Control negativo.....	84
Figura 3.2	Electroforesis en gel de agarosa al 3% del producto de amplificación obtenido con el ADN extraído de la tarjeta FTA. M: marcador de 100pb (invitrogen). Carriles de 1 a 4: producto de PCR con 1µl de ADN. Carriles de 5 a 8: producto de PCR con 2µl de ADN.....	86
Figura 3.3	Imagen del gel obtenido con electroforesis capilar. Se muestran los fragmentos amplificados con los iniciadores A3 y B12 de dos muestras: WAT 2 y G4-171 (muestra obtenida con tarjetas).....	87
Figura 3.4	Imagen del gel obtenido con electroforesis capilar. Se muestran los fragmentos amplificados con los iniciadores A3 y B12 de tres muestras: WAT 2 y G4-171 extraído con el kit y G4-171 extraído con tarjetas FTA....	89
Figura 3.5	Valores de CT obtenidos y cinética de la reacción de PCR tiempo real. Muestras del 1 al 5: discos eluidos. Muestras de la 6 a la 10: elución. N/A: no amplifico.....	90

- Figura 3.6** Electroforesis del gel con discos. M: Marcador de 1 Kb. Carril 1 al 3: disco directo (sin eluir). Carril 4 al 6: disco eluido (tratamiento I). Carril 7 al 9: disco eluido (tratamiento II). Control positivo (+). Control negativo (-).....91
- Figura 3.7** Electroforesis del gel con eluciones. M: Marcador de 1 Kb. Carril 4 al 6: elución (tratamiento I). Carril 7 al 9: elución.....91
- Figura 3.8** Valores de CT obtenidos y cinética de la reacción de PCR tiempo real. Muestras 4 a la 6: elución (tratamiento I). Muestras 7 a la 9: elución (tratamiento II). Control positivo y control negativo.....92
- Figura 3.9** Imagen representativa de los productos amplificados de los discos lavados. A) Primer lavado. B) Segundo lavado. C) Tercer lavado. D) Cuarto lavado. Incisos A al D: M, marcador molecular de 1 kb; carril 1 al 3, discos eluidos (tratamiento I); carril 4 al 6, discos eluidos (tratamiento II)... 93
- Figura 3.10** Dendograma de análisis de poblaciones basado en las distancias genéticas de Nei *et al.*, (1978) y el método de agrupamiento UPGMA en dos poblaciones de cocotero (WAT y EMA): se emplearon cinco muestras de la variedad Alto Oeste Africano (WAT) y cinco muestras de la variedad Enano Malayo Amarillo (EMA) para ambas variedades se usaron los tejidos de tronco extraídos con tarjetas FTA y con el Kit de ChargeSwitch con fines comparativos..... 97

ÍNDICE DE CUADROS

CAPITULO I

- Cuadro 1.1** Nombre y secuencia de los marcadores microsatelitales específicos para cocotero (Baudouin y Lebrun, 2002)..... 22
- Cuadro 1.2** Estudios realizados en cocotero empleando microsátélites a partir de tejido de hoja..... 23

CAPITULO II

- Cuadro 2.1** Secuencia de los iniciadores que serán empleados en la mezcla de reacción para PCR (Baudouin y Lebrun, 2002)..... 48
- Cuadro 2.2** Patrones microsatelitales. Nombre y tamaño de alelos de 14 iniciadores con dos muestras testigo: Alto Oeste Africano (T1) y Enano Malayo Amarillo (T2) son muestras estándares para determinar el tamaño del alelo..... 49
- Cuadro 2.3** Cuantificación de las muestras de ADN de hoja y tronco de cocotero de la variedad Enano Malayo Amarillo (EMA) extraídos con el Kit de ChargeSwitch. Cantidad de ADN (ng/μl). Absorbancias a 260/230 nm y 260/280 nm indican la pureza de ADN..... 53
- Cuadro 2.4** Muestras y alelos obtenidos con los iniciadores A3 y B12..... 56
- Cuadro 2.5** Individuos y tamaño de alelos obtenidos con 8 iniciadores en dos poblaciones de cocotero (WAT y EMA) para ambas variedades se emplearon los tejidos de hoja y tronco..... 60
- Cuadro 2.6** Código, individuos y tamaños de alelos reportados con 8 iniciadores para las poblaciones de CIRAD y alelos obtenidos con las muestras WAT y EMA empleando tejido de hoja.....62

CAPITULO III

- Cuadro 3.1** Promedio de la cuantificación de las eluciones obtenidas con los tres métodos de aplicación de extracto a tarjetas FTA. Cantidad de ADN (ng/μl). Absorbancias a 260/ 230 nm y 260/ 280 nm indican la pureza de ADN..... 85

Cuadro 3.2	Promedio de la cuantificación de ADN de las eluciones obtenidas con los dos tipos de pruebas. Columna 1: parámetros de medición. Columna 2: prueba con dos discos. Columna 3: prueba con 10 discos.....	85
Cuadro 3.3	Muestras y alelos obtenidos con los iniciadores A3 y B12.....	88
Cuadro 3.4	Alelos obtenidos con los iniciadores A3 y B12 de las muestras control y de las muestras obtenidas con el Kit de ChargeSwitch y tarjetas FTA.....	89
Cuadro 3.5	Valores de CT obtenidos de la reacción de PCR tiempo real con el Rotor GeneQ empleando la elución, discos eluidos y discos directos.....	94
Cuadro 3.6	Valores de CT obtenidos de la reacción de PCR tiempo real con el Rotor GeneQ empleando la elución.....	95
Cuadro 3.7	Individuos y tamaño de alelos obtenidos con 8 iniciadores en dos poblaciones de cocotero (WAT y EMA) para ambas variedades se empleó el tejido de tronco extraído con tarjetas FTA y el Kit de ChargeSwitch.....	96

RESUMEN

Los marcadores moleculares tipo microsatélites o SSR (Secuencias Simples Repetidas) han demostrado ser una herramienta útil en la realización de diversos estudios, entre los que se encuentran el análisis de la diversidad y relaciones genéticas (Lebrun *et al.*, 1998; Baudouin y Lebrun, 2002; Meerow *et al.*, 2003; Perera *et al.*, 2000; 2001; 2003; Rajesh *et al.*, 2008). Para *Cocos nucifera* L. se utiliza una metodología a partir de muestras de tejido de hoja de plantas adultas. Sin embargo, dado que las palmas adultas son muy altas, en particular para ciertos ecotipos, se dificulta mucho la colecta de muestras gastando mucho tiempo y recursos. Por otro lado, los estudios requieren de transportar muestras de un país, bajo requerimientos fitosanitarios estrictos. El presente trabajo por tanto se realizó para evaluar: (a) la posibilidad del uso del tejido obtenido de la base del tronco de cocotero para la obtención de muestras de ADN y (b) el uso de tarjetas FTA (Flinders Technology Associates) como medio de colecta, transporte y conservación de ADN para su posterior uso en estudios genéticos con SSR. Los resultados obtenidos en el presente trabajo se realizaron por medio de la técnica de electroforesis capilar y en base a los análisis bioinformáticos se pudo observar el mismo resultado al emplear el tejido de tronco como el tejido de hoja como fuente de ADN para análisis genético. De igual manera con el tejido de tronco aplicado en tarjetas FTA, se obtuvo buenos resultados al ser comparado con un kit comercial. En cocotero es el primer estudio que reporta el empleo de tejido de tronco como fuente de ADN para análisis con marcadores moleculares y el uso adicional de tarjetas FTA como un método conveniente para la colecta, extracción, transporte y conservación de ADN de cocotero y para la realización de futuros análisis genéticos de la especie.

,

,

,

ABSTRACT

The microsatellite molecular markers or SSR (Simple Sequence Repeats) have proven to be a useful tool in several studies, among which are the diversity analysis and genetic relationships (Baudouin and Lebrun, 2002; Lebrun *et al.*, 1998; Meerow *et al.*, 2003; Perera *et al.*, 2000, 2001, 2003; Rajesh *et al.*, 2008). For *Cocos nucifera* L. methodology to obtain samples is based on the use of leaf tissue of adult plants. However, given that the adult palms are very tall, especially for certain tall ecotypes samples collection is very difficult, spending considerable time and resources. Furthermore, studies require transporting samples from country to country, under strict phytosanitary requirements. The present study was therefore undertaken to assess: (a) the possibility of using tissue from the coconut trunk base to obtain DNA samples; and (b) the use of FTA cards (Flinders Technology Associates) as a means for collection, transportation and storage of DNA for subsequent use in genetic studies with SSR. The results obtained in this study were performed using a capillary electrophoresis technique; and based on bioinformatics analysis it was observed the same results when using either trunk tissue or leaf tissue as the source of DNA for genetic analysis. Similarly, using FTA cards with trunk tissue samples, good results were obtained when compared with a commercial kit. This is the first study to report the use of coconut trunk tissue as a source of DNA for molecular marker analysis and the additional use of FTA cards as a convenient method for the collection, extraction, transportation and storage of DNA coconut and for conducting future genetic analysis of the species.

INTRODUCCIÓN

El cocotero (*Cocos nucifera* L.) es una especie de gran importancia económica, la predominancia de este cultivo se acentúa en las zonas costeras tropicales (Harries, 1978; 2000). La palma de coco ha sido de gran utilidad al humano desde hace más de 10,000 mil años, como fuente de diversos satisfactores tales como alimento, bebida, techo, fibra, azúcar, madera, alcohol, combustible, aceite y utensilios domésticos, refiriéndose a él en numerosas culturas como “el árbol de los mil y un usos”, o el “árbol de la vida” (Ohler, 1984; Chan y Elevitch, 2006; CONACOCO, 2011).

Desafortunadamente, la palma de cocotero está sujeta al ataque de agentes que producen diversas enfermedades y que afectan su producción y pueden ser letales, entre los que se encuentran; virus (Rohde *et al.*, 1990), viroides (Hanold y Randles, 1991), protozoos (Parthasarathy *et al.*, 1978), hongos (Joseph *et al.*, 1975), nematodos (Griffith, 1987) y mollicutas como el fitoplasma causante del amarillamiento letal (AL) (Howard y Barrant, 1989). Debido a su largo ciclo de vida de la palma, su tasa evolutiva es muy baja en comparación a la tasa evolutiva de los micro-organismos, lo cual requiere la intervención de los humanos para acelerar su evolución en términos de posibilitar su adaptación al ambiente (Howard y Harrison 2007).

En México como en otros países de América latina y el Caribe el AL es el problema fitosanitario más grave que enfrentan los cultivadores de cocotero pues es una enfermedad devastadora. La problemática del AL ha provocado la necesidad de establecer programas de mejoramiento con el fin de generar amplia variabilidad genética así como formar variedades resistentes a la enfermedad y con alta productividad para utilizarlas en la replantación de las áreas afectadas, dado que esta es la mejor estrategia probada para combatir la enfermedad (Oropeza y Zizumbo-Villarreal, 1995; Zizumbo-Villarreal *et al.*, 1999; Zizumbo-Villarreal *et al.*, 2006).

Para enfrentar la problemática anterior, es indispensable tanto conocer el material genético del que se dispone en el país, como definir el germoplasma suplementario y definir las estrategias de mejoramiento como de conservación del germoplasma. Como

herramienta importante se han planteado a los marcadores moleculares para realizar estas tareas. Para el cocotero se han desarrollado marcadores microsatelitales específicos (Rivera *et al.*, 1999; Baudouin y Lebrun, 2002) que han demostrado ser útiles en estos estudios. Esta metodología se implementó a partir del uso del tejido de hoja de plantas adultas como fuente de ADN, desafortunadamente el uso de este tejido presenta algunos problemas: dificultad para acceder a la copa, riesgo de accidentes, dificultad de encontrar quien realice la colecta, es costoso y se invierte mucho tiempo. Esto podría evitarse si en lugar de coleccionar tejido de hoja se coleccionara el tejido de la base del tronco.

De igual manera otras dificultades que se presentan son la conservación y el transporte de muestras a través de fronteras. El transporte de tejidos de un país a otro, cada vez es más difícil debido a: (1) los permisos fitosanitarios para introducir tejidos a nuestro país, a veces son muy difíciles de obtener, (2) los certificados fitosanitarios y permisos para sacar tejidos del país de origen de las muestras, a veces son muy difíciles de obtener. En cuanto a conservación de las muestras, los viajes de colecta suelen ser largos y hacen difícil la conservación adecuada de las muestras; por lo que en este trabajo se propone el uso de tarjetas FTA (Flinders Technology Associates) ya que es una simple tecnología que reduce las etapas de colecta de ADN, transporte, purificación y almacenamiento y, por consiguiente, reduce el costo y el tiempo requerido para procesar el ADN (Mbogori *et al.*, 2006).

En base a lo descrito anteriormente, en el presente trabajo se propone evaluar la posibilidad del uso del tejido obtenido de la base del tronco de cocotero para la obtención de muestras de ADN y el uso de tarjetas FTA (Flinders Technology Associates) como medio de colecta, transporte y conservación de ADN para su posterior uso en estudios genéticos basados en marcadores moleculares.

CAPÍTULO I

1.1 ANTECEDENTES GENERALES

1.1.1 Descripción del cocotero

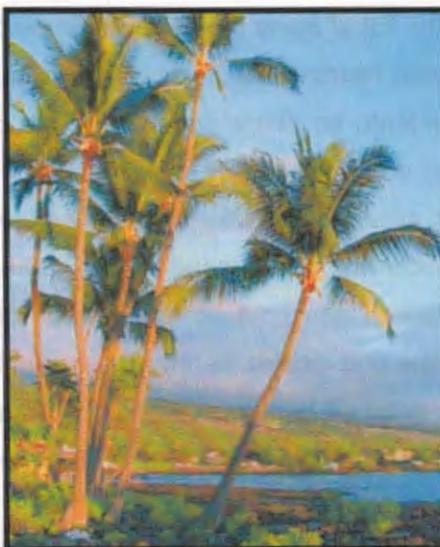


Figura 1.1 Palmas de cocotero (Chan y Elevitch, 2006).

La palma de coco (figura 1.1) ha sido dispersada en toda el área intertropical del mundo por los humanos, particularmente en los últimos 500 años. Su nombre científico es *Cocos nucifera* y se deriva de la palabra portuguesa “coco” que significa “cara de mono”. En un tiempo, los científicos reconocieron casi sesenta especies dentro del género *Cocos* pero actualmente se acepta que el género es monoespecífico. Por consiguiente, todos los cocoteros del mundo son taxonómicamente la misma especie, es decir que plantas de todas las poblaciones distribuidas en el mundo pueden presentar descendencia fértil al entrecruzarse (Rosengarten, 1986).

El cocotero pertenece a la familia *Arecaceae*, subfamilia *Arecoideae*, tribu *Cocoideae*, subtribu *Butinae*, género *Cocos* y especie *Cocos nucifera* (Uhl y Drasfield, 1987). El cocotero llamado comúnmente “el árbol de la vida”, puede ser encontrado a lo largo de la costa de casi todos los países ubicados entre los trópicos de Cáncer y Capricornio. En términos botánicos, el cocotero es una monocotiledónea perenne leñosa y no es considerado como un árbol, ya que carece de corteza, no tiene ramificaciones y tampoco cambium secundario que a su vez pueda generar crecimiento secundario (Ohler, 1999). El cocotero posee un tronco único, de 10 a 30 m de altura, en ejemplares de 40 años la altura típica es de 20 a 22 m. En el ápice presenta un grupo de hojas que protege el único punto de crecimiento o yema terminal, que posee la planta, la cual tiene una cobertura foliar de 8 a 9 m. El crecimiento en altura depende de las condiciones ecológicas, de la edad de la planta y del tipo de cocotero (Freemond. *et al.*, 1969; Chan y Elevitch, 2006). Las hojas son compuestas, pinadas, de 1.5 – 4 m. de longitud (Domínguez *et al.*, 1999) y de 10 – 15 Kg de peso cada una. (Freemond *et al.*, 1969). Una palma adulta produce entre 12 y 16 hojas por año. Cada hoja permanece alrededor de 3 años en la copa, después se desprende y deja una cicatriz permanente en el tallo. El número de cicatrices está correlacionado con la edad de la palma, por lo que ésta puede calcularse dividiendo el número de cicatrices en el tallo entre trece, que es el promedio de hojas producidas por año (Santos *et al.*, 1996).

La inflorescencia es un espádice que se desarrolla en la axila de cada hoja. El cocotero es una planta monoica, con sus órganos sexuales separados en la misma inflorescencia. El espádice consiste de un eje principal con 20 a 65 espigas en las cuales se encuentran las flores. Las flores femeninas se localizan en la base de las espigas, el resto de las espigas están totalmente cubiertas por las flores masculinas. Las flores son sésiles. Cada espiga puede tener una o más flores femeninas y por lo general entre 200 y 300 flores masculinas, esta última característica varía en relación al número total de espigas y su longitud. El número de flores femeninas por inflorescencia varía entre 20 y 40 (Ohler, 1999). La flor femenina es mucho más grande que la masculina y su forma es parecida a un coco muy pequeño (Ashburner, 1994).

Bajo condiciones de crecimiento favorables, las palmas de coco de las variedades altas, inician su floración aproximadamente a los seis años de edad, cuando tiene de 2.4 a 4.5 m de altura. Las variedades enanas e híbridas comienzan a florecer más temprano, usualmente a los 4 o 5 años (Parrotta, 1993).

El fruto es una drupa fibrosa, que se desarrolla a partir de un ovario tricarpelar. Consta de una capa lisa y delgada, el exocarpo y de una capa fibrosa, el mesocarpo, que envuelve al endocarpo, dentro del cual se encuentra la semilla, que está conformada por la testa, una simple y delgada capa, el endospermo líquido o agua y el endospermo sólido o carne, en el cual se encuentra el embrión embebido. El fruto de las variedades altas es más grande en comparación con el de las variedades enanas, las cuales, en contraste con las variedades altas, presentan gran número de nueces pequeñas que maduran con mayor rapidez. (Freemond *et al.*, 1969; Woodroof, 1970; Santos *et al.*, 1996; Ohler, 1999).

1.1.2 Importancia económica

El cocotero (*Cocos nucifera* L) junto con la palma africana (*Elaeis guineensis*) son, probablemente, las oleaginosas de mayor importancia en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (CONACOCO, 2012). Apreciado por sus múltiples usos, el cocotero ha sido de gran utilidad al humano desde hace más de 10,000 mil años, como fuente de diversos satisfactores tales como alimento, bebida, techo, fibra, azúcar, madera, alcohol, combustible, aceite y utensilios domésticos, refiriéndose a él en numerosas culturas como "el árbol de los mil y un usos" o el "árbol de la vida" (Ohler, 1984; Chan y Elevitch, 2006; CONACOCO, 2011).

El aceite de su semilla fue la primera grasa vegetal que sustituyó a la grasa animal en la elaboración de jabones y en las margarinas en el siglo XIX (Harries, 1978). En la actualidad, el aceite de coco ha perdido mucho terreno frente a otros aceites de origen vegetal, un estudio en el año 2009 registró que la producción mundial de aceites vegetales la conformaban cuatro principales cultivos: Palma aceitera (33 %), Soya (27%), Canola (16%) y Coco (2%) (CONACOCO, 2011).

Entre los usos actuales del aceite del cocotero, de gran potencial económico, se encuentran el aceite virgen comestible y el aceite para la industria de la perfumería y de los bioenergéticos, tales como la bioturbosina para los aviones y el biodiésel para automotores (Tan *et al.*, 2004; delos Reyes, 2007). Su uso vislumbra como una importante contribución para enfrentar a la crisis energética actual y ambiental en un futuro cercano (Maulion y Male, 2006).

Su cultivo se localiza en Indonesia, India, Filipinas, Malasia, Centroamérica y África tropical. El principal producto exportado es la copra sin procesar, seguido del coco desecado. La diversidad y potencialidad del coco contribuyen de manera considerable al sector económico de los países productores. Uno de los mercados más florecientes es la industrialización del agua de coco, siendo muy apreciada en los países tropicales donde se toma extrayéndola directamente del fruto (FAO, 2007).

Además, se prevee que el agua de coco podría competir en el mercado de \$10,000 millones de USD de las bebidas deportivas, debido a su carácter isotónico natural único al contener las concentraciones de calcio, fósforo, sodio, potasio y magnesio de la sangre humana. En consecuencia, las dos empresas multinacionales que dominan el mercado de las bebidas embotelladas han realizado inversiones en este producto. PepsiCo ha comprado la empresa brasileña Amacoco y sus populares marcas Kero Coco y Trop Coco, que controlan la mayor parte de las ventas de esta bebida embotellada en Brasil. Por su parte, Coca-Cola Co. adquirió el primero de septiembre de 2009 el 20% de las acciones de la empresa embotelladora de agua de coco ZICO, por aproximadamente \$15 millones de USD (CONACOCO, 2009).

El alto contenido de los ácidos láurico y cáprico contenidos en el endospermo fresco del coco, con concentraciones mayores a la leche materna e implicados en el fortalecimiento del sistema inmunológico humano, le confiere otra característica única al aceite poco conocido y utilizado de manera incipiente por la industria a niveles masivos, está impactando en el incremento acelerado del aceite virgen en el mercado (CONACOCO, 2011).

En lo referente a la producción del cocotero en América Latina, básicamente Brasil y México son los países que sobresalen en cuanto a volumen de producción se refiere, los cuales en el 2010, según FAO, participaron con el 4.33% y 1.57% de la producción respectivamente ubicándose como el cuarto y octavo productor a nivel mundial (CONACOCO, 2012). En México las principales zonas productoras de cocotero se localizan en dos grandes regiones: La del Golfo y Caribe: en las costas de Tabasco, Veracruz, Campeche, Yucatán y Quintana Roo y la del Pacífico: en las costas de Guerrero, Colima, Oaxaca, Michoacán, Nayarit, Jalisco y Chiapas. El cocotero es uno de los cultivos de mayor importancia económica, al cubrir una superficie de 145, 456 has de las cuales dependen aproximadamente 35 mil familias que viven directamente del cultivo (SIAP, 2011). Los usos más recientes de importancia económica son el agua de coco, el aceite virgen, el azúcar, el carbón activado, el aceite como aditivo para motores diesel, el aceite para la producción de biodiesel y productos a base de fibra para la industria automotriz (Lao, 2008) (figura 1.2).



Figura 1.2 Algunos productos obtenidos a partir de la palma de cocotero (Tan *et al.*, 2004; delos Reyes, 2007; Lao, 2008).

1.1.3 Variedades del cocotero

La primera clasificación sistemática del cocotero fue realizada por Narayana y John (1949) con base en el hábito de crecimiento, identificando dos variedades principales. Las variedades con hábito alto las cuales son principalmente alógamas, tardan aproximadamente 5 años en florecer y tienen frutos más grandes en comparación al hábito enano, variedades predominantemente autógamas y precoces, ya que comienzan a producir desde 3 años (Woodrof, 1970).

En cuanto a las presiones de selección ejercidas por la naturaleza y por los humanos durante el proceso de domesticación del cocotero, se conformaron dos grandes acervos genéticos a nivel mundial: el tipo *Niu kafa*, con características de fruto que constituyen el síndrome silvestre en la especie y el tipo *Niu Vai* con características de fruto que constituyen el síndrome domesticado, las variedades representativas de ambos son el Alto Oeste Africano (WAT) y Enano Malayo Amarillo (EMA). El síndrome silvestre corresponde a frutos de forma alargada, con alto contenido de mesocarpo, bajo porcentaje de endospermo, germinación tardía y heterogénea, características que permiten la dispersión natural a grandes distancias por flotación y el establecimiento en la línea de costa donde se presentan bajas presiones de competencia. El síndrome domesticado corresponde a frutos de forma redonda, con menor contenido de mesocarpo, mayor porcentaje de endospermo, principalmente endospermo líquido, germinación precoz y homogénea, características que limitan o impiden su dispersión por flotación, haciéndolas dependientes del humano para su establecimiento, desarrollo y reproducción en condiciones naturales (Harries, 1978).

1.1.4 Variedades de cocotero presentes en México

La palma de coco fue introducida a México durante el siglo XVI de diferentes partes del mundo. Las poblaciones en la costa del Golfo de México tienen características similares al tipo silvestre (*Niu kafa*) y en la costa del Pacífico presentan características similares al tipo doméstico (*Niu vai*) (Zizumbo, 1996; Zizumbo y Piñero, 1998; Zizumbo *et al.*, 2005a).

1.1.5 Problemática del cocotero en México

México se encuentra entre los diez primeros productores a nivel mundial, detrás de los grandes productores asiáticos como Indonesia, Filipinas y la India (CONACOCO, 2012). Desafortunadamente, la palma de cocotero está sujeta al ataque de agentes que producen diversas enfermedades y que afectan su producción y pueden ser letales, entre los que se encuentran; virus (Rohde *et al.*, 1990), viroides (Hanold y Randles, 1991), protozoos (Parthasarathy *et al.*, 1978), hongos (Joseph y Radha, 1975), nematodos (Griffith, 1987) y mollicutas como el fitoplasma causante del amarillamiento letal (AL) (Howard y Barrant, 1989).

La problemática del cocotero en México se puede englobar en la baja productividad de las plantaciones ya existentes y en la disminución de la superficie del cultivo. Las principales causas de estos problemas son: escasas prácticas del cultivo, plantaciones viejas, enfermedades y plagas. Entre las enfermedades, la más destructiva es el Amarillamiento letal (AL) causado por fitoplasmas, de la cual se hablara a detalle más adelante.

En México, la mortalidad debida al Amarillamiento Letal se registró en cinco ecotipos de cocotero: Enano Malayo Amarillo, Alto del Atlántico, Alto del Pacífico 1, Alto del Pacífico 2, Alto del Pacífico 3 (EMA, AA, AP1, AP2 Y AP3 respectivamente) representantes de la diversidad de germoplasma que se cultiva en el país. En base a esto, se realizó un estudio para identificar germoplasma resistente ante el AL como una alternativa para el control de dicha enfermedad, lográndose identificar ecotipos con un menor porcentaje de mortalidad como son Enano Malayo Amarillo (EMA) y los tres ecotipos Altos del Pacífico (AP1, AP2 y AP3) con mediana y alta resistencia (figura 1.3) (Zizumbo *et al.*, 2008).

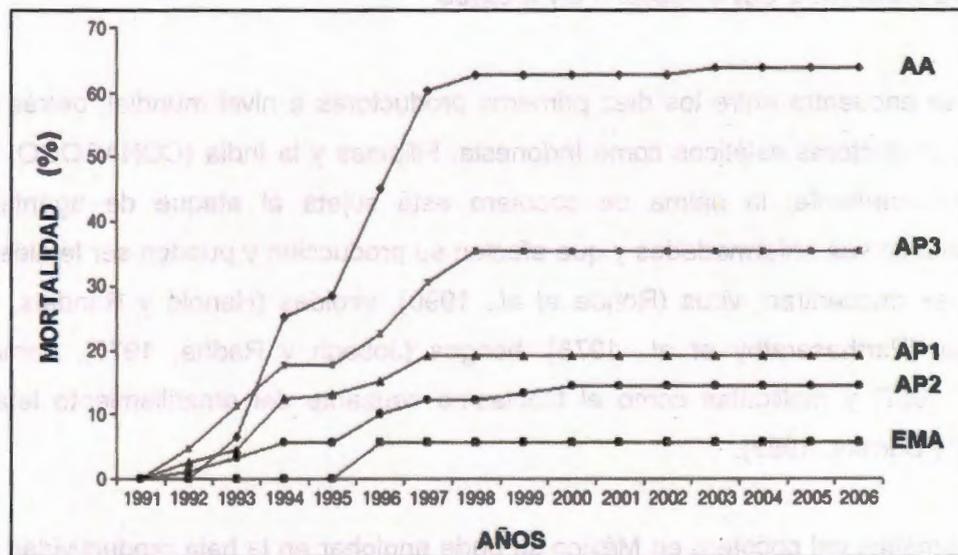


Figura 1.3 Mortalidad total acumulada por ecotipo debido a la enfermedad del Amarillamiento Letal en San Crisanto, Yucatán, México (Zizumbo *et al.*, 2008).

1.1.6 Amarillamiento Letal del cocotero (AL)

El AL es una enfermedad epidémica que ataca a unas 30 especies de palmas (Howard, 1990). La enfermedad es causada por un fitoplasma cuyo principal vector es el homóptero *Myndus crudus* Van Duzee (Howard *et al.*, 1983; 1984) (figura 1.4). Aunque los síntomas de la enfermedad en la palma se pueden revertir temporalmente por medio de la aplicación de antibióticos de la familia de las tetraciclinas, el costo, los efectos ecológicos y de salud colaterales por el uso de antibióticos limitan su aplicación en plantaciones comerciales (McCoy, 1973; 1974; Harrison, 2007).



Figura 1.4 Fitoplasma causante del AL (izquierda), vector del AL (medio), palma enferma con AL (derecha).

En la década de los noventa la enfermedad del AL destruyó millones de palmas en Jamaica, Florida, México, Belice y Honduras (Harrison *et al.*, 1999). En México, el AL ha eliminado virtualmente al cocotero Alto del Atlántico en toda la costa de Quintana Roo, Yucatán y Campeche (Domínguez *et al.*, 1999) y se estima que ha devastado aproximadamente unas 13 mil ha de la plantación (Doyle, 1998). Durante el desarrollo del AL, las palmas exhiben varios síntomas visuales (figura 1.5) tal como la caída prematura de los frutos (estadio 1), inflorescencia necrótica (estadios 2 y 3), clorosis y senescencia de hojas (estadios 4-6), (Maust *et al.*, 2003). Las hojas adquieren después color marrón, se desecan y mueren, permanecen colgando por algunos días y finalmente caen, quedando únicamente el tronco desnudo (McCoy *et al.*, 1982).



Figura 1.5 Cronología de síntomas del AL en la palma de coco. A). Caída prematura de los frutos; B). Inflorescencia necrótica; C). Clorosis y senescencia de las hojas más viejas; D). Clorosis de las hojas jóvenes y necrosis de la espata; E). Estado avanzado, caída de la corona de hojas quedando el tronco desnudo (poste telefónico) (McCoy *et al.*, 1982).

1.1.7 Alternativa de solución

La problemática del AL ha provocado la necesidad de establecer pruebas de resistencia en campo con el fin de evaluar individuos y poblaciones para identificar aquellos resistentes a la enfermedad y con alta productividad para utilizarlos en la replantación de las áreas afectadas e iniciar programas de mejoramiento genético, dado que esta es la mejor estrategia probada para combatir la enfermedad (Oropeza y Zizumbo-Villareal, 1995; Zizumbo-Villarreal *et al.*, 1999). Es por ello imprescindible la búsqueda de germoplasma resistente que dispone el país y establecer el germoplasma suplementario de otros países, para lo cual se han planteado el uso de los marcadores moleculares para realizar los estudios genéticos como los más adecuados.

1.1.8 Métodos de caracterización molecular

Las técnicas de caracterización de plantas basadas en marcadores moleculares determinan la identidad genética de cada individuo incluido en el estudio por medio de un patrón de bandeo o "huella genómica". La comparación de estas huellas se pueden utilizar en la evaluación de diversos aspectos genéticos, tales como la diversidad y estructura genética de las poblaciones, sus relaciones genéticas, la identificación de variedades, el mapeo genético, etc. (Laurentin, 2009; Valadez y Kahl, 2000). Las técnicas de caracterización de plantas basadas en marcadores moleculares superan la principal desventaja de las técnicas basadas en caracteres morfológicos ya que identifican la variación a nivel de la molécula de ADN, la cual es independiente de la influencia ambiental (Perera *et al.*, 1998; de Vicente y Fulton, 2003). Un marcador molecular es simplemente un segmento de ADN con una ubicación específica en un cromosoma (punto de referencia) cuya herencia puede seguirse en individuos de una población. La secuencia puede pertenecer a regiones codificantes (genes) o sin función conocida (Andersen y Lübberstedt, 2003). Los marcadores moleculares son mucho más numerosos que los marcadores morfológicos, por lo que su polimorfismo sobrepasa varias veces el de otras variantes genéticas, incluyendo las isoenzimas. Los marcadores moleculares asociados genéticamente a una característica específica son de particular interés en programas de mejoramiento debido a que permiten el rápido monitoreo de grandes números de plantas en una temprana edad del desarrollo. Esto facilita identificar individuos que contengan el carácter de interés. Además son de gran ayuda en la selección de los padres donantes para nuevos programas de mejoramiento y en la introgresión de caracteres (Milach, 1998). Un marcador ideal debe ser: altamente polimórfico o variable dentro y entre poblaciones, de herencia mendeliana no epistática (sin interacción entre genes), insensible a los efectos ambientales, codominante (que permita la identificación de individuos heterocigos y homocigos) de rápida identificación y simple análisis. Como se mencionó anteriormente los marcadores de ADN se utilizan fundamentalmente para el análisis de las diferencias en secuencias del ADN entre individuos. Las técnicas empleadas para ello son muy diversas y dan el nombre a los distintos tipos de marcadores, los cuales pueden ser de carácter dominante y codominante (Karp y Edwards, 1998).

1.1.8.1 Tipos de marcadores

Con el desarrollo de las técnicas basadas en ADN, el mejoramiento genético del coco se ha visto favorecido con la disponibilidad de una mayor cantidad de marcadores los cuales existen de dos tipos: los dominantes (D), tienen algunas ventajas como el menor costo para su elaboración y ser multilocus, por tanto, se obtiene mayor información y una gran cantidad de polimorfismo utilizando pocos iniciadores; sin embargo, la mayor desventaja de este tipo de marcadores es que no permite distinguir directamente los individuos heterocigos y por lo tanto la estimación de estos se basa en presuponer que la población es de tamaño infinito y se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg (H-W). Este tipo de marcadores incluyen a los RAPD (ADN Polimórfico amplificado al azar), AFLP (Polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados), y los ISSR (Secuencias entre repeticiones simples o secuencia entre microsatélites) entre los más comunes (Butcher *et al.*, 1999; Laurentin, 2009).

El otro tipo de marcadores son los codominantes (CD), los cuales requieren mayor tiempo y esfuerzo para su generación, además no son transferibles directamente a otras especies; sin embargo, la principal ventaja de utilizarlos es que permiten diferenciar directamente los individuos heterocigos de los homocigos, por lo tanto para medir la heterocigosidad o diversidad genética, no requiere presuponer equilibrio H-W (Butcher *et al.*, 1999; Laurentin, 2009). Estos marcadores incluyen a las Isoenzimas, los RFLP (Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción), los microsatélites o SSR (Secuencias Simples Repetidas) y la secuenciación de alelos entre otros, por lo que la selección del marcador molecular adecuado, dependerá primeramente si son heredables, codominantes o dominantes así como la estabilidad ambiental, número de loci detectados, la facilidad, la rapidez de los análisis y los costos de los mismos (Gepts, 1993; Zietkiewics *et al.*, 1994).

1.1.8.2 Aplicación de los marcadores moleculares

Los marcadores moleculares constituyen una herramienta moderna y poderosa para el viejo arte de la selección artificial. Sus aplicaciones más inmediatas se dan en la identificación de polimorfismo, la identificación de individuos o grupos de individuos homocigos o líneas puras, la identificación de individuos híbridos, la estimación de distancias genéticas entre poblaciones, las relaciones genéticas entre individuos o poblaciones así como la clasificación taxonómica de ecotipos, poblaciones o accesiones que ingresan a los bancos de germoplasma (Dudley, 1994). Es por ello que se emplean en la caracterización de la diversidad genética con fines de mejoramiento. El notable adelanto logrado en los últimos años mediante su empleo en la confección y saturación de mapas génicos en las plantas ha brindado valiosa información sobre la estructura genómica de algunas especies y la localización de genes controladores de caracteres de interés para la selección (Breure, 1996).

Otra de sus aplicaciones es en la identificación de accesiones núcleo en bancos de germoplasma ya que a partir del incremento del tamaño de las colecciones se hace más difícil evitar la inclusión de duplicados o accesiones muy similares, lo que implica un considerable gasto de recursos dedicados al mantenimiento, la evaluación y el manejo. Por las razones antes expuestas en la actualidad se ha propuesto dos soluciones complementarias dirigidas a incrementar el manejo y conservación eficiente y sostenible de germoplasma. La primera implica la identificación y eliminación de las accesiones duplicadas, la segunda, la creación de colecciones núcleo o representativas de la diversidad presente en toda la colección (Canales *et al.*, 1999; Cornide, 2000; Cornide *et al.*, 2001).

1.1.8.3 Microsatélites o SSR (Secuencias Simples Repetidas)

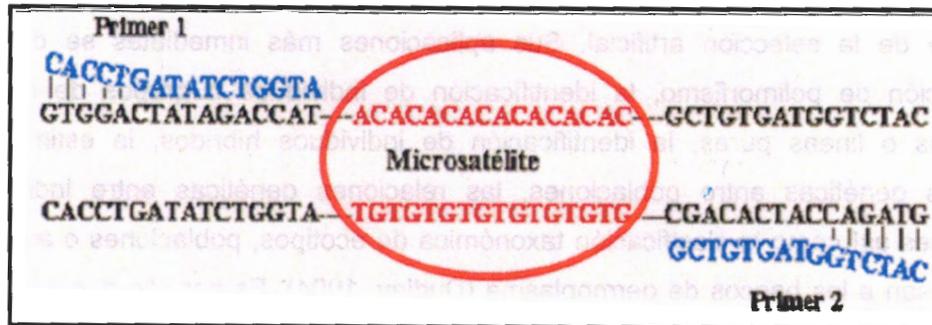


Figura 1.6 Microsatélites, ejemplo de un dinucleótido (AC)_n (Aranguren *et al.*, 2005).

Los microsatélites (SSR) son marcadores moleculares codominantes que presentan las ventajas de ser heredables, identifican fácilmente los individuos heterocigos, son altamente sensibles y reproducibles (Baudouin y Lebrun, 2002; Perera *et al.*, 2008). Son regiones de secuencias pequeñas (dos a diez pares de bases) repetidas, arregladas en serie, las cuales se asume que están distribuidas azarosamente por todo el ADN. Generalmente consisten en dinucleótidos (AC)_n (figura 1.6), (AG)_n, (AT)_n; trinucleótidos (TCT)_n, (TTG)_n; tetranucleótidos (TATG)_n, donde n es el número de unidades repetidas dentro de un *locus* de microsatélites. Además de estar en diferentes *loci*, también pueden ser poli-alélicos. Los (AT)_n son los más abundantes en plantas (Ma *et al.*, 1996). Los SSR son secuencias de ADN altamente variables dispersas a través de los genomas de hongos, plantas y animales, los cuales pueden o no estar asociadas con genes, pero pueden considerarse loci putativos ya que se segregan mendelianamente, son también altamente mutables y pueden estar presentes en muchos sitios del genoma (Phillips *et al.*, 1995; Valadez y Kahl, 2000).

Las regiones extremas de los microsatélites son generalmente secuencias bien conservadas que permiten su amplificación por PCR (van Belkum *et al.*, 1998), usando iniciadores específicos de 20 a 30 pb de longitud que hibridan en la región que flanquea al tandem de repeticiones (microsatélites). Estos marcadores se resuelven por electroforesis en geles de poliácridamida en condiciones desnaturizantes, mediante tinción en plata o

por autoradiografía (en el caso de usar un iniciador marcado radioactivamente). Si se dispone de un secuenciador automático, se puede resolver por tamaño en este equipo mediante el empleo de iniciadores marcados con fluoróforos, posibilitando un análisis automatizado.

La base genética del polimorfismo detectado en microsatélites se basa en la variabilidad del número de repeticiones en tandem y consecuentemente del tamaño del microsatélite amplificado en individuos de una especie. El microsatélite amplificado por PCR es sometido a electroforesis en geles de alta resolución que permiten detectar diferencias de 2, 3 o 4 nucleótidos que corresponden al mínimo polimorfismo de longitud en un microsatélite. Estas regiones son a menudo altamente variables y consecuentemente útiles para medir el polimorfismo entre especies o variedades muy relacionadas (Phillips *et al.* 1995; Valadez y Kahl 2000). Los microsatélites son de naturaleza codominantes (es posible identificar los individuos heterocigos de los homocigos) (Cordeiro *et al.*, 2000).

Para el cocotero se han desarrollado marcadores microsatelitales, un conjunto de los cuales desarrollados por Baudouin y Lebrun (2002) (cuadro 1.1), han demostrado ser una herramienta útil en la realización de diversos estudios, entre los que se encuentran el análisis de la diversidad y las relaciones genéticas (Baudouin y Lebrun, 2002). También se han utilizado para realizar inferencias de procedencia (Baudouin y Lebrun, 2009), para identificar poblaciones e individuos (Baudouin *et al.*, 2004; Perera *et al.*, 2008) y en la construcción de mapas de ligamiento (Lebrun *et al.*, 2001).

Cuadro 1.1 Nombre y secuencia de los marcadores microsatelitales específicos para cocotero (Baudouin y Lebrun, 2002).

Nombre	Secuencia (F= Forward, R= Reverse)
CnCir A3	F AAT CTA AAT CTA CGA AAG CA
	R AAT AAT GTG AAA AAG CAA AG
CnCir A9	F AAT GTT TGT GTC TTT GTG CGT GTG T
	R TCC TTA TTT TTC TTC CCC TTC CTC
CnCir B6	F GAG TGT GTG AGC CAG CAT
	R ATT GTT CAC AGT CCT TCC A
CnCir B12	F GCT CTT CAG TCT TTC TCA A
	R CTG TAT GCC AAT TTT TCT A
CnCir C3	F AGA AAG CTG AGA GGG AGA TT
	R GTG GGG CAT GAA AAG TAA C
CnCir C7	F ATA GCA TAT GGT TTC CT
	R TGC TCC AGC GTT CAT CTA
CnCir C12	F ATA CCA CAG GCT AAC AT
	R AAC CAG AGA CAT TTG AA
CnCir E2	F TCG CTG ATG AAT GCT TGC T
	R GGG GCT GAG GGA TAA ACC
CnCir E10	F TGG GGT TCC ATT TCT TCT CTC ATC
	R GCT CTT TAG GGT TCG CTT TCT TA
CnCir E12	F TCA CGC AAA AGA TAA AAC C
	R ATG GAG ATG GAA AGA AAG G
CnCir F2	F GGT CTC CTC TCC CTC CTT ATC TA
	R CGA CGA CCC AAA ACT GAA CAC
CnCir G11	F AAT ATC TCC AAA AAT CAT CGA AAG
	R TCA TCC CAC ACC CTC CTC T
CnCir H4	F TTA GAT CTC CTC CCA AAG
	R ATC GAA AGA ACA GTC ACG
CnCir H7	F GAG ATG GCA TAA CAC CTA
	R TGC TGA AGC AAA AGA GTA

1.1.8.4 Estudios en cocotero empleando microsatélites

Hasta el momento para *Cocos nucifera* se ha desarrollado una metodología de microsatélites que requiere el uso específico de muestras de hoja (Baudouin y Lebrun, 2002). En el cuadro 1.2 se presentan estudios realizados en cocotero empleando microsatélites a partir de tejido de hoja.

Cuadro 1.2 Estudios realizados en cocotero empleando microsátélites a partir de tejido de hoja.

AUTOR	TÍTULO	ESTUDIO
Konan, <i>et al.</i> , 2006	Microsatellite gene diversity in coconut (<i>Cocos nucifera</i> L.) accessions resistant to lethal yellowing disease	Este trabajo tuvo como objetivo el uso de materiales identificados como referencia para seleccionar adecuados padres para los estudios de mapeo genético. Un total de 58 alelos fueron detectados en los 12 loci de microsátélites. Para la extracción de ADN se utilizaron las hojas más jóvenes de la palma de coco.
Rajesh, <i>et al.</i> , 2008	Microsatellite variability of coconut accessions (<i>Cocos nucifera</i> L.) from Andaman and Nicobar Islands	El grado de diversidad genética en 26 accesiones de coco de las islas Andaman y Nicobar (A&N) se determinó usando 14 marcadores microsátélites. El ADN se extrajo de las hojas de las palmas
Ribeiro, <i>et al.</i> , 2010	Population structures of Brazilian tall coconut (<i>Cocos nucifera</i> L.) by microsatellite markers	En este estudio se evaluó la diversidad genética entre y dentro de las poblaciones brasileñas de coco altas. Se utilizaron las hojas más jóvenes de la palma para la extracción de ADN.
Gunn, <i>et al.</i> , 2011	Independent Origins of Cultivated Coconut (<i>Cocos nucifera</i> L.) in the Old World Tropics	Se investigó la historia de domesticación de los cocos y la estructura genética de la población y su relación con los patrones de dispersión humana. Porciones de las hojas emergentes se obtuvieron de las copas de las palmas.
Kumar, <i>et al.</i> , 2011	Microsatellite Marker based Characterization of South Pacific Coconut (<i>Cocos nucifera</i> L.) Accessions	En el presente estudio se utilizaron 8 marcadores de microsátélites para caracterizar la diversidad genética presente en ecotipos de cocotero del Pacífico Sur. El tejido para el análisis con el marcador molecular fueron las hojas de palmas adultas.

1.1.8.5 Análisis genéticos utilizando datos moleculares

A partir de datos obtenidos con marcadores moleculares se pueden realizar, en general, dos tipos de análisis: la cuantificación de la diversidad genética y su distribución en las poblaciones estudiadas y el estudio de las relaciones genéticas entre ellas. La cantidad de diversidad es estimada a través del número de loci polimórficos y el número y porcentaje de individuos heterocigos en la población. Las relaciones genéticas, se pueden estudiar por medio del cálculo de la distancia genética entre las muestras. La distancia genética se describe como la proporción de elementos genéticos que no son compartidos por ambas muestras (de Vicente y Fulton, 2003). Las relaciones se pueden representar por medio de técnicas de clasificación o agrupación de análisis fenético. Hay varios algoritmos de clasificación que determinan las reglas para ordenar los individuos en grupos específicos con base en las medidas de similitud (Laurentin, 2009). Los métodos utilizados más frecuentemente son el UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages) (Sneath y Sokal, 1973) y el Neighbour joining (Saitou y Nei, 1987).

1.1.9 Problemática a estudiar

1.1.9.1 Problemática para la colecta de hoja

Para los análisis con microsatélites se ha utilizado únicamente el tejido de hoja como fuente de ADN; sin embargo, este presenta dificultades como: dificultad de acceder a la copa, riesgo de accidentes, dificultad de encontrar quien realice la colecta, es costoso y se invierte mucho tiempo.

1.1.9.2 Alternativa al uso de hojas

En el presente trabajo se propone evaluar la posibilidad de usar la base del tronco como fuente de tejido para la obtención de ADN para estudios como el análisis con marcadores moleculares microsatelitales. Sabemos que de este tejido se puede obtener ADN sin problemas, de manera más fácil y se ha visto que funciona bien (Oropeza *et al.*, 2011). Las ventajas que presenta son: no hay que subir a la copa, sin riesgo de accidentes, la colecta es más fácil, es menos costoso y es rápido (figura 1.7).

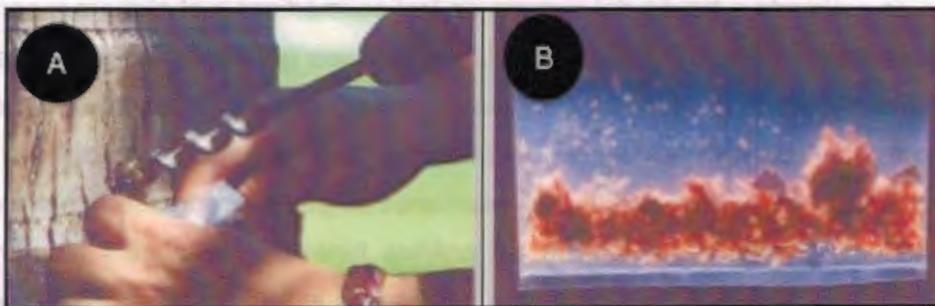


Figura 1.7. Obtención de tejido (tronco). A) Perforación de un orificio para la obtención de tejido de donde se extraerá ADN. B) Los tejidos son recibidos en una bolsa de polietileno evitando el contacto de estos con las manos.

1.1.9.3 Conservación y transporte de muestras cruzando fronteras

Otro problema importante es el transporte de tejidos de un país a otro, ya que cada vez es más difícil debido a:

- Los permisos fitosanitarios para introducir tejidos a nuestro país, a veces son difíciles de obtener y en muchas ocasiones una vez hecha la colecta las muestras han quedado retenidas en la aduana, y el trabajo se pierde.
- Certificados fitosanitarios y permisos para sacar tejidos del país de origen de las muestras, a veces son muy difíciles de obtener.

En cuanto a conservación de las muestras, los viajes de colecta suelen ser largos y hacen difícil la conservación adecuada de las muestras.

1.1.9.4 Alternativas para la conservación y el transporte de tejidos

El transporte de tejidos presenta ciertas dificultades como se han mencionado anteriormente y más cuando se trata de regiones remotas donde no se cuentan con los equipos necesarios para mantener las muestras hasta su llegada al laboratorio y muchas veces dichas muestras se pierden al ser retenidas en las aduanas. Una alternativa para esta problemática podría ser el uso de tarjetas FTA (Flinders Technology Associates) como un medio de transporte y conservación del ADN.

Como antecedente al uso de las tarjetas FTA, se reporta un estudio en el cual se recolectaron 3,000 muestras de maíz, en un campo experimental localizado a 130 Km del laboratorio, la colecta del ADN de las hojas de maíz se realizó empleando las tarjetas FTA. En el estudio se observó que la calidad de los productos de PCR obtenidos es suficiente para un análisis confiable, distinguiendo individuos heterocigos de homocigos, usando el secuenciador ABI 3730. Estos resultados indicaron que el uso de tarjetas FTA es un método rápido, fácil y menos costoso (Mbogori *et al.*, 2006).

1.1.9.5 Tarjetas FTA®

Las tarjetas FTA® (Flinders Technology Associates) están diseñadas para la colección, almacenaje y posterior purificación del ADN. Dichas tarjetas están constituidas de un papel filtro impregnado con una fórmula química patentada por la casa fabricante (figura 1.8A y B). La fórmula está diseñada para producir lisis de las membranas celulares y desnaturalización de las proteínas y de las enzimas con capacidad para desnaturalizar los ácidos nucleicos, los cuales quedan atrapados en una matriz tan pronto entran en contacto con el papel (figura 1.8C), con lo cual se reduce el riesgo de contaminación (Manual Whatman FTA® protocols, 2002). Los componentes restantes de la muestra son eliminados mediante el lavado con un reactivo, producido por la misma casa fabricante.

Las principales ventajas del uso de estas tarjetas, frente a métodos convencionales de aislamiento de ADN son las siguientes:

1. Facilidad para la colección y transporte de las muestras.
2. Los ácidos nucleicos capturados están listos para posteriores aplicaciones en menos de 30 minutos.
3. Almacenamiento de gran cantidad de muestras en un menor espacio.
4. El ADN obtenido en las tarjetas FTA es estable durante años a temperatura ambiente.
5. Alta sensibilidad en la detección de polimorfismos de ADN vía PCR, dado que el ADN que contiene la tarjeta está libre de compuestos como proteínas, DNAasas y sustancias tampón utilizadas en los procesos convencionales de extracción y que pueden afectar la calidad del ADN.
6. Rápida purificación de la muestra.

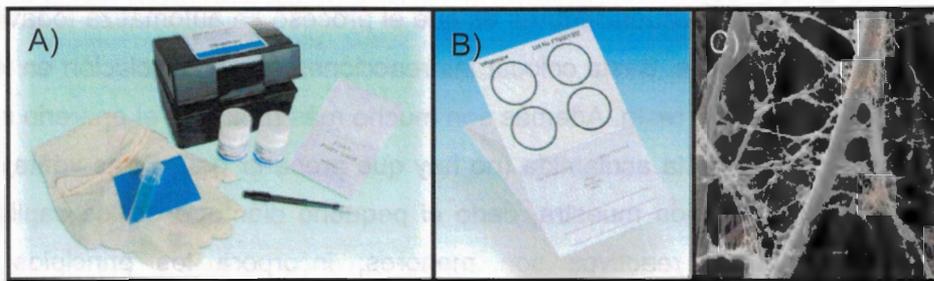


Figura 1.8 A) Kit de FTA para plantas. B) Tarjeta FTA clásica. C) microfotografía electrónica que muestra el ADN atrapado en la matriz de FTA (ampliación x 10,000) (Manual Whatman. FTA® protocols, 2002).

1.1.10 Secuenciadores automáticos capilares

Cabe mencionar que el método empleado para visualizar los microsatélites es mediante geles de poliacrilamida desnaturalizantes, este tipo de geles se utiliza para la separación de fragmentos de ADN de cadena sencilla o para asegurar la migración de fragmentos de bajo peso molecular que pudieran verse afectados durante el corrimiento por la formación de estructuras secundarias debido a la complementariedad de bases. Los geles de poliacrilamida utilizados con éxito, tienen un grosor de 0.2 a 0.4 mm y la concentración del gel varía desde 4 a 8% (Valadez y Kahl, 2000). Su principal inconveniente es que son tediosos (hay que preparar el gel, limpiar los cristales y cargar manualmente las muestras), lentos y entrañan un cierto riesgo (manipulación de acrilamida monomérica, que es neurotóxico y neurocarcinógeno).

Por lo contrario los secuenciadores automáticos capilares son equipos que funciona de forma completamente automática inyectando las muestras (que se preparan exactamente igual que durante la secuenciación en geles y se colocan en una placa), en un capilar previamente cargado con un cierto polímero que funciona como lo hace la matriz de acrilamida: bisacrilamida de los geles de secuencia, permitiendo resolver fragmentos de ADN de cadena sencilla que se diferencian en una única base.

Su ventaja principal de los secuenciadores es que el proceso se automatiza todavía más, siendo por ello muy cómodos. Basta colocar las reacciones de secuenciación en la placa y la máquina se encarga del resto. Además son mucho más rápidos y el operario no tiene que manipular directamente la acrilamida (no hay que preparar gel). Otras ventajas son: rapidez en el análisis de cada muestra, dado el pequeño diámetro de los capilares; el consumo de muestras y reactivos son menores; incorpora los principios de la automatización a través de un software altamente optimizado y se reduce el manejo de sustancias tóxicas (www.iib.uam.es).

De igual manera estos secuenciadores automáticos permiten el empleo de diferentes fluorocromos para el marcaje de los iniciadores, lo que permite la detección por emisión de fluorescencia, al mismo tiempo, de varios productos de PCR, es decir de varios marcadores. Esto ha hecho que se generalicen las reacciones de amplificación múltiple (Hayden *et al.*, 2008) para lo cual se requiere la optimización de las condiciones de PCR, seleccionando iniciadores que no interaccionen entre sí, con similar temperatura de unión y con alelos en diferentes rangos de tamaño (Picó y Esteras, 2012).

1.1.10.1 Sistema para análisis genético CEQ™ 8800.

Para llevar a cabo los análisis se empleó primeramente el secuenciador ABI Prism 310, pero debido a que se presentaron problemas técnicos con dicho secuenciador se recurrió al secuenciador CEQ™ 8800 de Beckman Coulter ubicado en el laboratorio de Marcadores Moleculares y Genómica Funcional del CICY, lo cual implicó: conseguir la disposición del material y equipo así como marcar los iniciadores con una química distinta.

Este sistema de electroforesis capilar ofrece un nuevo nivel de capacidades en las tareas de análisis genético en comparación con otras técnicas de electroforesis capilar para ADN. El equipo integra un software robusto que proporciona las herramientas necesarias que garantizan un uso continuo, resultados confiables, que lo enfocan más rápidamente en la línea de descubrimientos genéticos (www.accesolab-sii.com). El secuenciador CEQ™ 8800 (figura 1.9) es lo suficientemente flexible para adaptarse a una amplia gama

de aplicaciones: visualización y administración de datos, secuenciación de ADN “*de novo*”, detección de heterocigotos, análisis de mutaciones, análisis de AFLP, búsqueda de SNP (Polimorfismo en un solo nucleótido) e identificación de alelos. Algunas de sus características sobresalientes son:

1. La capacidad del secuenciador CEQ™ 8800 es de dos placas de 96 pozos, lo que lo hace completamente automático en los procesos de análisis genético. El arreglo de 8 capilares está diseñado especialmente para la placa de 96 pozos, reduciendo costos y complejidad comparados con arreglos de mayor tamaño.
2. El gel de separación es cargado automáticamente al equipo, lo que asegura la inyección adecuada de la matriz de gel en cada ensayo.
3. Un lector incorporado de código de barras le permite un registro preciso y seguimiento adecuado de sus muestras.
4. La fluorescencia inducida directamente por el láser en la columna paralela a la alineación automática del capilar, asegura la mayor sensibilidad disponible y lectura confiable.



Figura. 1.9 Secuenciador CEQ™ 8800 de Beckman Coulter.

El análisis de los resultados de los estudios de caso de los países de América Latina y el Caribe, así como de los países de América Latina y el Caribe, muestra que el uso de los servicios de salud es limitado y que la mayoría de la población no tiene acceso a servicios de salud de calidad.

El uso de los servicios de salud es limitado y que la mayoría de la población no tiene acceso a servicios de salud de calidad. Esto se debe a una serie de factores, como la falta de recursos humanos y financieros, la falta de infraestructura y la falta de acceso a los servicios de salud.

El uso de los servicios de salud es limitado y que la mayoría de la población no tiene acceso a servicios de salud de calidad. Esto se debe a una serie de factores, como la falta de recursos humanos y financieros, la falta de infraestructura y la falta de acceso a los servicios de salud.

El uso de los servicios de salud es limitado y que la mayoría de la población no tiene acceso a servicios de salud de calidad. Esto se debe a una serie de factores, como la falta de recursos humanos y financieros, la falta de infraestructura y la falta de acceso a los servicios de salud.



Figura 1.1. Software de análisis de datos de salud.

1.2 PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Pueden los tejidos de tronco de palmas servir como fuente de ADN para la caracterización genética con microsatélites?

¿Puede el ADN de tronco de palmas, al ser conservado y transportado en tarjetas FTA ser útil para estudios de marcadores moleculares?

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo general

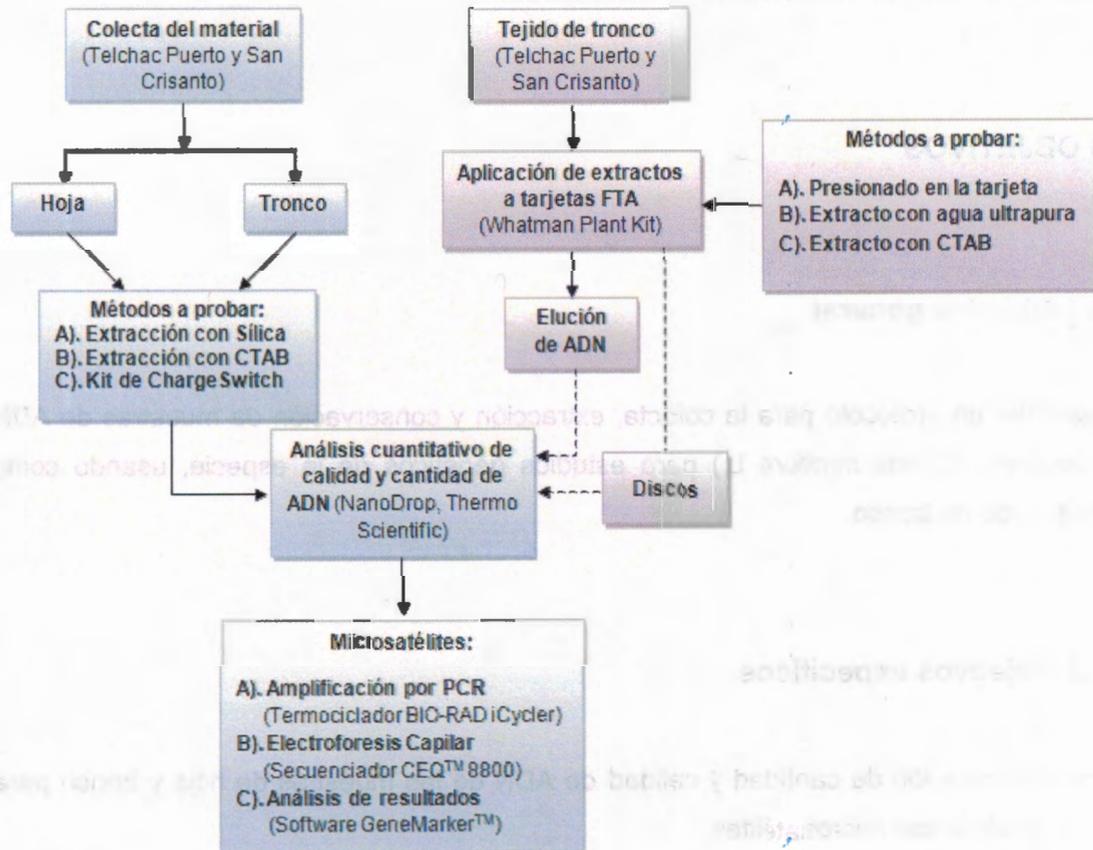
Desarrollar un protocolo para la colecta, extracción y conservación de muestras de ADN de cocotero (*Cocos nucifera* L.) para estudios genéticos de la especie, usando como fuente tejido de tronco.

1.3.2 Objetivos específicos

- Comparación de cantidad y calidad de ADN de las muestras de hoja y tronco para análisis con microsatélites.
- Evaluación de la eficiencia de tarjetas FTA para la conservación de muestras de ADN.

1.4 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental implementada para llevar a cabo el siguiente estudio se resume en el siguiente esquema.



1.5 REFERENCIAS

- Andersen, J.P y Lübberstedt T. (2003). Functional markers in plants. Trends Pl. Sc. 8: 554-560.
- Aranguren, J.A., Roman R., Isea W., Villasmill Y. y Jordana J. (2005). Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona.
- Ashburner, G.R. (1994). Characterization, collection and conservation of *Cocos nucifera* L. in the South Pacific. Tesis de Doctorado. The University of Melbourne. 262 pp.
- Baudouin, L. y Lebrun, P. (2002). The development of a microsatellite kit and dedicated software for use with coconuts. Burotop, 17, 16-20.
- Baudouin, L., Piry S. y Cornuet J. M. (2004). Analytical bayesian approach for assigning individuals to populations. Journal of Heredity, 95(3), 217-224
- Baudouin, L. y Lebrun, P. (2009). Coconut (*Cocos nucifera* L.) DNA studies support the hypothesis of an ancient Austronesian migration from Southeast Asia to America. Genetic Resources and Crop Evolutions, 56(2), 257-262.
- Breure, A. (1996). Gene mapping tops profit predictions. The Agbiotech Bulletin 4:23.
- Butcher, P. A., Glaubitz, J. C. y Moran, G. F. (1999). Aplicaciones de los marcadores microsatélites en la domesticación y conservación de árboles forestales. Recursos Genéticos Forestales (FAO), N° 27. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/008/x4133s/X4133S07.htm>.
- Canales, E., Cornide, M.T., Calvo, D., Gálvez, G., Ramos Leal, M. y Coto, O. (1999) Molecular diversity in a group of sugarcane varieties. Proc.of the XXIII ISSCT. Congress.N. Delhi, India, 22-26.

CONACOCO (2009). Consejo Nacional del Cocotero, http://www.conacoco.com.mx/coco/nueva/inteligencia_comercial/Reporte_Inteligencia_Nov2009.pdf (Acceso: 26/Febrero/2013).

CONACOCO (2011). Consejo Nacional del Cocotero, Nuestro Compromiso El COCO MEXICANO. Revista. pp. 12.

CONACOCO (2012). Consejo Nacional del Cocotero, http://conacoco.com.mx/comite/documentos/PROYECTO_PAF_2012.pdf (Acceso: 26/ Febrero/2013).

Cordeiro, G. M., Taylor, G. O. y Henry, R. J. (2000). Characterization of microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum sp.*), a highly polyploidy species. Plant Science; 155: 161-168.

Cornide M.T. (2000). Molecular characterization of the sugarcane variability for genetic improvement. En: Plant Genetic Engineering Toward the Third Millenium. (ed. A. Arencibia). Elsevier, Amsterdam, pp.49-61.

Cornide M.T. (2001). Cuba. Amanecer del Tercer Milenio. Genética vegetal. Editorial Debate, España, pp. 93-106.

Chan, E. y Elevitch, C. R. (2006). Species Profiles for Pacific Island Agroforestry. www.Traditionaltree.org. pp. 2-25.

delos Reyes, V. (2007). Bio-fuels. De la Salle University-Dasmarinas. Retrieved May 25, 2009, from http://pdf.usaid.gov/pdf_docs/PNADJ690.pdf.

de Vicente, M.C y Fulton, T. (eds). (2003). Tecnologías de marcadores moleculares para estudios de diversidad genética de plantas: Módulo de Aprendizaje. Illus. Nelly Giraldo. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Roma, Italia.

- Domínguez, C. E., López, J. I., Castillo R. G. y Ruíz, P. B. (1999). El cocotero (*Cocos nucifera* L). Manual para la producción en México. INIFAP. CIRGOC. Campo Experimental Huimanguillo. Libro Técnico Num. 6, 133 p.
- Doyle, P. (1998). The impact of lethal yellowing type coconut diseases on small farmers. Natural Resources Institute, UK.
- Dudley, J.W. (1994). Analysis of molecular marker data. Proceed. of the joint plant breeding symposia series, American Society for Horticultural Science/Crop Science Society of America. pp. 3-7.
- FAO (2007). Statistical Database Gateway. <http://apps.fao.org>.
- Fremond. y Ziller. R. y Nucé de Lamothe, M.(1969). El Cocotero. Colección de Agricultura Tropical. España: Blume. 236 pp.
- Gepts P. (1993). The use of molecular and biochemical markers in crop evolution studies. *Evol. Biol.* 27: 57-94.
- Griffith R. (1987). Redring disease of coconut palm. *Plants Dis*, 71, 193-196.
- Gunn, B.F., Baudouin, L., Olsen, K.M. (2011). Independent Origins of Cultivated Coconut (*Cocos nucifera* L.) in the Old World Tropics. *PLoS ONE* 6(6): e21143.doi:10.1371/journal.pone.0021143.
- Hanold D. y Randles J. (1991). Coconut cadang-cadang disease and its viroid agent. *Plant Dis*, 75, 330-335.
- Harries, H. C (1978). The evolution, dissemination and classification of *Cocos nucifera* L. *The Botanical Review*, 44: 265-319.

- Harrison, N., Cordova, I., Richardson, P. y Dibonito, R. (1999). Detection and diagnosis of lethal yellowing. In: C. Oropeza, J.L. Verdeli, G. R. Ashburner, R. Cardeña and J.M Santamaría (Eds) Current Advance in Coconut Biotechnology. Pp 183-196. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherland (In press).
- Harrison, N. A. y Elliot, M. L. (2007). Lethal Yellowing (LY) of palm. Institute of Food and Agricultural Sciences (IFAS), Fact Scheet PP-222, 9pp
- Hayden, M.J., Nguyen, T.M., Waterman A., Chalmers K.J. (2008). Multiplex ready PCR: a new method for multiplexed SSR and SNP genotyping. BMC Genomics 9:80.
- Howard, F.W., Norris, R. C. y Thomas, D. C. (1983). Evidence of transmission of palm lethal yellowing agent by a plant-hopper *Myndus crudus* (Homoptera Cixiidae). Tropical Agriculture (Trinidad), 60, 168-171.
- Howard, F. W., Kramer, J. P. y Teliz-Ortiz, M. (1984). *Myndus crudus* (Homptera: Cixiidae) in Cancún, México. Florida Entomologist, 67 (4), 577-579.
- Howard F. y Barrant C. (1989). Question and answers about lethal yellowing disease. Principes, 33, 163-171.
- Howard, F. W. (1990). Evaluation of grasses for cultural control of *Myndus crudus*, a vector of Lethal Yellowing of palms. Entomologia Experimentalis et Applicata, 56(2), 131-137.
- Howard, F. W., Harrison, N.A. (2007). Lethal Yellowing of Palms. Consultado 14 de Marzo de 2013. Disponible en <http://flrec.ifas.ufl.edu/pdfs/LethalYellowingOfPalms.pdf>
- Joseph, T. y Radha K. (1975). Role of *Phytophthora palmivora* in but rot of coconut. Plant Dis Repr, 59, 1014-1017.

- Karp, A. y Edwards, K. (1998). DNA markers: a global overview. In: G. Caetano- Anollés, P.M. eds. DNA markers: protocols, applications and overviews. Gress-hoff. New York. p. 1-13.
- Konan, K.J.N., Koffi, K.E., Konan, J.L., Lebrun, P., Dery, S.K y Sangare, A. (2006). Microsatellite gene diversity in coconut (*Cocos nucifera* L.) accessions resistant to lethal yellowing disease. African Journal of Biotechnology Vol. 6 (4), pp. 341-347.
- Kumar, S.P., Manimekalai, R y Ranjitha Kumari, B.D (2011). Microsatellite Marker based Characterization of South Pacific Coconut (*Cocos nucifera* L.) Accessions. International Journal of Plant Breeding and Genetics 5(1):34-43.
- Lao, D. A. (2008). Coco-biodiesel more than a diesel replacement. Bioenergy Forum 2008, Bangkok, abril 2008.
- Laurentin, H. (2009). Data analysis for molecular characterization of plant genetic resources. Genetic Resources and Crop Evolution, 56(2), 277-292.
- Lebrun, P., N'cho, Y.P., Seguin, M., Grivet, L. y L. Baudouin (1998). Genetic diversity in coconut (*Cocos nucifera* L.) revealed by restriction fragment length polymorphisms (RFLP) markers. Euphytica, 101(1), 103-108.
- Lebrun, P., Baudouin, L., Bourdeix, R., Konan, J. L., Barker, J. H., Aldam, C., Herrán, A. y Ritter, E. (2001). Construction of a linkage map of the Rennell Island Tall coconut type (*Cocos nucifera* L.) and QTL analysis for yield characters. Genome, 44(6), 962-970.
- Ma, Z.Q., Roder, M. y Sorrells, M.E. (1996). Frequencies and sequence characteristics of di-, tri-, and tetra-nucleotide microsatellites in wheat. Genome; 39: 123-130.
- Manual Whatman. FTA® protocols: collect transport, archive and access nucleic acids all at room temperature (2002); URL <http://www.cosmobio.com.ar/docs/fta%20protocols.pdf>.

- Maulion, A. M. y Male, R. (2006). An assessment of the coconut oil, other by-products and coco-chemicals. UACT. Philippines.
- Maust B. E., Espadas, F., Talavera, C., Aguilar, M., Santamaría, J. M. y Oropeza C. (2003). Changes in Carbohydrate Metabolism in Coconut Palms Infected with the Lethal Yellowing Phytoplasma. *Phyto*. 93: 976-981.
- Mbogori, M.N., Kimani, M., Kuria, A., Lagat, M., Danson, J.W. (2006). Optimization of FTA technology for large scale plant DNA isolation for use in marker assisted selection. Biotechnology Centre, Kenya Agricultural Research Institute, Kenya.
- McCoy, R. E. (1973). Effect of various antibiotics on development of Lethal Yellowing in coconut palm. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*. 86, 503-506.
- McCoy, R. E. (1974). Techniques for treatment of palm trees with antibiotics. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 87, 537-540.
- McCoy R., Norris R., Vieyra G., y Delgado S. (1982). México: lethal yellowing disease of coconut palm. *FAO Plant Protection Bulletin*. 30: 79-80.
- Meerow, A, R. Wisser, J. Brown, D. Kuhn, R. Schnell y T. K. Broschat (2003). Analysis of genetic diversity and population structure within Florida coconut (*Cocos nucifera* L.) germplasm using microsatellite DNA, whit special emphasis on the Fiji Dwarf cultivar. *Theoretical and applied genetics*, 106(4), 715-726.
- Milach, S. (1998). Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. En *Marcadores moleculares em plantas*, Sandra Milach (ed.).Porto Alegre, Brasil.
- Narayana, G. V. y John, C. M. (1949). Varieties and forms of the coconut. Madras, Agric. J. 36:349:366 (Reimpreso como John, C.M y Narayana, G.V 1949. *Indian Coconut Journal* 2, 209-226).

-
- Ohler, J. G. (1984). Coconut: Tree of life. Plant production and protection paper 57. FAO, Rome, Italy, 446 pp.
- Ohler, J. G. (1999). Modern coconut management: palm cultivation and products, 458 pp.
- Oropeza, C. y Zizumbo-Villarreal D. (1995). The history of Lethal Yellowing in México, in International workshop on Lethal Yellowing-like diseases of coconut, Eden-Green S. y Ofori F. (eds). Elmina, Ghana, November, 69-76.
- Oropeza C, Cordova I, Chumba A, Narváez M, Saéñz L, Ashburner R. Harrison N (2011) Phytoplasma distribution in coconut palms affected by lethal yellowing disease. Aceptado Annals of Applied Biology. DOI:10.1111/j1774-7348.2011.00480.x.
- Parrotta J.A. (1993). *Cocos nucifera* L. Coconut, coconut palm, palma de coco. SO-ITFSM-57. New Orleans, LA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station. 7p
<http://www.fs.fed.us/global/iiftf/Cocosnucifera.pdf>.
- Parthasarathy, M., van Slobbe W. and Soudant C. (1978). Hartrot or fatal wilt of palms. 1. Coconuts (*Cocos nucifera*). Principes, 22, 3-14.
- Perera L, Russell, J., Provan, J., McNicol, J. y Powell, W. (1998). Evaluating genetic relationships between indigenous coconut (*Cocos nucifera* L.) accessions from Sri Lanka by means of AFLP profiling. Theoretical and Applied Genetics, 96(3), 545-550.
- Perera, L., Russell, J., Provan, J., y Powell W. (2000). Use of microsatellite DNA markers to investigate the level of genetic diversity and population genetic structure of coconut (*Cocos nucifera* L.). Genome, 43(1), 15-21.
- Perera, L., Ruseell, J., Provan, J., y Powell, W. (2001). Levels and distributions of genetic diversity of coconut (*Cocos nucifera* L., var. *Typica form typica*) from Sri Lanka assessed by microsatellite markers. Euphytica, 122(2), 381-389.
-

- Perera, L., Russell, J., Provan, J., y Powell, W. (2003). Studying genetic relationships among coconut varieties/populations using microsatellite markers. *Euphytica* 132, 121-128.
- Perera, P. L., Perera, V., Hocher, J., Verdeil, D., Yakandawala y L. Weerakoon (2008). Use of SSR markers to determine the anther-derived homozygous lines in coconut. *Plant Cell Reports*, 27(11), 1697-1703.
- Phillips, W., Rodríguez, H., Fritz, P. (1995). Marcadores de ADN: Teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo con ejemplos de investigaciones en cacao (*Theobroma cacao*). Serie técnica. Informe técnico # 252. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 183 p.
- Rajesh, M., Nagarajan, P., Jerard, B., Arunachalam V. y Dhanapal, R. (2008). Microsatellite variability of coconut accessions (*Cocos nucifera* L.) from Andaman and Nicobar Islands. *Current Science* 94(12), 1627-1631.
- Ribeiro, F.E., Baudouin, L., Lebrun, P., Chaves, L.J., Brondani, C., Zucchi, M.I y Vencovsky, R. (2010). Population structures of Brazilian tall coconut (*Cocos nucifera* L.) by microsatellite markers. *Genetics and Molecular Biology*, 33,4,696-702.
- Rivera, R., Edwards, K., Barker, J.H., Arnold, G. M., Ayad, G., Hodgkin, T. y A. Karp (1999). Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in *Cocos nucifera* L. *Genome*, 42, 668-675.
- Rodhe W., Randles J., Langridge P. y Hanold D. (1990). Nucleotide sequence of a circular single-stranded DNA associated with coconut foliar decay virus, *Virol*, 176:648-51.
- Rosengarten F. (1986). Estudio del proceso de producción Agrícola del cocotero (*Cocos nucifera* L.) en el ejido de San Crisanto, Sinanché, Yucatán. *Coconut. Principes* 30(2) (42-62). En Xix Aké G. 1994 Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Mérida.

Saitou, N. y Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4 (44), 406-425.

Santos, G., Batugal p., Qthamn, A., Baudouin, L. y Labouisse, J.P (1996). *Manual on Standard technics Cocotero*. IPGRI. Rome. 80 pp.

Secuenciadores capilares.

<http://www.iib.uam.es/servicios/seq/otros/SecuenciaADN/capilar> (Acceso: 10/Enero/12)

SIAP (2011). Servicio de Información Agropecuaria y Pesquera (2011), http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=350 (Acceso: 26/Febrero/2013).

Sistema para análisis genético CEQ™ 8800. http://www.accesolab-sii.com/Descripciones/beckman/CEQ_8800.pdf. (Acceso: 4/Octubre/2012).

Sneath, P. H. A. y Sokal, R.R. (1973). *Numerical taxonomy*. W. H. Freeman and Co., San Francisco. 573 pp.

Tan, R. R., Culaba, A. B y Purvis, M. R. I. (2004). Carbon balance implications of coconut biodiesel utilization in the Philippine automotive transport sector. *Biomass and Bioenergy*, 26(6), 579-585. doi: DOI: 10.1016/j.biombioe.2003.10.002.

Uhl, N. W. y Dransfield, J. J. (1987). *Genera Palmarum*. L. H. Bailey Hortorium and International Palm Society. Ithaca, New York.

Valadez, M. y Kahl, G. (2000). Huellas de ADN de genomas de plantas. *Mundiprensa*, 147 pp.

Van Belkum, A.; Scherer, S., van Alphen, L. y Verbrug, H. (1998). Short-Sequence DNA Repeats in prokaryotic genomes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*; 62 (2): 275-293.

- Woodroof, J. G. (1970). Coconuts: Production, processing, products. Avi Publishing Co. Westport, Connecticut. 241 p.
- Zietkiewics E., Rafalski A. y D. Lauda. (1994). Genome fingerprintings by Simple Sequence Repeat (SSR) –Anchored polymerase Chain Reaction Application. *Genomics* 20:176-183.
- Zizumbo-Villarreal, D. (1996). History of coconut (*Cocos nucifera* L.) in Mexico: 1539-1810. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 43, 505-515.
- Zizumbo-Villarreal, D. y Piñero, D. (1998). Pattern of morphological variation and diversity of *Cocos nucifera* (*Aracaceae*) in Mexico. *American Journal of Botany*, 85, 855-855.
- Zizumbo-Villarreal, D., Fernández, M., Torres, N. y Cardeña, R. (1999). Lethal Yellowing resistance in coconut germoplasm from México, in *Current Advances in Coconut Biotechnology*, Oropeza C., J. L. Verdell, G. R. Ashburner, R. Cardeña and J. M. Santa-María (eds). Kluwer, Dordrecht. pp. 131-145.
- Zizumbo- Villarreal, D., Been, B., Tupinamba, E. A., Castillo, R., y Oropeza, C. (2005a) Research on coconut genetic resources in Latin America and the Caribbean In: *Coconut Genetic Resources*, Batugal, P., R. Ramanatha and J. Oliver (eds), IPGRI, Serdang Selangor DE, Malaysia, pp. 557-567
- Zizumbo-Villarreal, D., Ruiz Rodríguez, M., Harries, H. C. y Colunga- GarcíaMarín, P. (2006). Population genetics, Lethal Yellowing disease and relationships among mexican and imported coconut ecotypes. *Crop Science*, 46, 2509
- Zizumbo-Villareal, D., Colunga-García Marín P, Fernández-Barrera, M, Torres-Hernández, N. y Oropeza C. (2008). Mortality of Mexican coconut germplasm due to lethal yellowing. *Plant Genetic Resorces Newsletter*, FAO-Bioversity 156, 23-33.

CAPÍTULO II

EVALUACIÓN COMPARATIVA DEL ANÁLISIS GENÉTICO CON MICROSATÉLITES A PARTIR DE ADN DE HOJA Y TRONCO

2.1 INTRODUCCIÓN

Brasil y México son los países que sobresalen en cuanto a volumen de producción en América, según FAO para el 2010 participaron con el 4.33% y 1.57% de la producción ubicándose como el cuarto y octavo productor a nivel mundial respectivamente (CONACOCO, 2012). En México, el cocotero es uno de los cultivos de mayor importancia económica en el trópico, al cubrir una superficie cercana a 145, 456 has de las cuales dependen aproximadamente 35 mil familias que viven directamente del cultivo (SIAP, 2011).

Sin embargo, el cocotero en México presenta problemáticas las cuales se puede englobar en la baja productividad de las plantaciones ya existentes y en la disminución de la superficie del cultivo. Las principales causas de estos problemas son: escasas prácticas del cultivo, plantaciones viejas, enfermedades y plagas. Entre las enfermedades, la más destructiva es el amarillamiento letal (AL) causado por fitoplasmas (Harrison y Oropeza 2008; Zizumbo *et al.*, 2008).

Para enfrentar al problema del AL es indispensable renovar las plantaciones con variedades resistentes a esta enfermedad y altamente productivos. Para ello es imprescindible la búsqueda de germoplasma resistente que dispone el país como germoplasma suplementario localizado en otros países, para lo cual se han planteado a los estudios genéticos basados en marcadores moleculares como los más adecuados para realizar este tipo de estudios. En este trabajo se emplean los marcadores tipo microsatélites (SSR) los cuales han demostrado ser una herramienta útil en la realización de estudios genéticos, entre los que se encuentran el análisis de la diversidad y de relaciones genéticas entre individuos y poblaciones (Lebrun *et al.*, 1998; Baudouin y Lebrun, 2002; Meerow *et al.*, 2003; Perera *et al.*; 2000; 2001; 2003; Rajesh *et al.*, 2008).

También se han utilizado para realizar inferencias sobre la procedencia de las introducciones (Baudouin y Lebrun, 2009), para identificar poblaciones e individuos (Baudouin *et al.*, 2004; Perera *et al.*, 2008) y para la construcción de mapas de ligamiento (Lebrun *et al.*, 2001).

Hasta el momento para *Cocos nucifera* se ha desarrollado una metodología de SSR que requiere el uso específico de muestras de tejido de hoja (Baudouin y Lebrun, 2002). Sin embargo, el empleo de este tejido presenta dificultades como: dificultad de acceder a la copa, riesgo de accidentes, dificultad de encontrar quien realice la colecta, es costoso y se invierte mucho tiempo, por lo que dichos riesgos se reducirían al emplear el tronco para la obtención de ADN, ya que las ventajas que presenta son: no hay que subir a la copa, sin riesgo de accidentes, la colecta es más fácil, es menos costoso y es rápido.

Por lo anterior, en este capítulo se evaluaron comparativamente tres protocolos para la obtención de ADN tanto de hoja como de tronco. Los protocolos que se probaron fueron: Sílica (Echeverría- Machado, Ileana *et al.*, 2005), CTAB (Doyle y Doyle, 1990) y el Kit de ChargeSwitch® (Invitrogen). Se evaluó su eficiencia para elegir el protocolo más adecuado para la obtención de ADN y contestar si es conveniente el uso del tejido de tronco como fuente de tejido para la obtención de muestras para análisis genético con microsatélites.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Colecta del material

Las muestras de hoja y tronco se colectaron en dos plantaciones en la costa norte de la península de Yucatán. En la plantación experimental de Mira Mar en Telchac Puerto, Yucatán, donde se muestrearon 5 palmas de la variedad Enano Malayo Amarillo (EMA) y en la plantación experimental de Caridad de Cobre en San Crisanto, Sinanché, Yucatán donde se muestrearon 5 palmas de la variedad Alto Oeste Africano (WAT). Los tejidos vegetales colectados fueron de plantas adultas de hoja joven y tronco. En cada palma selecta se colectaron dos pinas (foliolos) de la hoja joven y aproximadamente un gramo de aserrín del tronco con la ayuda de un taladro, los tejidos fueron recibidos en una bolsa de polietileno evitando el contacto de estos con las manos. Posterior a la obtención de la muestra del tejido de tronco, la perforación fue subsanada colocando un taquete de madera y la herida se asperjó con fungicida timol para evitar el ataque de insectos u hongos. Por último se etiquetaron las muestras (hoja y tronco) y se mantuvieron en una nevera con hielo para evitar daños en el tejido.

2.2.2 Extracción y purificación de ADN

Primeramente se llevó a cabo la extracción y purificación de ADN de hoja y tronco de las muestras de Enano Malayo Amarillo (EMA) y solamente esta variedad se empleo para realizar la comparación de los tres protocolos de extracción. En base a los resultados obtenidos que se muestran más adelante, se eligió el método propuesto por el Kit (invitrogen) como el más eficiente para la extracción de ADN de ambos tejidos (hoja y tronco) por lo que después se realizó la extracción de ADN de los tejidos de la variedad Alto Oeste Africano (WAT). El protocolo de este Kit se describe a continuación.

2.2.2.1 Protocolo del Kit ChargeSwitch®

Para la extracción del ADN se siguió el protocolo del Kit de ChargeSwitch® (Invitrogen). El método de extracción consistió en macerar 100 mg del tejido vegetal con nitrógeno líquido usando mortero y pistilo; el tejido pulverizado se colocó en un tubo de 2 ml el cual se congeló en nitrógeno para evitar que se fenolice la muestra. Posteriormente se añadió 1 ml de buffer de lisis, 2 µl de RNAasa y 100 µl de SDS al 10% y se mezcló suavemente por inversión (las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos). Después se añadió 400 µl de buffer de precipitación (se mezcló por inversión 10 segundos) y se centrifugó a 14,000 rpm por 7 minutos a 20°C y se transfirió el sobrenadante aproximadamente 1.2 ml a un nuevo tubo y se le añadió 100 µl de detergente (D1) al 10% y 40 µl de perlas magnéticas (figura 2.1C). Se mezcló suavemente por pipeteo, 5 veces. Se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto y se colocaron los tubos en el MagnaRack™ (figura 2.1A) hasta que las perlas formaron un conjunto comprimido y el sobrenadante quedó claro. Sin remover los tubos del magneto, cuidadosamente se aspiró y descartó el sobrenadante sin mover el conjunto de perlas (para evitar aspirar y descartar algunas de estas, se recomienda que la punta de la pipeta este al lado contrario del conjunto de perlas). Inmediatamente se procedió al lavado del ADN, se removieron los tubos del magneto, se añadió 1 ml de buffer de lavado y se mezcló suavemente por pipeteo, 5 veces. Se colocaron los tubos en el magneto hasta que las perlas formaron un conjunto comprimido y el sobrenadante quedó claro (figura 2.1B). Sin remover los tubos del magneto, cuidadosamente se aspiró y descartó el sobrenadante. Se removieron los tubos del magneto y se repitió el lavado. Por último se procedió a eluir el ADN, añadiendo 25 µl de buffer de elución y se mezcló suavemente por pipeteo. Se colocaron los tubos en el magneto hasta que las perlas formaron un conjunto comprimido y el sobrenadante quedó claro, sin remover los tubos del magneto, cuidadosamente se transfirió el sobrenadante que contiene el ADN a nuevos tubos. Por último se repitió el paso de elución.

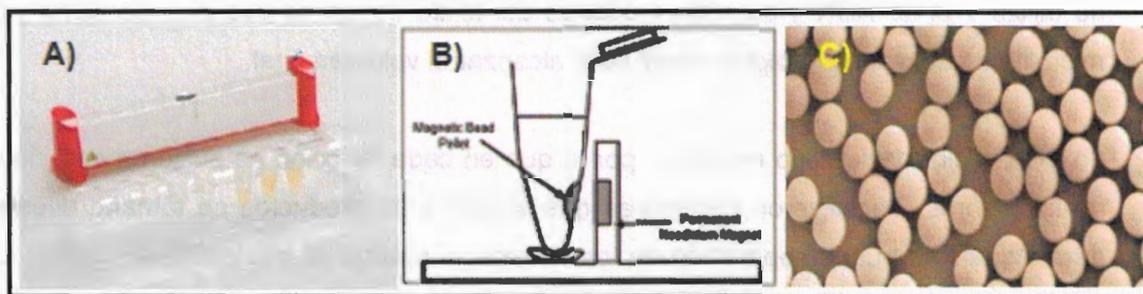


Figura 2.1 A) MagnaRack™. B) Pastilla de perlas magnéticas que se forma a un lado de cada tubo y permite una fácil extracción del sobrenadante. C) Perlas magnéticas.

2.2.3 Cuantificación de ADN

El método que se empleó para la cuantificación de ADN, fue por espectrofotometría con el equipo NANODROP 1000 (Thermo Scientific). Se tomó 2 μl de la muestra y se colocó en el equipo, con esta cantidad se asegura resultados correctos y reproducibles cuando se miden muestras de ácidos nucleicos.

2.2.4 Amplificación por PCR

Se realizaron diluciones (1:100) del stock de ADN obtenido del tejido de hoja de las muestras de EMA y WAT, para las muestras de tejido de tronco no se realizaron diluciones. Para la reacción de PCR se utilizaron 8 pares de iniciadores microsátélites del "Kit para identificación de cultivares de cocotero" desarrollado por Baudouin y Lebrun (2002) (cuadro 2.1). Los iniciadores Forward (F) y Reverse (R) que se utilizaron para la PCR solamente los iniciadores F (forward) fueron marcados con dos fluoróforos (WellRED): D4 (azul) y D3 (verde). El volumen final de las amplificaciones fue de 25 μl . La mezcla de reacción consistió de: 5 μl buffer (5X), 1 μl de Cloruro de Magnesio (50 mM), 0.5 μl de la mezcla dNTP's (10 mM), 0.3 μl Taq polimerasa (5 U/ml), 1 μl del iniciador Forward D4 (2.5 μM), 1 μl del iniciador Reverse (10 pmol), 1 μl del iniciador Forward D3 (2.5 μM), 1 μl del iniciador Reverse (10 pmol), ADN genómico (para las muestras del tejido de hoja

se utilizó 1 µl de ADN y para las muestras del tejido tronco se usó 2 µl de ADN) y los microlitros necesarios de agua estéril para alcanzar el volumen final.

La PCR realizada fue tipo multiplex, por lo que en cada reacción se pusieron dos juegos de iniciadores. Se eligieron iniciadores que amplificaran productos de tamaño diferente para lograr una buena separación de los mismos al realizar la electroforesis capilar. Las condiciones de amplificación utilizadas fueron: 5 minutos de desnaturalización inicial a 94°C; 35 ciclos de: desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineamiento a 51°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto, con una extensión final a 72 °C por 30 minutos.

Cuadro 2.1 Secuencia de los iniciadores que serán empleados en la mezcla de reacción para PCR (Baudouin y Lebrun, 2002).

Iniciadores	Secuencias (F:Forward, R:Reverse)
A3F	D4 AATCTAAATCTACGAAAGCA
A3R	AATAATGTGAAAAAGCAAAG
B12F	D3 GCTCTTCAGTCTTTCTCAA
B12R	CTGTATGCCAATTTTTCTA
C7F	D4 ATAGCATATGGTTTTCT
C7R	TGCTCCAGCGTTCATCTA
H4F	D3 TTAGATCTCCTCCCAAAG
H4R	ATCGAAAGAACAGTCACG
E12F	D4 TCACGCAAAAGATAAAACC
E12R	ATGGAGATGGAAAGAAAGG
F2F	D3 GGTCTCCTCTCCCTCCTTATCTA
F2R	CGACGACCCAAAACACTGAACAC
A9F	D4 AATGTTTGTGTCTTTGTGCGTGTGT
A9R	TCCTTATTTTTCTTCCCCTTCTCA
E10F	D3 TTGGGTTCCATTTCTTCTCTCATC
E10R	GCTCTTTAGGGTTCGCTTTCTTAG

En el cuadro 2.2 se reportan el nombre y tamaño de alelos de 14 iniciadores desarrollados por Baudouin y Lebrun (2002) para cultivares de cocotero con dos muestras testigo: una de la variedad Alto Oeste Africano (WAT) y la otra de la variedad Enano Malayo Amarillo (EMA) denominadas T1 y T2 respectivamente, las cuales son estándares para determinar el tamaño de los alelos.

Cuadro 2.2 Patrones microsatelitales. Nombre y tamaño de alelos de 14 iniciadores con dos muestras testigo: Alto Oeste Africano (T1) y Enano Malayo Amarillo (T2) son muestras estándares para determinar el tamaño del alelo.

Nombre	T1= Alto	T2= Enano
	Tamaño de alelos reportados (pb)	Tamaño de alelos reportados (pb)
CnCir A3	228-228	240-240
CnCir A9	097-097	089-089
CnCir B6	196-204	202-202
CnCir B12	163-163	169-169
CnCir C3	178-206	176-176
CnCir C7	165-167	161-161
CnCir C12	158-158	174-174
CnCir E2	163-163	135-135
CnCir E10	244-244	238-238
CnCir E12	174-174	164-164
CnCir F2	193-193	205-205
CnCir G11	184-188	174-174
CnCir H4	230-230	230-230
CnCir H7	133-133	139-139

2.2.5 Electroforesis capilar

Debido a inconvenientes técnicos que se presentaron con el secuenciador ABI 310 en el cual se realizarían los análisis microsatelitales, se tuvo la necesidad de utilizar el secuenciador CEQ™ 8800 (Beckman). Pevio a colocar las muestras en el secuenciador, se realizó una mezcla de reacción la cual contiene por muestra: 25 µl de SLS (Sample Loading Solution-formamida) y 0.25 µl de DNA Size Standard Kit-400 (ROX), este último es importante darle un vortex aproximadamente durante un minuto para asegurar su total homogenización. Teniendo la mezcla preparada, se dosifica en una placa de 96 pozos (25.25 µl en cada pozo) por último se adicionó 0.2 µl del producto de PCR de las muestras y finalmente se colocó la placa en el secuenciador.

2.2.6 Obtención de datos

Una vez finalizada la corrida en el secuenciador, los datos crudos obtenidos como resultado de la detección de los fragmentos amplificados son importados al programa GeneMarker™ y se procedió a verificar visualmente los resultados arrojados en los electroferogramas, confirmando la presencia o ausencia de cada uno de los fragmentos en cada una de las muestras.

2.2.7 Análisis genéticos utilizando datos moleculares

2.2.7.1 Análisis de relaciones genéticas

Los análisis de relaciones genéticas entre poblaciones se realizaron con ayuda del programa bioinformático POPGENE 32 v1.32 (Yeh *et al.*, 1999), el cual genera un dendograma basado en las distancias genéticas de Nei (1978) con el método de agrupamiento UPGMA. Los dendogramas se realizaron a nivel de poblaciones (se emplearon 5 individuos por población) y las matrices de datos se procesaron en Excel 2007. El despliegue gráfico de los dendogramas se obtuvo con el programa TreeView v1.66 (Roderick, 2001).

2.2.8 Pruebas preliminares con microsatélites empleando el Kit de ChargeSwitch.

Para esta prueba se emplearon 5 muestras de hoja de la variedad Alto Oeste Africano (WAT), el ADN se obtuvo con el protocolo de Sílica. Se utilizó esta variedad como control debido a que ya está caracterizada y se conoce el tamaño de los fragmentos esperados, de igual manera permite saber si el protocolo que se está siguiendo es adecuado. También se emplearon cuatro muestras de tronco provenientes de San Crisanto, Sinanché, Yucatán con las siguientes claves: GA-13, G4-171, G4-156 y G2-117 siendo éstas de la variedad Alto del Pacífico, de las cuales se extrajo ADN con el Kit de

ChargeSwitch y también se emplearon muestras extraídas con el protocolo de CTAB. Para esta prueba se utilizaron dos juegos de iniciadores A3 (FAM) y B12 (NED). Posteriormente los datos crudos obtenidos como resultado de la detección de los fragmentos amplificados en el secuenciador ABI 310 fueron importados al programa GeneMarker™, para realizar la lectura de los electroferogramas y visualizar el tamaño de fragmentos obtenidos en cada una de las muestras.

2.2.9 Estandarización de la electroforesis capilar con los iniciadores WellRED

Debido a inconvenientes técnicos que se presentaron con el secuenciador AB1 310 en el cual se realizarían los análisis microsatelitales, se tuvo la necesidad de utilizar el secuenciador CEQ™ 8800 (Beckman) cuyas características se describieron anteriormente. Este secuenciador emplea marcadores infrarrojos incorporados en las muestras, asegurando alta sensibilidad en las lecturas, por tal motivo se tuvieron que marcar 8 iniciadores (forward) para poder llevar a cabo los análisis en este secuenciador. Se realizó una primera corrida con los siguientes pares de iniciadores: A3 (azul), B12 (verde) y C7 (azul), H4 (verde) empleando muestras de hoja y de tronco de la variedad Alto Oeste Africano (WAT) con fines comparativos.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Comparación de los tres protocolos para la obtención de ADN de hoja y tronco

Se emplearon tres protocolos de forma comparativa para la obtención de ADN de hoja y tronco. Los protocolos que se probaron fueron: Silica (Echeverría- Machado *et al.*, 2005), CTAB (Doyle y Doyle, 1990) y el Kit de ChargeSwitch® (Invitrogen). Se empleó el ADN de la variedad Enano Malayo Amarillo (EMA) para las pruebas antes mencionadas. Los resultados obtenidos con los diferentes protocolos se ilustran a continuación.

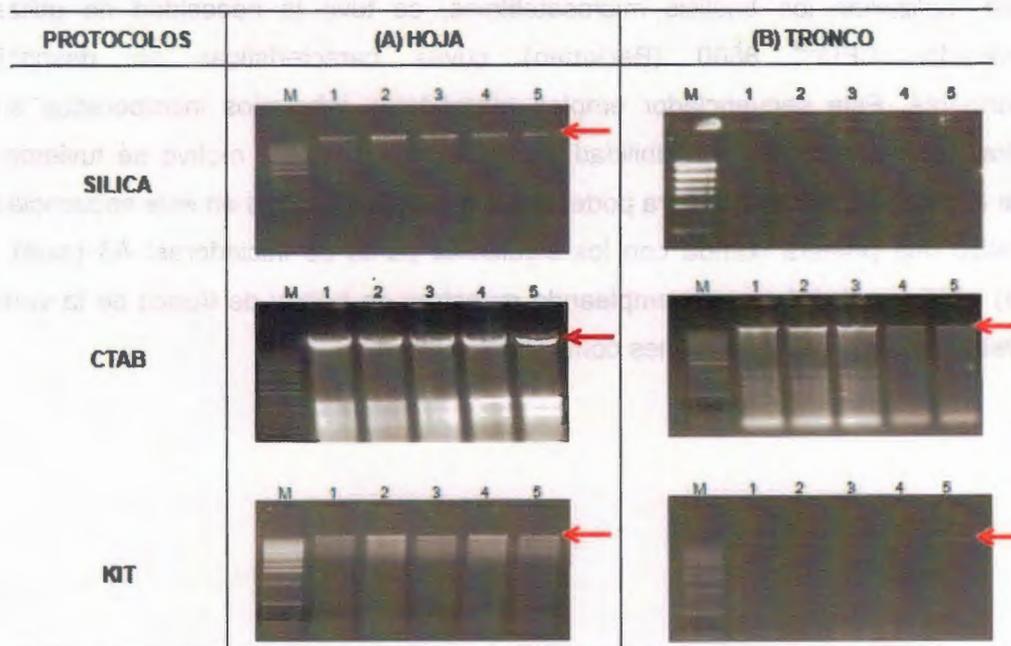


Figura 2.2 Geles de agarosa que muestran ADN extraído de hoja y tronco con tres diferentes protocolos. M: marcador molecular de 1 kb (invitrogen). Carriles del 1 al 5: ADN de 5 individuos de la variedad Enano Malayo Amarillo. La flecha roja indica el ADN extraído.

En la figura 2.2 se puede observar que para el tejido de hoja se logró extraer ADN con los tres protocolos; por el contrario para el tejido de tronco se obtuvo ADN con los protocolos de CTAB y el Kit; con Sílica no se obtuvo ADN. En base a estos resultados, se pudo observar que con el Kit se obtuvo poco ADN en ambos tejidos, pero más limpio en comparación con el protocolo de CTAB y para poder tener caracterizado estos resultados se cuantificaron las muestras para saber la cantidad y calidad de ADN obtenido, los resultados se presentan en el cuadro 2.3.

Cuadro 2.3 Cuantificación de las muestras de ADN de hoja y tronco de cocotero de la variedad Enano Malayo Amarillo (EMA) extraídos con el Kit de ChargeSwitch. Cantidad de ADN (ng/μl). Absorbancias a 260/230 nm y 260/280 nm indican la pureza de ADN.

Individuos (EMA)	Absorbancia en hoja (nm)			Absorbancia en tronco (nm)		
	ng/μl	260/230	260/280	ng/μl	260/230	260/280
1	147.9	1.22	2.02	89.4	0.94	1.77
2	364.8	1.03	1.78	36.1	0.57	1.76
3	154.0	1.28	1.90	60.3	0.82	1.75
4	266.5	1.26	1.87	28.8	0.39	1.64
5	209.9	1.28	1.90	56.0	0.59	1.63
Promedio	228.62			54.12		

La cantidad de ADN promedio que se obtuvo de hoja es aproximadamente cuatro veces mayor que la de tronco; en cuanto a la calidad y pureza de ADN el rango esperado es de 1.8 a 2.0 a 260/280 nm (Sambrook *et al.*, 1989) en el caso de hoja los cinco individuos están dentro del rango y en el caso de tronco los valores obtenidos no cayeron en el rango pero tienen valores cercanos.

2.3.2 Pruebas preliminares con microsatélites empleando el Kit de ChargeSwitch y el secuenciador ABI 310

Para saber si el ADN extraído de tronco con el kit de ChargeSwitch es útil para realizar los estudios de microsatélites, se realizó una prueba preliminar. Esta prueba se realizó con dos juegos de iniciadores A3 (FAM) y B12 (NED) con los cuales se llevo a cabo PCR de punto final, posteriormente los productos fueron fraccionados en un gel de agarosa para asegurar que haya amplificación y del tamaño esperado, por último el producto de PCR fue analizado por electroforesis capilar.

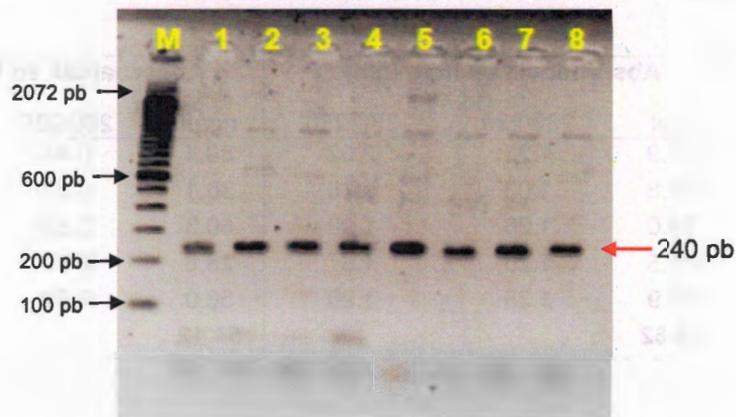


Figura 2.3 Electroforesis en gel de agarosa al 3% del producto amplificado obtenido con el ADN extraído con el Kit de ChargeSwitch. M: marcador de 100pb (invitrogen). Carriles de 1 a 4: producto de PCR con 1µl de ADN. Carriles de 5 a 8: producto de PCR con 2µl de ADN.

Como se puede observar en la figura 2.3 se obtuvieron bandas del tamaño esperado y con buena intensidad. Las bandas observadas son de 240 pb tal y como se esperaba con el iniciador A3 de igual manera no se observó diferencias al emplear 1 µl ó 2 µl de ADN para la amplificación por PCR, sin embargo se decidió utilizar 2 µl para realizar los análisis con microsatélites y de esta manera asegurar una buena amplificación de las muestras. También se puede observar en el gel un bandeo inespecífico, sin embargo esto es característico al emplear los iniciadores microsatélites. Por ejemplo en los geles reportados en la base de datos CGRD, también se puede observar este bandeo.

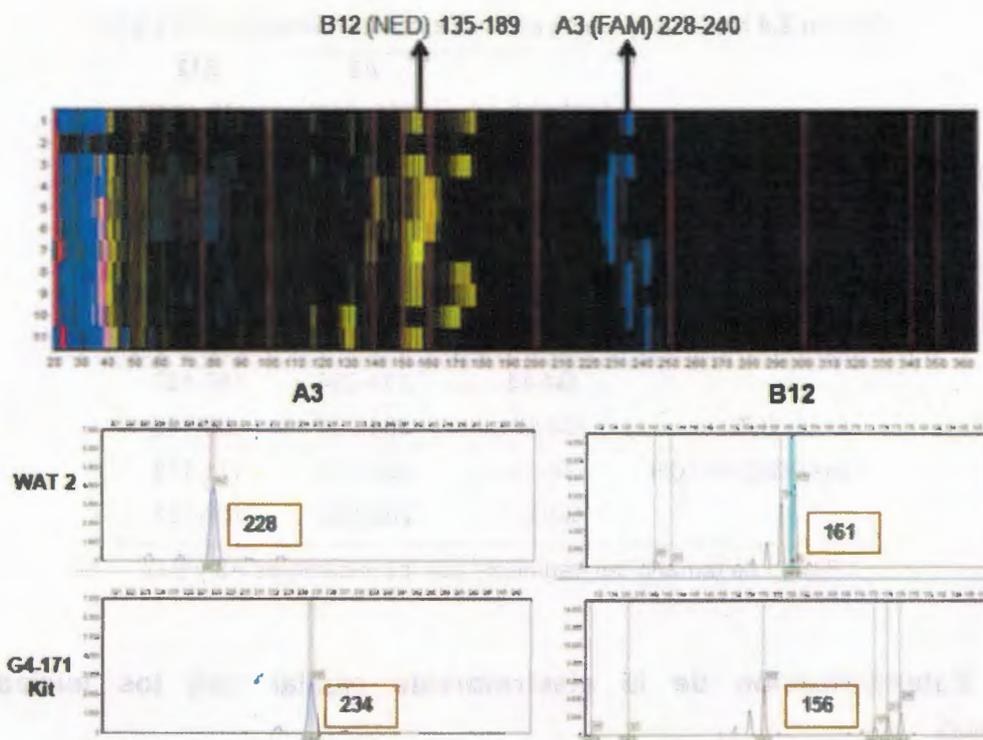


Figura 2.4 Imagen del gel obtenido con electroforesis capilar. Se muestran los fragmentos amplificados con los iniciadores A3 y B12 con dos muestras: WAT 2 y G4-171 (muestra obtenida con el kit de ChargeSwitch).

Los resultados obtenidos con la electroforesis capilar (figura 2.4) nos indican que el ADN extraído de tronco empleando el Kit de ChargeSwitch es útil para realizar estudios con microsatélites ya que se observaron fragmentos de tamaño esperado con los iniciadores probados y con una buena intensidad en los picos. Con el protocolo de CTAB no se obtuvieron fragmentos de tamaño esperado y en algunos casos no se observó el fragmento (datos no mostrados). En el cuadro 2.4 se puede observar los alelos obtenidos para cada una de las muestras empleadas en esta prueba. Es importante mencionar que con los controles (ADN de hoja), también se obtuvieron fragmentos de tamaño esperado y con una buena intensidad en los picos, lo que indica que la técnica de electroforesis capilar está funcionando con las condiciones probadas.

Cuadro 2.4 Muestras y alelos obtenidos con los iniciadores A3 y B12

MUESTRAS	A3	B12	
	(228-240)*	(135-189)*	
CONTROLES	WAT 1	228-228	161-161
	WAT 2	228-228	161-161
	WAT 3	228-228	161-161
	WAT 4	228-228	161-161
	WAT 5	228-228	161-161
KIT	G4-13	234-234	157-157
	G4-171	234-234	156-156
CHARGESWITCH	G4-156	234-240	171-171
	G2-117	240-240	157-157

* Rango de tamaño del fragmento con los iniciadores A3 y B12.

2.3.3 Estandarización de la electroforesis capilar con los iniciadores WellRED

La estandarización de la electroforesis capilar con los iniciadores WellRED se llevo a cabo para determinar las condiciones de corrida en el secuenciador, para esto se observó la intensidad del producto amplificado, la intensidad de los fluoruros empleados y de esta manera saber si la cantidad de ADN para la PCR fue la correcta o si era necesario realizar una dilución del producto de PCR antes de correr las muestras en el secuenciador para obtener una buena intensidad de los picos y poder realizar una lectura correcta de los mismos. Los resultados se interpretaron observando la intensidad de los picos en los electroferogramas y los alelos fueron analizados individualmente basados en la comparación con el marcador molecular y también con las muestras control reportadas en la literatura. Al analizar los resultados de la electroforesis capilar (imagen del gel y electroferogramas) con los siguientes iniciadores: A3 (azul), B12 (verde) y C7 (azul), H4 (verde); se pudo observar en el gel una buena separación de los productos amplificados, en cuanto a los electroferogramas obtenidos se observó el mismo alelo tanto para hoja como para tronco, estos resultados indican que la técnica de electroforesis capilar está funcionando con las condiciones probadas y que el tejido de tronco es útil para realizar estudios de microsatélites.

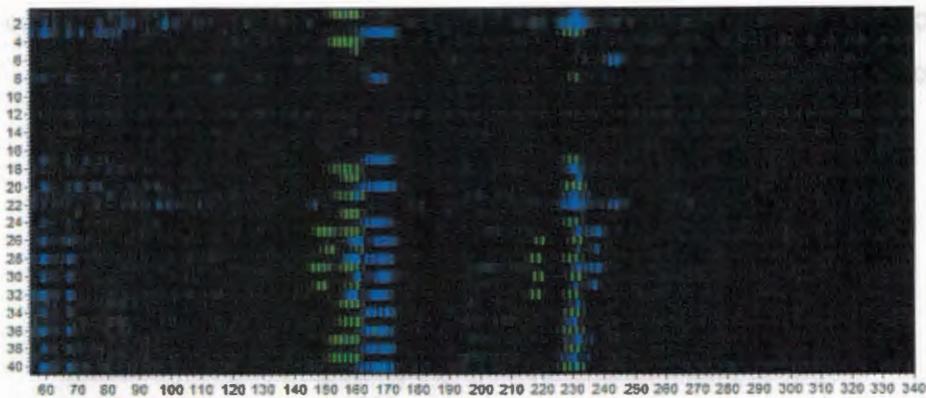


Figura 2.5 Imagen del gel obtenido con electroforesis capilar con el software GeneMarker. La corrida se realizó con los iniciadores A3 y C7 (bandas azules), B12 y H4 (bandas verdes).

A) Electroferogramas con las muestras de ADN de hoja y tronco con el iniciador A3.

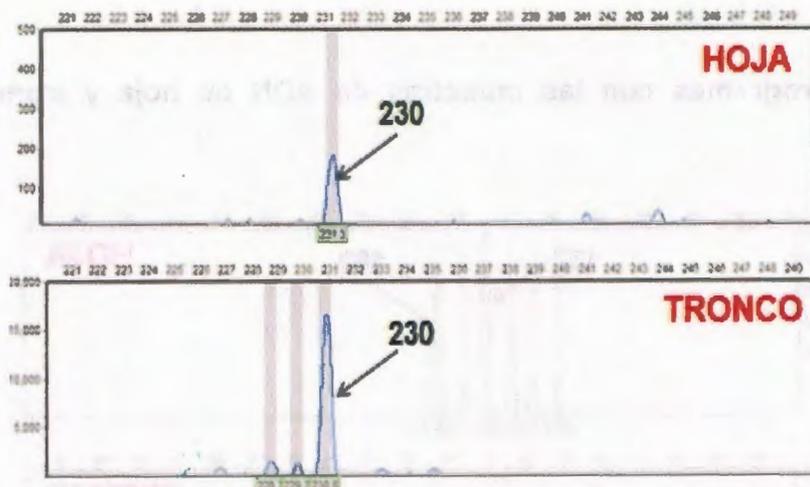


Figura 2.6 Electroferogramas en el que se compara el resultado que se obtiene con el iniciador A3, con un alelo de 230 pb para ambos tejidos. La presentación homocigota de los alelos se muestra respectivamente.

B) Electroferogramas con las muestras de ADN de hoja y tronco con el iniciador B12

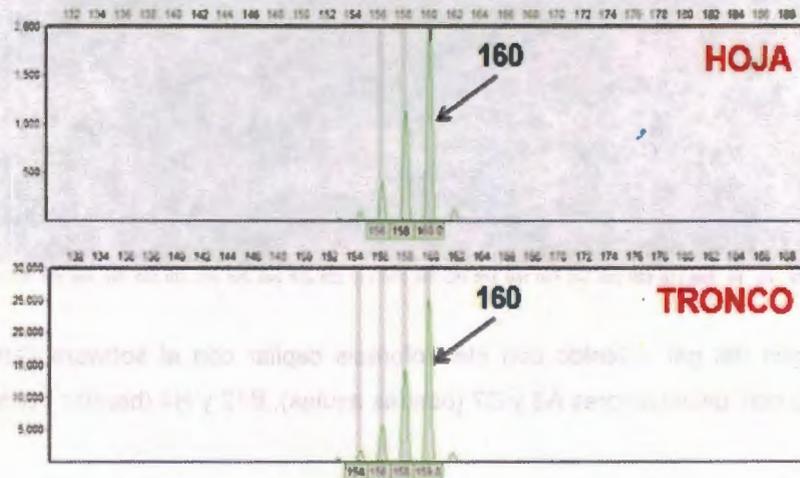


Figura 2.7 Electroferogramas en el que se compara el resultado que se obtiene con el iniciador B12, con un alelo de 160 pb para ambos tejidos. La presentación homocigota de los alelos se muestra respectivamente.

C) Electroferogramas con las muestras de ADN de hoja y tronco con el iniciador C7

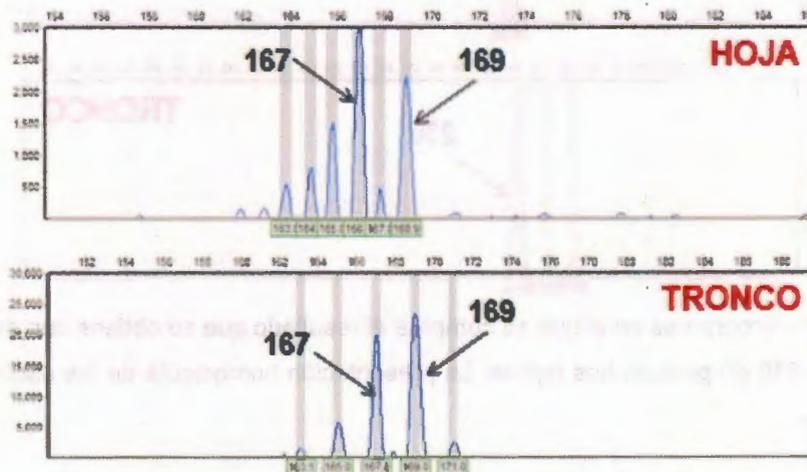


Figura 2.8 Electroferogramas en el que se compara el resultado que se obtiene con el iniciador C7, con dos alelos uno de 167 pb y otro de 169 pb para ambos tejidos. La presentación heterocigota de los alelos se muestra respectivamente.

D) Electroferogramas con las muestras de ADN de hoja y tronco con el iniciador H4

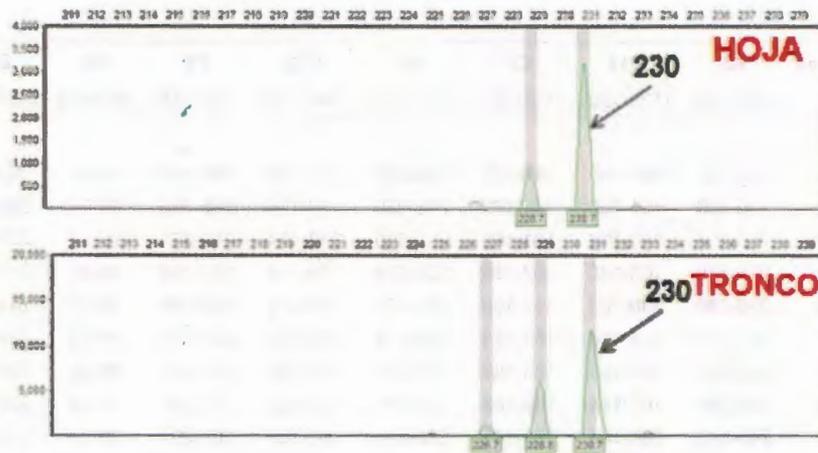


Figura 2.9 Electroferogramas en el que se compara el resultado que se obtiene con el iniciador H4, con un alelo de 230 pb para ambos tejidos. La presentación homocigota de los alelos se muestra respectivamente.

2.3.4 Análisis genético utilizando datos moleculares obtenidos de muestras de hoja y tronco con fines comparativos

Una vez estandarizada la técnica de electroforesis capilar con los iniciadores WellRED, se procedió a realizar el estudio con SSR empleando tejido de hoja y tronco de 5 muestras de la variedad Alto Oeste Africano (WAT) y 5 muestras de la variedad Enano Malayo Amarillo (EMA). Posteriormente se llevaron a cabo los análisis genéticos con la ayuda del programa POPGENE 32 v1.32 para generar los dendogramas y poder visualizar el agrupamiento de las muestras. Con ello esperamos patrones de agrupamiento similares utilizando ADN de tronco y de hoja.

En el cuadro 2.5 se observan los alelos obtenidos con 8 iniciadores para las muestras empeladas en este estudio, posteriormente se realizó un dendograma (figura 2.10) en el que se puede apreciar la formación de dos grupos principales, uno conformado por la variedad WAT con los tejidos de hoja y tronco; y el segundo grupo conformado por la variedad EMA tanto con los tejidos de hoja como de tronco.

Cuadro 2.5 Individuos y tamaño de alelos obtenidos con 8 iniciadores en dos poblaciones de cocotero (WAT y EMA) para ambas variedades se emplearon los tejidos de hoja y tronco.

Individuos	A3 (228-248)	B12 (135-189)	C7 (157-181)	H4 (218-236)	E12 (162-174)	F2 (191-215)	A9 (89-105)	E10 (226-246)
HOJA								
WAT 1	230-230	160-160	167-169	230-230	174-174	195-195	97-97	244-244
WAT 2	230-236	151-160	161-169	218-230	162-174	195-203	95-97	226-244
WAT 3	230-236	149-160	161-169	218-230	162-174	195-207	95-97	226-244
WAT 4	230-230	160-160	167-169	230-230	174-174	195-195	95-95	244-244
WAT 5	230-230	160-160	167-169	230-230	174-174	195-195	95-97	244-244
EMA 1	243-243	164-164	163-163	230-230	162-162	207-207	89-89	238-238
EMA 2	243-243	164-164	163-163	230-230	162-162	207-207	89-89	238-238
EMA 3	243-243	164-164	163-163	230-230	162-162	207-207	89-89	238-238
EMA 4	243-243	164-164	163-163	230-230	162-162	207-207	89-89	238-238
EMA 5	243-243	164-164	163-163	230-230	162-162	207-207	89-89	238-238
TRONCO								
WAT 1	230-230	160-160	167-169	230-230	174-174	195-195	97-97	244-244
WAT 2	230-230	151-160	161-169	218-230	162-174	195-203	95-97	226-244
WAT 3	230-236	149-160	161-169	218-230	162-174	195-207	95-97	226-244
WAT 4	230-230	160-160	165-169	230-230	174-174	195-195	95-95	244-244
WAT 5	230-230	160-160	165-169	230-230	174-174	195-195	95-97	244-244
EMA 1	243-243	164-164	163-163	230-230	162-162	207-207	89-89	238-238
EMA 2	243-243	164-164	163-163	230-230	162-162	207-207	89-89	238-238
EMA 3	243-243	164-164	163-163	230-230	162-162	207-207	89-89	238-238
EMA 4	243-243	164-164	163-163	230-230	162-162	207-207	89-89	238-238
EMA 5	243-243	164-164	163-163	230-230	162-162	207-207	89-89	238-238

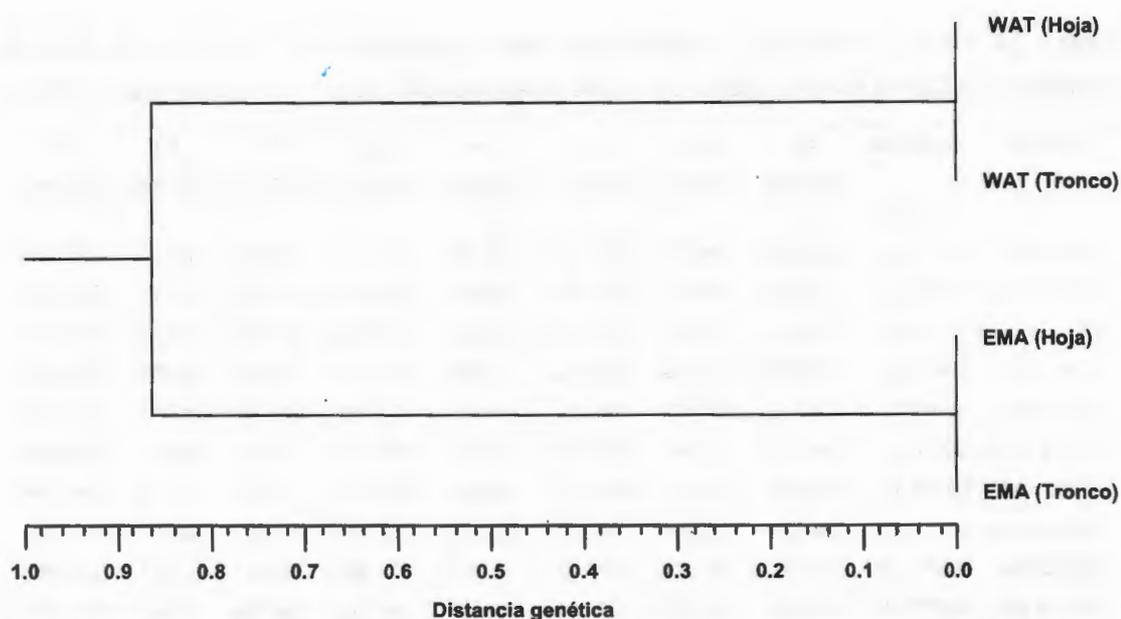


Figura 2.10 Dendrograma de análisis de poblaciones basado en las distancias genéticas de Nei *et al.*, (1978) y el método de agrupamiento UPGMA en dos poblaciones de cocotero (WAT y EMA): se emplearon cinco muestras de la variedad Alto Oeste Africano (WAT) y cinco muestras de la variedad Enano Malayo Amarillo (EMA) para ambas variedades se usaron los tejidos de hoja y tronco extraídos con el Kit de ChargeSwitch con fines comparativos.

De igual manera para comprobar la agrupación de las variedades altas y enanas del presente estudio con otras poblaciones ya reportadas por CIRAD, se realizaron dos dendrogramas incluyendo las variedades WAT y EMA empleadas en el presente estudio, la población EMA reportada por CIRAD y las variedades MXPTC (Alto Pacífico de Colima), MXPTG (Alto Pacífico de Guerrero), MXPTM (Alto Pacífico de Michoacán) y MXAT (Alto del Atlántico) también reportadas por CIRAD. En el cuadro 2.6 se observan los alelos reportados para las poblaciones de CIRAD y los alelos obtenidos para WAT y EMA con los 8 iniciadores utilizados para este estudio. En el dendrograma en la figura 2.11 utilizando tejido de hoja, se puede apreciar que las poblaciones de cocotero se agrupan de acuerdo al tipo de costa al que pertenecen, lo que da como resultado dos grupos principales, uno conformado por las poblaciones pertenecientes a la costa del Pacífico: MXPTC, MXPTG, MXPTM y las dos poblaciones enanas (EMA y EMA CIRAD). El segundo grupo conformado por las poblaciones pertenecientes a la costa del Atlántico: MXAT (Alto Atlántico) y WAT (Alto Oeste Africano).

Cuadro 2.6 Código, individuos y tamaños de alelos reportados, con 8 iniciadores para las poblaciones de CIRAD y alelos obtenidos con las muestras WAT y EMA empleando tejido de hoja.

Código	Individuos	A3 (228-248)	B12 (135-189)	C7 (157-181)	H4 (218-236)	E12 (162-174)	F2 (191-215)	A9 (89-105)	E10 (226-246)
ALTOS									
CIRAD-1009	MXPT_C1	230-240	135-173	163-181	226-230	164-174	195-205	103-103	238-238
CIRAD-1010	MXPT_C1	240-240	159-177	157-181	226-230	164-164	201-205	103-103	238-238
CIRAD-1011	MXPT_C1	234-240	159-177	157-181	226-230	164-164	201-205	103-103	238-238
CIRAD-367	MXPT_C1	234-240	159-159	157-165	230-230	164-164	203-203	89-103	238-238
CIRAD-368	MXPT_C1	240-240	135-177	163-165	218-230	164-166	203-203	89-103	238-238
CIRAD-1036	MXPT_G1	234-240	173-181	157-163	218-226	164-166	205-205	89-103	238-238
CIRAD-1037	MXPT_G1	234-240	173-173	157-157	218-218	164-166	199-199	89-103	238-238
CIRAD-1039	MXPT_G1	234-234	135-181	161-163	226-230	164-166	203-203	103-103	238-244
CIRAD-997	MXPT_G1	234-240	159-173	157-157	218-226	166-166	203-203	97-97	240-240
CIRAD-998	MXPT_G1	234-240	173-181	157-163	218-226	164-166	205-205	89-103	238-238
CIRAD-362	MXPT_M1	232-240	135-135	157-157	230-230	166-166	195-195	93-103	244-244
CIRAD-363	MXPT_M1	234-234	135-135	161-163	230-230	164-166	205-205	89-103	238-244
CIRAD-364	MXPT_M1	234-234	135-135	157-157	230-230	164-164	195-203	93-97	238-244
CIRAD-365	MXPT_M1	234-240	179-179	157-157	226-226	166-166	203-205	93-103	232-238
CIRAD-366	MXPT_M1	234-234	135-173	157-163	218-230	166-166	195-205	89-89	232-238
CIRAD-1003	MXAT	228-228	163-163	159-161	230-230	174-174	193-193	97-103	232-244
CIRAD-1005	MXAT	228-228	163-163	165-167	230-230	174-174	193-193	97-99	232-244
CIRAD-1006	MXAT	228-228	159-159	161-167	230-230	174-174	193-203	89-89	238-238
CIRAD-1007	MXAT	228-228	159-163	167-167	230-230	174-174	193-193	89-103	244-244
CIRAD-372	MXAT	228-228	159-163	159-167	230-230	174-174	193-193	89-103	232-238
	WAT 1	230-230	160-160	167-169	230-230	174-174	195-195	97-97	244-244
	WAT 2	230-236	151-160	161-169	218-230	162-174	195-203	95-97	226-244
	WAT 3	230-236	149-160	161-169	218-230	162-174	195-207	95-97	226-244
	WAT 4	230-230	160-160	167-169	230-230	174-174	195-195	95-95	244-244
	WAT 5	230-230	160-160	167-169	230-230	174-174	195-195	95-97	244-244
ENANOS									
CIRAD-41	MYD	240-240	169-169	161-161	230-230	164-164	205-205	89-89	238-238
CIRAD-91	MYD02	240-240	169-169	161-161	230-230	164-164	205-205	89-89	238-238
	EMA 1	243-243	164-164	163-163	230-230	162-162	207-207	89-89	238-238
	EMA 2	243-243	164-164	163-163	230-230	162-162	207-207	89-89	238-238
	EMA 3	243-243	164-164	163-163	230-230	162-162	207-207	89-89	238-238
	EMA 4	243-243	164-164	163-163	230-230	162-162	207-207	89-89	238-238
	EMA 5	243-243	164-164	163-163	230-230	162-162	207-207	89-89	238-238

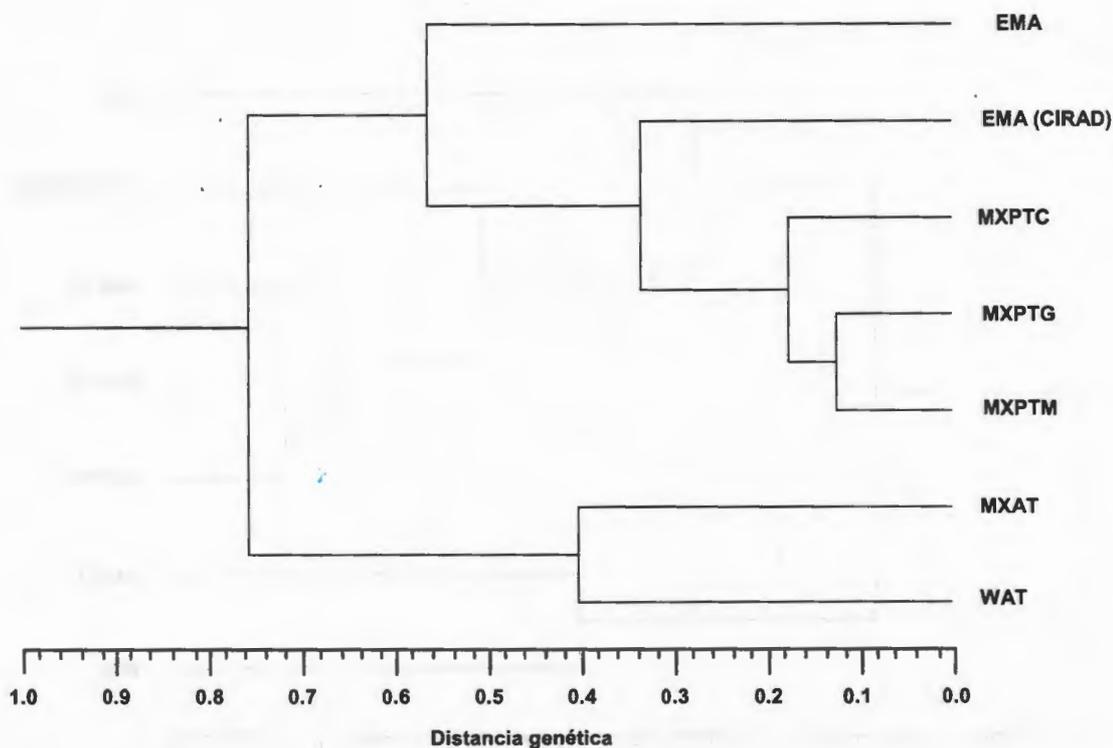


Figura 2.11 Dendrograma de análisis de poblaciones basado en las distancias genéticas de Nei *et al.*, (1978) y el método de agrupamiento UPGMA en siete poblaciones de cocotero: Alto Oeste Africano (WAT), Enano Malayo Amarillo (EMA) y cinco variedades de México: MXPTC, MXPTG, MXPTM, MXAT y EMA (pertenecientes a la base de datos CIRAD).

En el dendrograma en la figura 2.12 utilizando tejido de tronco para las muestras WAT y EMA comparadas con cinco poblaciones de CIRAD, se puede apreciar el mismo patrón de agrupamiento que al utilizar el ADN de hoja. Es importante señalar que tanto los EMA de estudio como los de CIRAD son monomórficos, pero se encontraron valores diferentes en los iniciadores A3, B12, C7, E12, F2, reportados por CIRAD (cuadro 2.6). Las diferencias van de 2 a 5 pares de bases, posiblemente debido a diferente método de lectura.

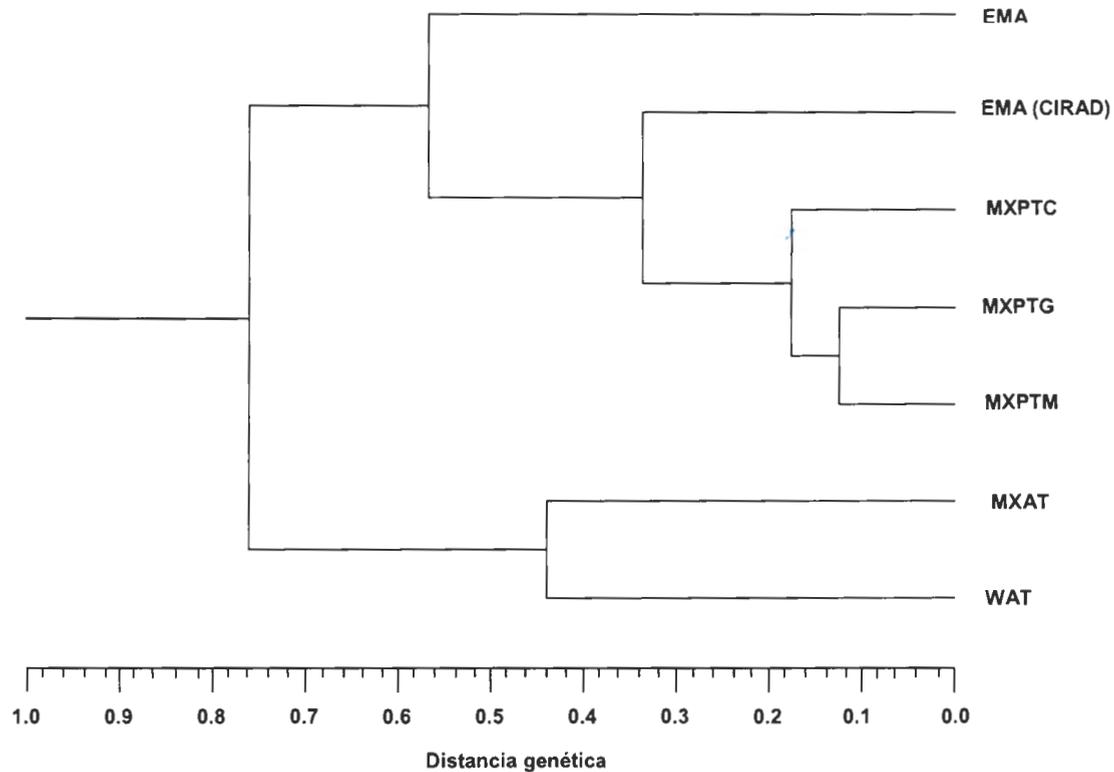


Figura 2.12 Dendrograma de análisis de poblaciones basado en las distancias genéticas de Nei *et al.*, (1978) y el método de agrupamiento UPGMA en siete poblaciones de cocotero: Alto Oeste Africano (WAT) y Enano Malayo Amarillo (EMA) utilizando tejido de tronco, comparadas con cinco variedades de México: MXPTC, MXPTG, MXPTM, MXAT y EMA (pertenecientes a la base de datos CIRAD).

2.4 DISCUSIÓN

Los marcadores del polimorfismos de ADN son herramientas valiosas para los estudios genéticos en plantas y en algunos casos ya están siendo empleados exitosamente en la selección de progenitores (Coto y Cornide, 2002). Estos marcadores se han considerado como las herramientas más aceptables para el estudio de la diversidad genética en coco (Lebrun *et al.*, 1995). De manera similar los marcadores SSR están siendo utilizados para la identificación, caracterización y evaluación de la diversidad genética en este cultivo (Baudouin y Lebrun, 2002).

Para *Cocos nucifera* se ha desarrollado una metodología de microsatélites o SSR que requiere el uso específico de muestras de tejido de hoja (Baudouin y Lebrun, 2002). Sin embargo, el empleo de este tejido presenta dificultades como: el acceso a la copa, riesgo de accidentes, dificultad de encontrar una persona que realice la colecta, es costoso y se invierte mucho tiempo, por lo que dichos riesgos se reducirían al emplear el tejido de tronco para la obtención de ADN, por lo tanto en este capítulo se llevo a cabo la evaluación comparativa de tres protocolos los cuales fueron: Sílica, CTAB y el Kit de ChargeSwitch empleados para la extracción de ADN de hoja y tronco, con la finalidad de poder elegir el protocolo adecuado y eficiente para ambos tejidos de cocotero pero específicamente de tronco, el cual es de interés para este trabajo y para su uso posterior para análisis con microsatélites.

Los resultados obtenidos al visualizar los geles (figura 2.2) se observó bandas definidas de ADN con los extractos de hoja con Sílica (figura 2.2A), al contrario con los extractos de tronco en donde los resultados fueron negativos (figura 2.2B) se han realizado varias pruebas en laboratorio y los resultados que se obtienen son los mismos (resultados no mostrados). Con el protocolo de CTAB se visualizaron bandas de ADN para los extractos de tronco pero más tenues en comparación con hoja donde las bandas son más intensas. Sin embargo, al realizar una prueba preliminar con microsatélites con los extractos obtenidos de tronco se observó que no hay una buena intensidad de los picos al analizar los electroferogramas (resultados no mostrados), por lo que se decidió probar el Kit de ChargeSwitch® para conocer su eficiencia en ambos tejidos de cocotero; los resultados

obtenidos demostraron que si es posible obtener ADN con este Kit, una ventaja que nos ofrece este método con respecto a los otros dos protocolos empleados, es que permite extraer de forma rápida ADN más limpio y con menos cantidad de tejido (0.1 gr) (Manual de invitrogen, 2006).

Una vez seleccionado el protocolo adecuado para la extracción de tejido de tronco, el siguiente paso fue realizar la cuantificación de ADN (cuadro 2.3). Los resultados indicaron que el ADN es adecuado para realizar PCR. Sin embargo, es importante mencionar que las ventajas que ofrecen los microsatélites se deben, en parte, al empleo de amplificación por PCR con cebadores largos, específicos de cada *locus*, ya que el tejido que se utiliza no necesita ser de mucha calidad, e incluso ADN en estado avanzado de degradación es suficiente para ser analizado (Picó *et al.*, 2012). Por lo tanto los datos obtenidos en la cuantificación son importantes para conocer la concentración de ADN obtenido y poder adecuarla para los análisis con microsatélites.

En base a los resultados anteriores se realizó una prueba preliminar con microsatélites empleando muestras de hoja de la variedad Alto Oeste Africano (WAT por sus siglas en inglés) como control y cuatro muestras de tronco de la variedad Alto del Pacífico. En la prueba se observó una buena amplificación de las muestras con los iniciadores A3 y B12, por lo que se realizó la electroforesis capilar y posteriormente se analizaron los resultados con el programa GeneMarker (figura 2.4). Como resultado de esta prueba preliminar se logró observar en los electroferogramas fragmentos esperados para las cinco muestras de la variedad WAT (tejido de hoja) y para las muestras de tronco extraído con el Kit también se observaron fragmentos dentro del rango esperado en ambos iniciadores, a pesar de no conocer los tamaños de fragmentos esperados ya que fueron muestras desconocidas. Esta primera prueba demostró que el método de extracción es adecuado para el tejido de tronco y que podría ser útil para la caracterización genética con microsatélites.

Es por ello que se llevo a cabo los análisis con microsatélites con las muestras empleadas en este estudio WAT y EMA; es importante mencionar que estas variedades ya están caracterizadas y se emplean comúnmente como muestras estándares para determinar el tamaño del alelo, debido a que son las poblaciones más contrastantes morfológica y genéticamente (Baudouin y Lebrun 2002; Lebrun *et al.*, 2005). Para estos estudios se

emplearon muestras de hoja y tronco de ambas variedades, la hoja sirvió como control ya que en los estudios hasta ahora realizados emplean este tejido y en el presente trabajo se evalúa la posibilidad de emplear el tejido de tronco como fuente de ADN para llevar a cabo los análisis microsatelitales por lo que se esperaría el mismo resultado al emplear ambos tejidos. En los electroferogramas analizados (figura 2.6 a la 2.9) se observó que los mismos alelos se obtuvieron con el tejido de hoja y con el tejido de tronco. Ello indica que el tejido de tronco es útil para la caracterización genética con microsátélites. Estos resultados se confirmaron cuando se construyeron los dendogramas con los datos obtenidos de las muestras empleadas en este estudio y en ellos se pudo observar el agrupamiento de las mismas. Los resultados observados en la figura 2.10 muestran que al emplear tanto el tejido de hoja como de tronco de la variedad WAT formaron un mismo grupo sin diferir del tejido, de igual manera ocurrió con la variedad EMA tanto al emplear tejido de hoja como de tronco estos formaron un solo grupo, por lo cual no se observó diferencias en las muestras al emplear tejido de hoja y tronco. Estos resultados indican la posibilidad del uso del tejido de tronco de cocotero para la obtención de muestras de ADN para análisis con marcadores tipo microsátélites, esto ayudaría en la realización de la colecta de tejidos ya que actualmente para *Cocos nucifera* se cuenta con una metodología que emplea el uso de hoja (Baudouin y Lebrun, 2002) y como se ha mencionado anteriormente la colecta de hoja presenta ciertas desventajas. Por lo contrario el empleo del tejido de tronco presenta ventajas como: no hay que subir a la copa, sin riesgo de accidentes, la colecta es más fácil, es menos costoso y es rápido.

En el dendograma de la figura 2.11 se observó que las muestras se agruparon de acuerdo al tipo de costa al que pertenecen, Pacífico y Atlántico. En los individuos EMA de estudio como los de CIRAD son monomórficos e idénticos genéticamente. Sin embargo se encontraron alelos diferentes entre los dos grupos de EMA con los iniciadores A3, B12, C7, E12, F2, reportados por CIRAD (cuadro 2.6). Las diferencias van de 2 a 5 pares de bases. Estos resultados posiblemente se deban a los diferentes métodos de lectura que se emplearon, cabe mencionar que los datos obtenidos de CIRAD son realizados mediante geles de poliacrilamida y analizados visualmente, por el contrario la técnica de electroforesis capilar empleada en este estudio es más sensible y precisa en los valores dados, por lo que aporta resultados más confiables, que la enfocan más rápidamente en la línea de descubrimientos genéticos. El análisis genético comparando las variedades

WAT y EMA (tejido de tronco) con las cinco variedades de México mencionadas anteriormente, el dendograma que se obtuvo fue similar al realizado con tejido de hoja (figura 2.12).

De igual manera se realizó un análisis de costos (Anexos I) en el que se muestra los métodos de extracción empleados en este estudio para la obtención de ADN de hoja y tronco; los cuales fueron: Sílica, CTAB y el Kit de ChargeSwitch, también se observa un cuarto método para la extracción de tronco usando solamente agua y el empleo de las tarjetas FTA como un método adicional para la colecta, conservación y extracción de ADN. En el análisis podemos observar el costo de extracción de ADN por una muestra empleando los diferentes protocolos. Con el kit y con las tarjetas se obtuvo buenos resultados para la extracción de ADN de tronco el cual es de interés para este trabajo, aunque el kit es relativamente más costoso en comparación con Sílica y CTAB, es importante mencionar que estos dos últimos no dieron buenos resultados en la extracción de ADN de tronco para análisis con microsatélites. Con respecto al agua, es el protocolo más económico y que además se puede conseguir en cualquier lugar del mundo, pero por sí sola el agua no puede extraer el ADN solo sirve como medio para aplicar el tejido de tronco a la tarjeta FTA.

2.5 CONCLUSIONES

1. Con los tres métodos de extracción/purificación de ADN se obtuvieron buenos resultados para hoja, sin embargo el mejor método fue el kit de ChargeSwitch.
2. El Kit de ChargeSwitch fue el mejor de los métodos probados para la extracción de ADN de tronco para los ensayos con microsatélites.
3. Se logró estandarizar las condiciones de electroforesis capilar para realizar los estudios microsatelitales en cocotero.
4. Con los (nuevos) iniciadores WellRED (A3 y B12; C7 y H4) para análisis con microsatélites, se obtuvieron los mismos patrones de fragmentos para las muestras de hoja y tronco de individuos de la variedad WAT.
5. Se observó que al emplear el tejido de tronco como fuente de ADN para análisis con microsatélites se obtuvo el mismo resultado que al emplear tejido de hoja.
6. Al realizar un estudio comparativo de las variedades WAT y EMA con variedades reportadas (CIRAD) se pudo observar que ya sea usando tejido de hoja como tejido de tronco se obtienen las mismas relaciones genéticas.
7. Estos resultados muestran que el tejido de tronco es prometedor como fuente de ADN en lugar de hoja para análisis con microsatélites.

2.6 REFERENCIAS

- Baudouin, L. y Lebrun, P. (2002). The development of a microsatellite kit and dedicated software for use with coconuts. *Burotop*, 17, 16-20.
- Baudouin, L. y Lebrun, P. (2009). Coconut (*Cocos nucifera* L.) DNA studies support the hypothesis of an ancient Austronesian migration from Southeast Asia to America. *Genetic Resources and Crop Evolutions*, 56(2), 257-262.
- Baudouin, L., Piry, S. y Cornuet, J.M. (2004). Analytical bayesian approach for assigning individuals to populations. *Journal of Heredity*, 95(3), 217-224
- CONACOCO (2012) Consejo Nacional del Cocotero, http://conacoco.com.mx/comite/documentos/PROYECTO_PAF_2012.pdf (Acceso: 26/ Febrero/2013).
- Coto, O. y Cornide, M.T. (2002). Capítulo 4. Principales aplicaciones de los marcadores moleculares: En: *Marcadores moleculares. Nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas*. Ed. Felix Varela. ISBN 959-258-351-X, pp. 92-119.
- ChargeSwitch® gDNA Plant Kit. For purification of genomic DNA (gDNA) from plant samples. Catalog nos. CS18000 and CS18000-10. Version C. 13 Noviembre 2006. 25-0827. http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/chargeswitch_plant_man.pdf
- Doyle, J., y Doyle, J. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue *Focus*, 12: 13-15.
- Echevarría-Machado Ileana, Sánchez-Cach Lucila A., Hernández-Zepeda Cecilia, Rivera-Madrid Renata, y Moreno-Valenzuela* Oscar A. (2005). A Simple and Efficient Method for Isolation of DNA in High Mucilaginous Plant Tissues. *Molecular Biotechnology* Volume 31, Number 2, 129-135.

- Harrison N.A. y Oropeza C. (2008) Coconut lethal yellowing. In Characterization, Diagnosis and Management of Phytoplasmas, pp. 219–248. Eds N.A. Harrison, G.P. Rao and C. Marcone. Houston, TX, USA: Studium Press LLC.
- Howard F. y Barrant C. (1989). Question and answers about lethal yellowing disease. Principes, 33, 163-171.
- Lebrun P, Baudouin L, Seguin M, N'cho Y. P y Bourdeix R (1995) Étude de la diversité génétique du cocotier par RFLP. Oléagineux Corps Gras Lipides 2:418-421.
- Lebrun, P., N'cho, Y.P., Seguin, M., Grivet, L. and Baudouin, L. (1998). Genetic diversity in coconut (*Cocos nucifera* L.) revealed by restriction fragment length polymorphisms (RFLP) markers. Euphytica, 101(1), 103-108.
- Lebrun, P., Baudouin, L., Bourdeix, R., Konan, J.L., Barker, J.H., Aldam, C., Herrán, A. y Ritter, E. (2001). Construction of a linkage map of the Rennell Island Tall coconut type (*Cocos nucifera* L.) and QTL analysis for yield characters. Genome, 44(6), 962-970.
- Lebrun, P, A. Berger T. Hodgkin y L. Baudouin (2005). Biochemical and molecular methods for characterizing coconut diversity, in Coconut Genetic Resources, Batugal, P., R. Ramanatha and J. Oliver (eds) IPGRI, Serdang, Selangor DE, Malaysia, pp. 225-250.
- Meerow, A, R. Wisser, J. Brown, D. Kuhn, R. Schnell y T. K. Broschat (2003). Analysis of genetic diversity and population structure within Florida coconut (*Cocos nucifera* L.) germplasm using microsatellite DNA, with special emphasis on the Fiji Dwarf cultivar. Theoretical and applied genetics, 106(4), 715-726.
- Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 89(3), 583-590.

- Perera, L., Russell, J., Provan, J. y Powell, W. (2000). Use of microsatellite DNA markers to investigate the level of genetic diversity and population genetic structure of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Genome*, 43(1), 15-21.
- Perera, L., Ruseell, J., Provan, J. y Powell, W. (2001). Levels and distributions of genetic diversity of coconut (*Cocos nucifera* L., var. *Typica form typica*) from Sri Lanka assessed by microsatellite markers. *Euphytica*, 122(2), 381-389.
- Perera, L., Russell, J., Provan, J. y W. Powell (2003). Studying genetic relationships among coconut varieties/populations using microsatellite markers. *Euphytica* 132, 121-128.
- Perera, P., Perera, L., Hocher, V., Verdeil, J., Yakandawala, D. y Weerakoon, L. (2008). Use of SSR markers to determine the anther-derived homozygous lines in coconut. *Plant Cell Reports*, 27(11), 1697-1703.
- Picó, M.B y Esteras, C. (2012). Marcadores moleculares basados en PCR: Marcadores SSR o STR. <http://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/16743/SSR>. (Acceso: 6/Marzo/2013).
- Rajesh, M., Nagarajan, P., Jerard, B., Arunachalam V. y Dhanapal, R. (2008). Microsatellite variability of coconut accessions (*Cocos nucifera* L.) from Andaman and Nicobar Islands. *Current Science* 94(12), 1627-1631
- Roderick, D. y M. Page (1996). TreeView. Distributed by the author. Division of Enviromental and Evolutionary Biology, University of Glasgow, Scotland, UK. Nota: se utilizó la version 2001.
- Sambrook, D.J., Fritsch, E.F y Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

SIAP (2011). Servicio de Información Agropecuaria y Pesquera, http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=350 (Acceso: 26/Febrero/2013).

Sistema para análisis genético CEQ™ 8800. http://www.accesolab-sii.com/Descripciones/beckman/CEQ_8800.pdf. (Acceso: 4/Octubre/2012).

Yeh F. C. y Yang, R. (1999). POPGENE, version 1.31 Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis: quick user guide. Edmonton, Alberta, Canada: University of Alberta, Center for International Forestry Research.

Zizumbo-Villarreal, D. y Piñero, D. (1998). Pattern of morphological variation and diversity of *Cocos nucifera* (Aracaceae) in Mexico. *American Journal of Botany*, 85, 855-855.

Zizumbo-Villareal, D, Colunga-García Marín P, Fernández-Barrera, M, Torres- Hernández, N. y Oropeza C. (2008). Mortality of Mexican coconut germplasm due to lethal yellowing. *Plant Genetic Resources Newsletter*, FAO-Bioversity 156, 23-33.

CAPÍTULO III

EVALUACIÓN DEL USO DE TARJETAS FTA PARA LA CONSERVACIÓN DE MUESTRAS DE ADN DE TRONCO

3.1 INTRODUCCIÓN

El cocotero es un cultivo representativo de las zonas costeras tropicales (Harries, 1978; 2000). Los estudios realizados sugieren que es probable que la distribución original del cocotero abarcara la costa e islas del antiguo mar de Tethys, las islas Seychelles al oeste, las islas Línea (Palmira y Christmas) hacia el este, las islas de Indonesia en el sur y las islas Filipinas en el norte (Harries, 1978; 1990). Posiblemente la región biogeografía de Malesia (un área que incluye la Península Malaya, Indonesia, Filipinas y Nueva Guinea) fue donde los humanos comenzaron a seleccionar frutos para la obtención de agua, iniciando el proceso de domesticación (Harries, 1990).

Cuando se trata de regiones remotas como las que se mencionaron anteriormente y las cuales se encuentran en otros países y se requiere realizar una colecta de tejido o cuando la región para colectar se encuentra a algunos kilómetros de distancia del laboratorio se pueden presentar serias dificultades: no se cuenta con los equipos necesarios para mantener las muestras hasta su llegada al laboratorio y el transporte de tejidos de un país a otro implica aplicar medidas cuarentenarias y muchas veces dichas muestras se pierden al ser retenidas en las aduanas o en la cuarentena. También es importante mencionar que para la colecta de muestras de ADN de plantas, el aislamiento, purificación y almacenamiento son prerequisites para posteriores aplicaciones moleculares. Actualmente, la mayoría de los métodos convencionales para obtener ADN de planta requieren de nitrógeno líquido para la colecta de tejido fresco, trituración del material fresco y la liofilización del tejido. El transporte de las muestras de tejido fresco al laboratorio requiere de temperaturas frías para impedir la degradación del ADN. El aislamiento y purificación de ADN se realiza mediante diversos métodos, incluyendo kits comerciales de extracción de ADN, CTAB (Saghai-Marrof *et al.*, 1984), fenol/cloroformo, SDS (Dodecil sulfato de sodio) entre otros. Tras la extracción y purificación del ADN se

necesita almacenar en refrigeradores o congeladores de 4°C a -20°C. Además los equipos especializados, tales como centrifugas, liofilizadores, campana extractora de humos y de productos químicos peligrosos son obligatorios. Todos estos requisitos contribuyen en gran medida al gasto global que puede ser bastante limitante para llevar a cabo la extracción de una muestra en laboratorios en países en desarrollo. Mas importante aún, estos métodos se han convertido en un gran desafío al manejar un gran número de muestras, las cuales han de ser obtenidas en campo, que comúnmente se encuentra en una zona remota del laboratorio (Mbogori *et al.*, 2006).

Una alternativa para estos problemas podría ser el uso de tarjetas FTA® (Flinders Technology Associates) como un medio de colecta, transporte y conservación del ADN. Las tarjetas están diseñadas para la colección, almacenaje y posterior purificación del ADN de una manera fácil y rápida ya que los ácidos nucleicos capturados están listos para posteriores aplicaciones en menos de 30 minutos (Manual Whatman FTA® protocols, 2002).

En este capítulo se utilizaron las tarjetas FTA para el almacenamiento y extracción de ADN de tronco de cocotero para posteriores análisis con SSR, para esto fue importante llevar a cabo un protocolo bien establecido para un eficiente uso de las tarjetas. Hasta ahora en las pruebas realizadas se ha empleado la elución; pero cabe mencionar que el fabricante propone la utilización directa (sin eluir) de las tarjetas, sin embargo en el laboratorio de cocotero se ha utilizado la elución y los resultados han sido buenos (datos no publicados). Por lo que en este capítulo se evaluaron diferentes formas de aplicar el ADN de tronco en las tarjetas y se probaron diferentes tratamientos de elución, esto con la finalidad de obtener el mejor método para la conservación y extracción de ADN de tronco aplicado en tarjetas FTA.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Colecta del material

Las muestras a analizar de tejido de tronco se colectaron en plantaciones experimentales en Telchac Puerto y San Crisanto, Sinanché Yucatán, México. En la plantación Mira Mar en Telchac se muestrearon 5 palmas de la variedad Enano Malayo Amarillo (EMA) así como también en la plantación de Caridad de Cobre en San Crisanto se muestrearon 5 palmas de la variedad Alto Oeste Africano (WAT). En cada palma selecta se colectó aproximadamente un gramo de aserrín del tronco con la ayuda de un taladro, los tejidos son recibidos en una bolsa de polietileno evitando el contacto de estos con las manos. Por último se marcaron todas las muestras y se mantuvieron a baja temperatura en una nevera para evitar daños en el tejido.

3.2.2 Aplicación de ADN a tarjetas FTA

Se evaluaron tres diferentes métodos de aplicar el ADN de tronco en la tarjeta: (a) tejido presionado, (b) extracto en CTAB y (c) extracto en agua ultrapura. Para llevar a cabo estas pruebas se pesó 0.3 gr de tejido por triplicado para cada una de las pruebas.

- (a) Tejido presionado, una vez pesado el tejido se aplicó en tres cuadrantes de la tarjeta (0.3 gr en cada cuadrante) y se presionó para extraer la savia, luego se esperó a que seque la tarjeta y se prosiguió con el protocolo de extracción.
- (b) Extracto con CTAB, el tejido se puso en tubos de 2 ml con 900 μ l de buffer CTAB.
- (c) Extracto con agua ultrapura, similar al método anterior; el tejido se colocó en tubos de 2 ml con 900 μ l de agua ultrapura.

Para los incisos b y c los tubos se dejaron reposar una hora y a intervalos de tiempo se agitaron, después de este tiempo los extractos se aplicaron en una tarjeta; de cada tubo se tomaron primeramente 50 μ l y se aplicaron en la tarjeta de forma delicada para que la tarjeta lo absorba mejor y evitar que se disemine en otros cuadrantes de la misma y de esta manera poder aplicar más extracto, después se esperó a que seque bien y de nuevo se aplicó otro volumen de 50 μ l, se repitió la operación hasta obtener un volumen total de 150 μ l. Una vez aplicados los extractos y con las tarjetas ya secas, se tomaron dos discos de cada área de las diferentes pruebas y se prosiguió a realizar el protocolo de las tarjetas FTA. Posteriormente para saber si se obtuvo ADN se realizó PCR tiempo real de la elución obtenida de las tarjetas empleado la sonda 18s.

3.2.2.1 Protocolo de tarjetas FTA

Para la extracción de ADN se empleó el kit Whatman FTA[®] Plant Kit pk/ 1. Se prepararon tubos de PCR o de 500 μ l, claramente rotulados. Se colocó por debajo de las tarjetas la alfombrilla protectora (asegura cortes de muestra limpios y prolonga la vida de la punta de corte) y se procedió a la obtención del disco utilizando la perforadora Micro Harris[®] de 2 mm (recomendada para la perforación precisa de las tarjetas FTA sin contaminación cruzada cuando se utilizan los procedimientos recomendados), se tomó el disco de la parte central del perímetro que abarca la muestra (si se considera necesario se puede limpiar la perforadora con etanol al 70% entre cada muestra). Se agregó a los tubos que contiene los discos 200 μ l del Reactivo de Purificación FTA. Después invertir el tubo dos veces e incubar de 4-5 minutos a temperatura ambiente (para algunos casos el volumen de reactivo de purificación cambia según el número de discos a utilizar por ejemplo, el volumen que se utilizó de reactivo fue de 100 μ l para tubos con dos discos y para tubos con un disco, se utilizó 50 μ l). Pipetear el reactivo de purificación FTA de arriba a abajo dos veces. Para asegurarse de no perder ningún disco, con una pipeta se removió la mayor cantidad de reactivo y se eliminó. Se repitió este lavado. Posteriormente se agregó 200 μ l de buffer TE 0.1 (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 8) a cada tubo y se invierte dos veces y se incuba de 4-5 minutos a temperatura ambiente (de igual manera el volumen de buffer TE cambia según el número de discos a utilizar por ejemplo, el volumen que se

utilizó de buffer fue de 100 μ l para tubos con 2 discos y para tubos con un disco, se utilizó 50 μ l). Pipetear el buffer TE de arriba a abajo dos veces. Para asegurarse de no perder ningún disco, con una pipeta se removió la mayor cantidad del buffer y se eliminó. Se repitió este lavado. Después se dejó secar los discos aproximadamente una hora a temperatura ambiente o 20 minutos a 56°C y se eluyeron los discos ya que están completamente secos en 30 μ l de agua libre de nucleasas a 94°C por 5 minutos, por último se dejó unos minutos a temperatura ambiente, para luego llevar a cabo PCR tiempo real o convencional (transferir los discos cuidadosamente con unas pinzas limpias a tubos de PCR).

3.2.3 Cuantificación de ADN

El ADN obtenido de las tarjetas FTA, se cuantificó por el método de espectrofotometría empleando el equipo NANODROP 1000 (Thermo Scientific).

3.2.4 Amplificación por PCR

Se realizaron diluciones (1:20) del stock de ADN obtenido de las tarjetas FTA de las muestras de tronco de EMA y WAT. Para la reacción de PCR se utilizaron 8 pares de iniciadores microsatélites. Los iniciadores Forward (F) y Reverse (R) que se utilizaron, solamente los iniciadores F (forward) fueron marcados con dos fluoróforos (WellRED): D4 (azul) y D3 (verde). El volumen final de las amplificaciones fue de 25 μ l. La mezcla de reacción consistió de: 5 μ l buffer (5X), 1 μ l de Cloruro de Magnesio (50 mM), 0.5 μ l de la mezcla dNTP's (10 mM), 0.3 μ l Taq polimerasa (5 U/ml), 1 μ l del iniciador Forward D4 (2.5 μ M), 1 μ l del iniciador Reverse (10 pmol), 1 μ l del iniciador Forward D3 (2.5 μ M), 1 μ l del iniciador Reverse (10 pmol), 5 μ l de ADN genómico y el volumen necesario de agua estéril para alcanzar el volumen final.

La PCR realizada fue tipo multiplex, por lo que en cada reacción se pusieron dos juegos de iniciadores. Se eligieron iniciadores que amplificaran productos de tamaño diferente

para lograr una buena separación de los mismos al realizar la electroforesis capilar. Las condiciones de amplificación utilizadas fueron: 5 minutos de desnaturalización inicial a 94°C; 35 ciclos de: desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineamiento a 51°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto, con una extensión final a 72 °C por 30 minutos.

3.2.5 Electroforesis capilar

Previo a colocar las muestras en el secuenciador CEQ™ 8800, se realizó una mezcla de reacción la cual contiene por muestra: 25 µl de SLS (Sample Loading Solution-formamida) y 0.25 µl de DNA Size Standard Kit-400 (ROX), este último es importante darle un vortex aproximadamente durante un minuto para asegurar su total homogenización. Teniendo la mezcla preparada, se dosifica en una placa de 96 pozos (25.25 µl en cada pozo) por último se adicionó 4 µl del producto de PCR de las muestras y finalmente se colocó la placa en el secuenciador.

3.2.6 Obtención de datos

Una vez finalizada la corrida en el secuenciador, los datos crudos obtenidos como resultado de la detección de los fragmentos amplificados son importados al programa GeneMarker™ y se procedió a verificar visualmente los resultados arrojados en los electroferogramas. Por último se realizaron los análisis genéticos utilizando los datos moleculares obtenidos.

3.2.7 Cuantificación de ADN de discos eluidos

Como se menciono anteriormente se evaluaron tres diferentes métodos de aplicación de ADN de tronco en la tarjeta FTA y para saber la cantidad y calidad de ADN obtenido en cada prueba se llevo a cabo la cuantificación, para esto se emplearon dos discos de cada prueba eluidos en 30 µl de agua ultrapura, de los cuales se empleo 2 µl para llevar a cabo

la cuantificación. En base a los resultados se realizaron evaluaciones adicionales con el extracto con agua ultrapura aplicando un volumen de 800 μ l de extracto de tronco en las tarjetas, utilizando 0.33 gr de tejido / ml de agua ultrapura, también se aplicó un volumen de 1000 μ l utilizando 0.66 gr / ml de agua ultrapura. Para ambas pruebas se emplearon diferentes números de discos, para la primera dos discos y para la segunda diez discos por último se cuantificaron las muestras.

3.2.8 Pruebas preliminares con microsatélites empleando tarjetas FTA y el secuenciador ABI 310

Para esta prueba se emplearon 5 muestras de hoja de la variedad Alto Oeste Africano (WAT), el ADN se obtuvo con el protocolo de Silica. Se utilizó esta variedad como control debido a que ya está caracterizada y se conoce el tamaño de los fragmentos esperados, de igual manera permite saber si el protocolo que se está siguiendo es adecuado. También se emplearon cuatro muestras de tronco provenientes de San Crisanto, Sinanché, Yucatán con las siguientes claves GA-13, G4-171, G4-156 Y G2- 117 siendo estas de la variedad Alto del Pacífico, de las cuales se extrajo ADN con el kit Whatman FTA[®] Plant. Para esta prueba se utilizaron dos juegos de iniciadores A3 (FAM) y B12 (NED). Posteriormente los datos crudos obtenidos como resultado de la detección de los fragmentos amplificados en el secuenciador ABI 310 fueron importados al programa GeneMarker[™], para realizar la lectura de los electroferogramas y visualizar el tamaño de fragmentos obtenidos en cada una de las muestras.

3.2.9 PCR- tiempo real empleando discos y elución

Para esta prueba se pesó 1 gr de tejido (tronco) y se colocó en un tubo falcón añadiéndole 2.5 ml de agua ultrapura con 2.5 μ l de antioxidante y se dejó reposar 10 minutos. Después se colocaron 5 discos limpios en los tubos (cada disco en un tubo) y se añadió 100 μ l de extracto, se dejó reposar 5 minutos. Posteriormente se retiró el extracto y se dejó secar los discos a 56°C por 20 minutos, una vez secos los discos se realizaron

los lavados como lo indica el protocolo de las tarjetas FTA. Finalmente se eluyeron los discos en 30 μ l de agua ultrapura a 94°C por 5 minutos y se realizó PCR- tiempo real con la sonda 18s empleando los discos como la elución.

3.2.10 Evaluación comparativa de dos tratamientos de elución con PCR convencional y PCR tiempo real

Para llevar a cabo esta prueba primero se pesó 1.5 g de tejido (tronco) y se colocó en un tubo falcón, después se le agregó 3 ml de agua ultrapura con 3 μ l de antioxidante y se dejó reposar 10 minutos. Después, se pusieron nueve discos limpios en tubos, de tal manera que cada disco este en un tubo. Se añadió 60 μ l de extracto directo a cada tubo y se dejó reposar por 5 minutos, después se retiró el extracto y los discos se secaron a 56°C por 20 minutos. Una vez secos los discos se realizaron los lavados como lo indica el protocolo de las tarjetas FTA. Posteriormente seis discos se emplearon para probar los diferentes tratamientos de elución y los otros tres discos se utilizaron directo (sin eluir) para PCR convencional. Los tratamientos de elución fueron los siguientes:

Tratamiento I: 30 μ l de agua, a 95°C por 30 minutos, vortex y centrifugar.

Tratamiento II: 30 μ l de agua a 94°C por 5 minutos.

Después, *la elución* se empleó para realizar PCR tiempo real y PCR convencional, mientras que los *discos eluidos* y *discos directos* (sin eluir) se emplearon solamente para PCR convencional. En ambos tipos de PCR se utilizó la sonda 18s. En el caso de los *discos eluidos*, estos se sometieron a varios lavados con agua ultrapura para saber hasta cuantas veces se pueden reutilizar para PCR convencional. El método de lavado fue el siguiente: se agregó 100 μ l de agua ultrapura a cada disco, se les dio un vortex suave durante un minuto, posteriormente se retiró el agua y se eliminó. Este procedimiento se repitió hasta obtener un total de tres lavados de cada disco, esto con la finalidad de eliminar todos los residuos que hayan quedado de la mezcla de PCR anterior. Por último se corrieron gels para observar las bandas que se obtenían por cada lavado.

3.2.11 PCR tiempo real usando el equipo Rotor GeneQ

Para esta prueba se emplearon tarjetas a las que se había aplicado tejido de tronco de tres diferentes maneras: (a) tejido presionado, (b) extracto en CTAB y (c) extracto en agua ultrapura, esta prueba se realizó para observar si con el equipo Rotor GeneQ se obtendría amplificación al emplear los discos en la reacción de PCR. Este equipo tiene un diseño centrífugo rotatorio que lo hace ser el termociclador más preciso y versátil de PCR tiempo real disponible en la actualidad. Cada tubo gira en una cámara de aire en movimiento y cuando se alinea con la óptica de detección, la muestra se ilumina y la señal fluorescente es rápidamente obtenida de una sola vía. Esta uniformidad térmica y óptica se traduce en un sensible, preciso y rápido análisis en PCR tiempo real.

Primeramente se cortaron cuatro discos de cada tarjeta a los cuales se le dio lavados como lo indica el protocolo de las tarjetas FTA, posteriormente dos discos se eluyeron en 30 μ l de agua ultrapura a 94°C por 5 minutos, los otros dos discos se utilizaron directos (sin eluir) y por último se realizó PCR con el Rotor GeneQ, empleando la sonda 18s.

3.2.12 Análisis genéticos utilizando datos moleculares obtenidos de muestras de tejido de tronco aplicado en tarjetas FTA.

El tejido de tronco (extracto en agua ultrapura) de las muestras empleadas en este estudio: 5 muestras de la variedad Alto Oeste Africano (WAT) y 5 muestras de la variedad Enano Malayo Amarillo (EMA) fue aplicado a las tarjetas FTA. La extracción de ADN se llevo a cabo como lo indica el protocolo de las tarjetas. Se empleó la elución para realizar la electroforesis capilar. Posteriormente se llevaron a cabo los análisis genéticos con la ayuda del programa POPGENE 32 v1.32 (Yeh *et al.*, 1999) para generar los dendogramas y poder visualizar el agrupamiento de las muestras. Los resultados obtenidos empleando las tarjetas se compararon con las muestras WAT y EMA extraídas con el Kit de ChargeSwitch empleando tejido de tronco con fines comparativos.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Aplicación de ADN a tarjetas FTA

Se realizaron tres pruebas para saber la mejor forma de aplicar el tejido de tronco en la tarjeta: (a) tejido presionado, (b) extracto en CTAB y (c) extracto en agua ultrapura, después se realizó el protocolo de extracción de ADN para tarjetas FTA. Posteriormente para saber si se obtuvo ADN se realizó PCR tiempo real utilizando la sonda 18s.

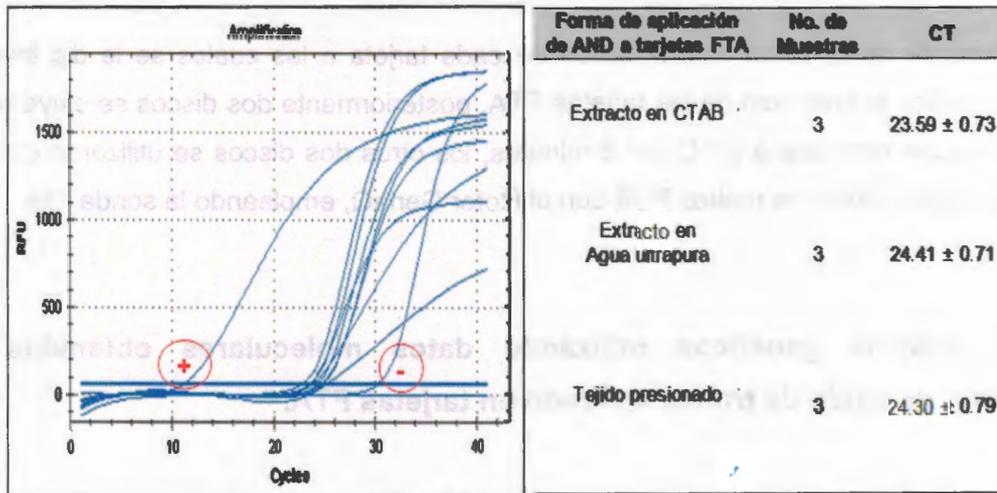


Figura 3.1 Cinética de la reacción de PCR tiempo real. Columna 1: forma de aplicación de ADN de tronco a tarjetas FTA. Columna 2: No. de muestras. Columna 3: CT y desviación estándar (+) Control positivo. (-) Control negativo.

En la figura 3.1 se muestra que con todas las pruebas se obtuvo amplificación y al comparar la desviación estándar de los CT obtenidos se puede ver que las diferencias no son mayores de uno.

3.3.2 Cuantificación de ADN de discos eluidos

En base a los resultados obtenidos se decidió cuantificar las muestras para saber la cantidad y calidad de ADN que se obtuvo, en el cuadro 3.1 se observan los resultados.

Cuadro 3.1 Promedio de la cuantificación de las eluciones obtenidas con los tres métodos de aplicación de extracto a tarjetas FTA. Cantidad de ADN (ng/μl). Absorbancias a 260/ 230 nm y 260/ 280 nm indican la pureza de ADN.

Parámetros	Extracto en CTAB	Extracto en agua ultrapura	Tejido presionado
ng/μl	83.3	11	16.8
260/230	0.49	0.13	0.17
260/280	1.15	0.50	0.66

Se observa claramente que la mayor cantidad de ADN se obtuvo con los extractos con CTAB y la menor con extractos con agua ultrapura; en cuanto a calidad ninguna de las muestras se encontraron dentro del rango esperado el cual es de 1.8 a 2.0 a 260/280 nm (Sambrook *et al.*, 1989). A pesar de los resultados obtenidos al emplear extracto con agua ultrapura se decidió realizar pruebas adicionales debido que se busca mejorar e implementar un protocolo de extracción de ADN más rápido, además que sea aplicable a condiciones de campo y con los procedimientos más sencillos.

Cuadro 3.2 Promedio de la cuantificación de ADN de las eluciones obtenidas con los dos tipos de pruebas. Columna 1: parámetros de medición. Columna 2: prueba con dos discos. Columna 3: prueba con 10 discos.

Parámetros	2 Discos (0.33 gr de tejido/ ml)	10 discos (0.66 gr de tejido/ ml)
ng/μl	15.6	93.7
260/230	0.16	0.21
260/280	0.69	0.68

La cantidad de ADN con dos discos fue de 15.6 ng/ μ l y al aumentar la cantidad de tejido, volumen aplicado en la tarjeta y mayor número de discos, la cantidad de ADN aumentó a 93.7 ng/ μ l. En cuanto a la calidad, las lecturas de absorbancia a 260/280 nm, no mostraron diferencias al emplear dos o diez discos.

3.3.3 Pruebas preliminares con microsatélites empleando tarjetas FTA y el secuenciador ABI 310

En base a los resultados anteriores se decidió realizar esta prueba empleando el extracto en agua ultrapura aplicado en la tarjeta FTA para saber si el ADN de tronco extraído es útil para realizar los estudios de microsatélites. Esta prueba se realizó con dos juegos de iniciadores A3 (FAM) y B12 (NED) con los cuales se llevo a cabo PCR de punto final, posteriormente los productos fueron fraccionados en un gel de agarosa para asegurar que haya amplificación y del tamaño esperado, por último el producto de PCR fue analizado por electroforesis capilar.

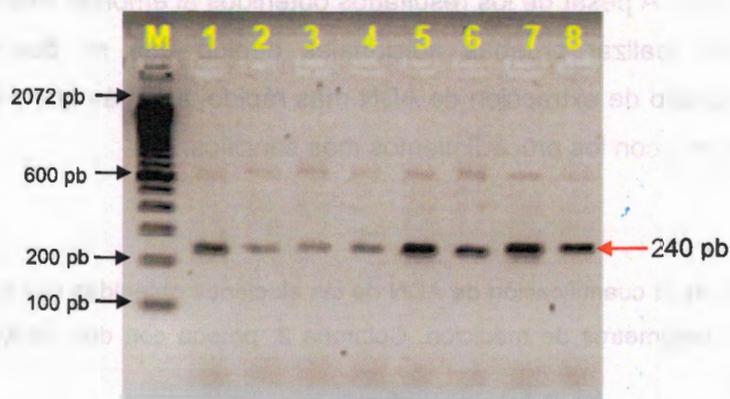


Figura 3.2 Electroforesis en gel de agarosa al 3% del producto de amplificación obtenido con el ADN extraído de la tarjeta FTA. M: marcador de 100pb (invitrogen). Carriles de 1 a 4: producto de PCR con 1 μ l de ADN. Carriles de 5 a 8: producto de PCR con 2 μ l de ADN.

Como se puede observar se logro obtener bandas del tamaño esperado. Las bandas observadas son de 240 pb tal y como se esperaba con el iniciador A3 (figura 3.2) de igual manera se decidió utilizar 2 μ l de ADN para realizar los análisis con microsatélites, ya que las bandas obtenidas al utilizar esta cantidad se visualizan con más intensidad en comparación con la de 1 μ l y de esta manera asegurar una buena amplificación de las muestras.

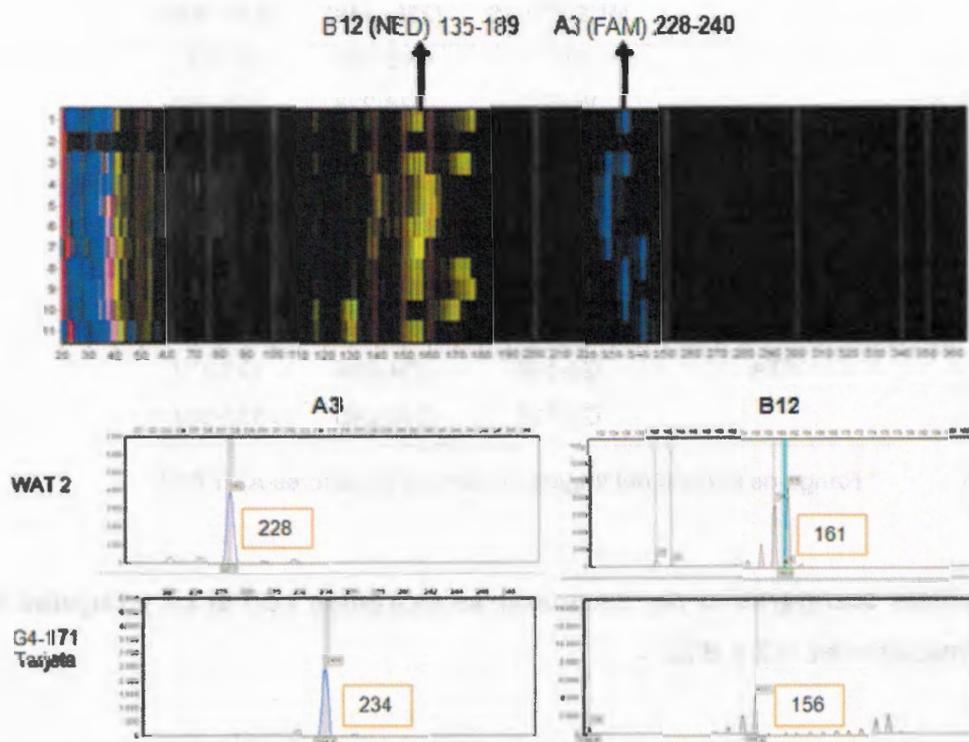


Figura 3.3 Imagen del gel obtenido con electroforesis capilar. Se muestran los fragmentos amplificados con los iniciadores A3 y B12 de dos muestras: WAT 2 y G4-171 (muestra obtenida con tarjetas).

Los resultados obtenidos con la electroforesis capilar (figura 3.3) indican que el ADN extraído de tronco empleando las tarjetas FTA es útil para realizar estudios de microsatélites ya que se observaron fragmentos de tamaño esperado con los iniciadores probados y con una buena intensidad en los picos. En el cuadro 3.3 se puede observar los alelos obtenidos para cada una de las muestras empleadas en esta prueba Es

importante mencionar que con los controles (ADN de hoja), también se obtuvieron fragmentos de tamaño esperado y con una buena intensidad en los picos, lo que indica que la técnica de electroforesis capilar está funcionando con las condiciones probadas.

Cuadro 3.3 Muestras y alelos obtenidos con los iniciadores A3 y B12

		A3	B12
	MUESTRAS	(228- 240)*	(135-189)*
CONTROLES	WAT 1	228-228	161-161
	WAT 2	228-228	161-161
	WAT 3	228-228	161-161
	WAT 4	228-228	161-161
	WAT 5	228-228	161-161
TARJETAS	G4-13	234-234	157-157
	G4-171	234-234	156-156
	FTA	G4-156	234-234
		G2-117	240-240

* Rango de tamaño del fragmento con los iniciadores A3 Y B12.

3.3.4 Análisis comparativo de las muestras extraídas con el kit y tarjetas FTA con los iniciadores A3 y B12

Los resultados obtenidos al realizar los estudios de microsatélites empleando muestras de tronco extraídas con el Kit y tarjetas FTA fueron positivos ya que se observó el mismo tamaño de fragmento para las muestras extraídas con el kit como con las tarjetas FTA. En la figura 3.4 se muestra con fines comparativos los electroferogramas obtenidos con la muestra G4-171. En el cuadro 3.4 se ilustran todos los alelos obtenidos de las muestras empleadas para esta prueba, los cuales están dentro del rango de tamaño de fragmento esperado con los iniciadores utilizados.



Figura 3.4. Imagen del gel obtenido con electroforesis capilar. Se muestran los fragmentos amplificados con los iniciadores A3 y B12 de tres muestras: WAT 2 y G4-171 extraído con el kit y G4-171 extraído con tarjetas FTA.

Cuadro 3.4 Alelos obtenidos con los iniciadores A3 y B12 de las muestras control y de las muestras obtenidas con el Kit de ChargeSwitch y tarjetas FTA.

		A3	B12
MUESTRAS		(228- 240) ^o	(135-189)*
CONTROLES	WAT 1	228-228	161-161
	WAT 2	228-228	161-161
	WAT 3	228-228	161-161
	WAT 4	228-228	161-161
	WAT 5	228-228	161-161
KIT	G4-13	234-234	157-157
	G4-171	234-234	156-156
	G4-156	234-240	171-171
TARJETAS	G2-117	240-240	157-157
	G4-13	234-234	157-157
	G4-171	234-234	156-156
FTA	G4-156	234-234	171-171
	G2-117	240-240	157-157

3.3.5 PCR- tiempo real empleando discos y elución

Esta prueba se realizó para saber si tanto en los discos como en la elución se obtiene ADN, ya que el fabricante propone la utilización directa de las tarjetas. Los resultados se presentan a continuación

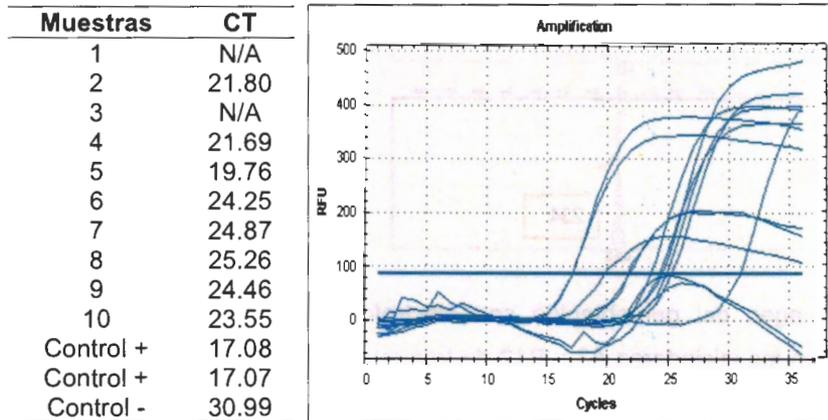


Figura 3.5 Valores de CT obtenidos y cinética de la reacción de PCR tiempo real. Muestras del 1 al 5: discos eluidos. Muestras de la 6 a la 10: elución. N/A: no amplifico.

Los valores de CT obtenidos al emplear los discos indican que se queda adherido ADN después de la elución. Pero observamos que al realizar PCR tiempo real empleando los discos algunas de las muestras no amplifican y esto podría ser debido a que la luz emitida por el equipo interfiere con los discos y no permite que se emita fluorescencia. Lo contrario sucede cuando se utiliza solamente la elución ya que no presenta ningún problema para su amplificación.

3.3.6 Evaluación comparativa de dos tratamientos de elución por PCR convencional y PCR tiempo real

Al observar que la elución obtenida de las tarjetas para llevar a cabo PCR tiempo real no presentó ningún problema, se realizó el siguiente análisis para determinar primeramente que tipo de tratamiento de elución es mejor para las tarjetas FTA, empleando PCR convencional y PCR tiempo real. De igual manera si el disco se puede reutilizar varias veces para PCR convencional.

A) Productos amplificados por PCR convencional con la sonda 18s.



Figura 3.6 Electroforesis empleando discos. M: Marcador de 1 Kb. Carril 1 al 3: disco directo (sin eluir). Carril 4 al 6: disco eluido (tratamiento I). Carril 7 al 9: disco eluido (tratamiento II). Control positivo (+). Control negativo (-).

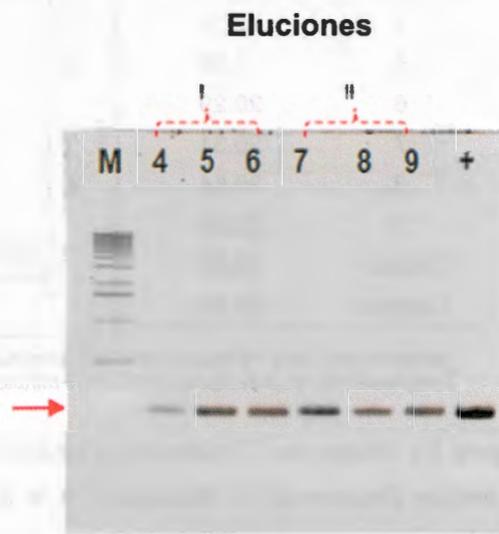
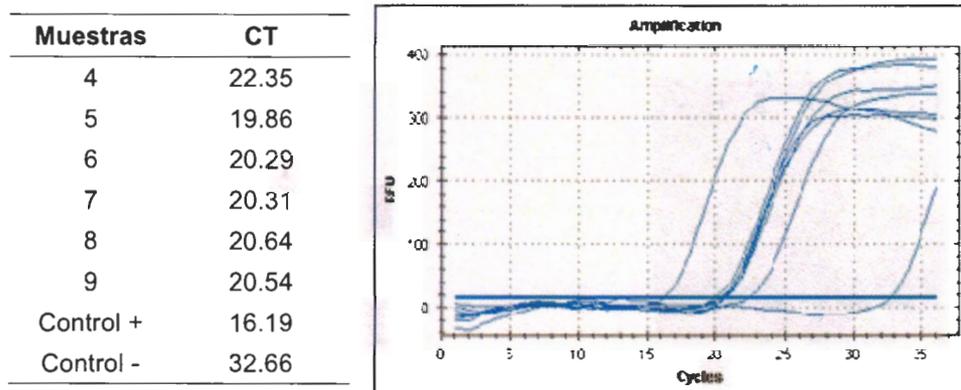


Figura 3.7 Electroforesis empleando eluciones. M: Marcador de 1 Kb. Carril 4 al 6: elución (tratamiento I). Carril 7 al 9: elución.

Se puede observar en los geles de agarosa (figura 3.6 y 3.7) que se obtuvo amplificación en todas las muestras. Al emplear los discos directos (sin eluir) como lo propone el fabricante así como para los dos tipos de eluciones (I y II) se observan bandas definidas utilizando los discos eluidos (muestras de la 4 al 9) como utilizando solamente las eluciones (figura 3.7).

B) PCR tiempo real

De igual manera se realizó PCR tiempo real solamente de las eluciones, empleando la sonda 18s, los valores de CT que se obtuvieron con los dos tratamientos de elución son similares, estos resultados indican que cualquiera de las dos eluciones se pueden utilizar para la obtención de ADN.



Tratamiento I: 30 μ l de agua, a 95°C por 30 minutos, vortex y centrifugar.
Tratamiento II: 30 μ l de agua a 94°C por 5 minutos.

Figura 3.8 Valores de CT obtenidos y cinética de la reacción de PCR tiempo real. Muestras 4 a la 6: elución (tratamiento I). Muestras 7 a la 9: elución (tratamiento II). Control positivo y control negativo.

C) Lavados de los discos

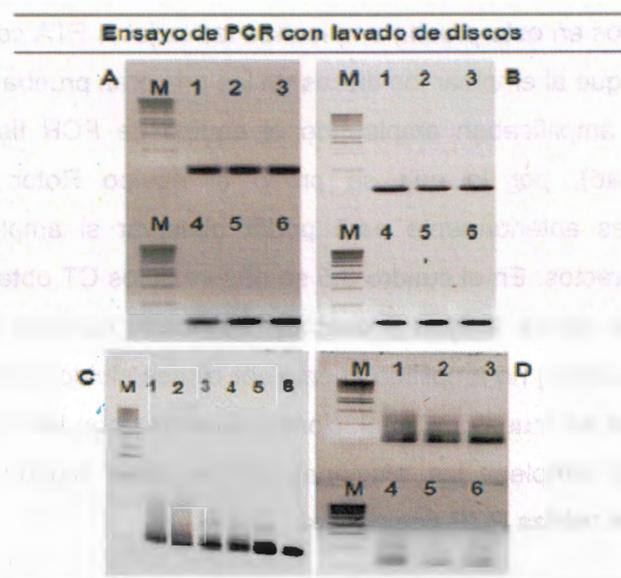


Figura 3.9 Imagen representativa de los productos amplificados de los discos lavados. A) Primer lavado. B) Segundo lavado. C) Tercer lavado. D) Cuarto lavado. Incisos A al D: M, marcador molecular de 1 kb; carril 1 al 3, discos eluidos (tratamiento I); carril 4 al 6, discos eluidos (tratamiento II).

Se pudo comprobar que los discos se pueden lavar y colocar para una nueva reacción de PCR, de igual manera con los dos tratamientos de elución se obtuvieron buenos resultados. En el primer y segundo lavado se observan bandas definidas, en el tercer lavado las muestras empezaron a mostrar un barrido y en el cuarto lavado las muestras ya estaban degradadas. Estos resultados indican que podemos utilizar los discos hasta para dos PCR a partir de la PCR original, lo que nos ahorraría tiempo y reactivos para lavar y eluir los discos por cada reacción de PCR y de esta manera se obtendrían los resultados en un corto tiempo.

3.3.7 PCR tiempo real usando el equipo Rotor GeneQ

Los resultados obtenidos en esta prueba empleando las tarjetas FTA con el Rotor GeneQ se realizaron debido a que al emplear los discos en las primeras pruebas observamos que algunas muestras no amplificaban empleando el equipo de PCR tiempo real (C1000 Thermal Cycler BioRad), por lo que se probó el equipo Rotor GeneQ por sus características descritas anteriormente para poder observar si amplificaban tanto los discos eluidos como directos. En el cuadro 3.5 se observan los CT obtenidos tanto de las eluciones como de los discos eluidos y directos, se puede apreciar que solamente la muestra 5 (tejido presionado) no amplificó al emplear discos eluidos y discos directos. En el cuadro 3.6 solamente se muestran las eluciones obtenidas con las diferentes muestras para confirmar que al emplear las eluciones no se tiene ningún problema en la amplificación cuando se realiza PCR tiempo real.

A) Análisis empleando la elución, discos eluidos y discos directos.

Cuadro 3.5 Valores de CT obtenidos de la reacción de PCR tiempo real con el Rotor GeneQ empleando la elución, discos eluidos y discos directos.

Forma de aplicación de ADN a tarjetas FTA	No. de muestras	Ciclo Umbral (CT)		
		Elución	Discos eluidos	Discos directos
Extracto en CTAB	1	24.73	19.72	32.46
	2	27.98	24.89	15.76
Extracto en agua ultrapura	3	22.16	22.47	15.11
	4	22.24	17.48	20.11
Tejido presionado	5	24.27	N/A	N/A
	6	23.94	12.92	10.97
Control +	7	11.44		
Control -	8	32.09		

B) Análisis empleando solamente la elución.

Cuadro 3.6 Valores de CT obtenidos de la reacción de PCR tiempo real con el Rotor GeneQ empleando la elución.

Forma de aplicación de ADN a tarjetas FTA	No. de muestras	Elución (CT)
Extracto en CTAB	1	24.73
	2	27.98
Extracto en agua ultrapura	3	22.16
	4	22.24
Tejido presionado	5	24.27
	6	23.94
Control +	7	11.44
Control -	8	32.09

3.3.8 Análisis genéticos utilizando datos moleculares obtenidos de muestras de tejido de tronco con tarjetas FTA y Kit de ChargeSwitch

Después de realizar diversas pruebas utilizando las tarjetas FTA y determinar que la elución obtenida de estas es la mejor para realizar el estudio de SSR se procedió a realizar los análisis correspondientes empleando tejido de tronco de 5 muestras de la variedad Alto Oeste Africano (WAT) y 5 muestras de la variedad Enano Malayo Amarillo (EMA) almacenadas en las tarjetas FTA. Posteriormente se llevaron a cabo los análisis genéticos con la ayuda del programa POPGENE 32 v1.32 para generar los dendogramas y poder visualizar el agrupamiento de las muestras. Con ello esperamos patrones de agrupamiento similares utilizando ADN de tronco extraído empleando las tarjetas FTA y el kit de ChargeSwitch.

En el cuadro 3.7 se puede observar los alelos obtenidos con 8 iniciadores para las muestras WAT y EMA empleando tejido de tronco extraído mediante dos protocolos diferentes (tarjetas FTA y el Kit de ChargeSwitch) con fines comparativos.

En base a los datos obtenidos se realizó un dendograma (figura 3.10) en el que se aprecia que tanto las muestras extraídas empleando tarjetas FTA y el Kit de ChargeSwitch dan el mismo resultado ya que forman dos grupos principales, uno

conformado por las muestras de la variedad WAT y otro por las muestras de la variedad EMA, sin embargo se observan diferencias entre los individuos y esto es debido a que se encontró valores diferentes para las muestras WAT en todos los iniciadores empleados, de manera similar que en las muestras EMA donde se encontraron valores diferentes en los iniciadores B12 y F2 al comparar los resultados obtenidos con las tarjetas y el Kit de ChargeSwitch (cuadro 3.7). Las diferencias van de 2 a 10 pares de bases, posiblemente debido a los diferentes protocolos empleados para la extracción de las muestras. De igual manera se observa que las muestras WAT2 y EMA4 extraídas con tarjetas FTA no se obtuvieron resultados con los iniciadores A3, H4 y F2.

Cuadro 3.7 Individuos y tamaño de alelos obtenidos con 8 iniciadores en dos poblaciones de cocotero (WAT y EMA) para ambas variedades se empleó el tejido de tronco extraído con tarjetas FTA y el Kit de ChargeSwitch.

Individuos	A3 (228-248)	B12 (135-189)	C7 (157-181)	H4 (218-236)	E12 (162-174)	F2 (191-215)	A9 (89-105)	E10 (226-246)
TRONCO FTA								
WAT 1	228-244	160-160	167-169	230-230	174-174	195-195	98-98	244-244
WAT 2		160-160	169-169		174-174	195-195	98-98	244-244
WAT 3	230-230	160-160	167-167	230-230	162-174	195-195	95-97	244-244
WAT 4	230-236	160-160	161-167	230-230	162-174	195-201	95-97	244-244
WAT 5	230-230	160-160	165-167	230-230	162-174	195-201	95-97	244-244
EMA 1	243-243	164-164	163-163	230-230	162-162	207-207	89-89	238-238
EMA 2	243-243	164-164	163-163	230-230	162-162	197-197	89-89	238-238
EMA 3	243-243	164-164	163-163	230-230	162-162	207-207	89-89	238-238
EMA 4	243-243	168-168	163-163	230-230	162-162		89-89	238-238
EMA 5	243-243	164-164	163-163	230-230	162-162	207-207	89-89	238-238
TRONCO KIT								
WAT 1	230-230	160-160	167-169	230-230	174-174	195-195	97-97	244-244
WAT 2	230-230	151-160	161-169	218-230	162-174	195-203	95-97	226-244
WAT 3	230-236	149-160	161-169	218-230	162-174	195-207	95-97	226-244
WAT 4	230-230	160-160	165-169	230-230	174-174	195-195	95-95	244-244
WAT 5	230-230	160-160	165-169	230-230	174-174	195-195	95-97	244-244
EMA 1	243-243	164-164	163-163	230-230	162-162	207-207	89-89	238-238
EMA 2	243-243	164-164	163-163	230-230	162-162	207-207	89-89	238-238
EMA 3	243-243	164-164	163-163	230-230	162-162	207-207	89-89	238-238
EMA 4	243-243	164-164	163-163	230-230	162-162	207-207	89-89	238-238
EMA 5	243-243	164-164	163-163	230-230	162-162	207-207	89-89	238-238

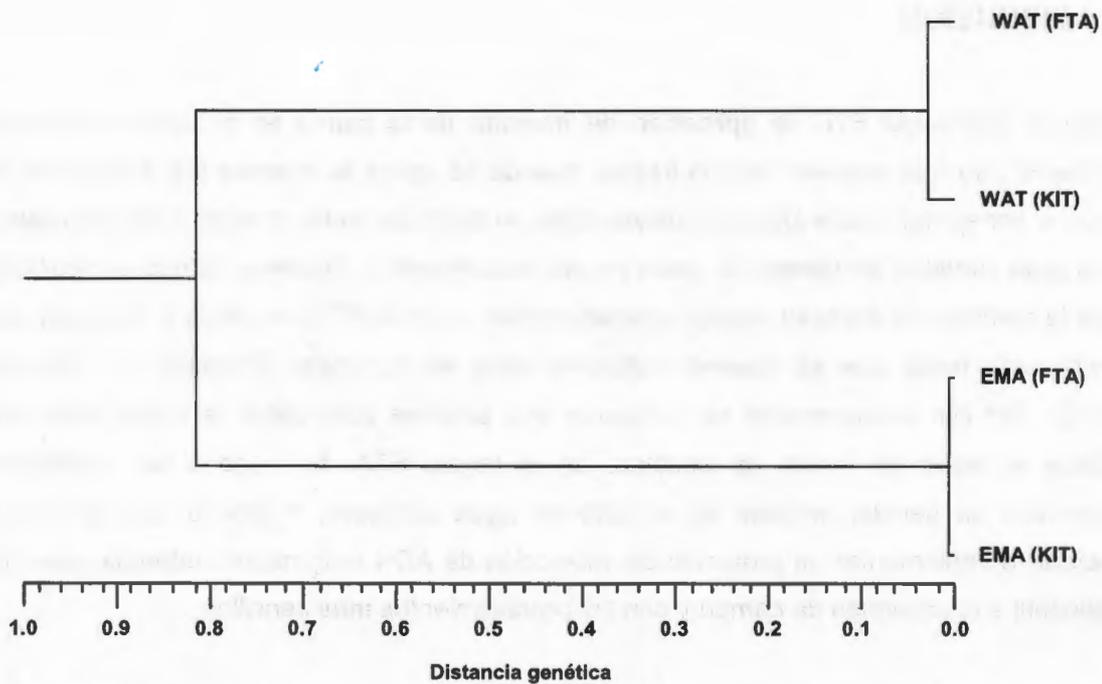


Figura 3.10 Dendrograma de análisis de poblaciones basado en las distancias genéticas de Nei et al., (1978) y el método de agrupamiento UPGMA en dos poblaciones de cocotero (WAT y EMA): se emplearon cinco muestras de la variedad Alto Oeste Africano (WAT) y cinco muestras de la variedad Enano Malayo Amarillo (EMA) para ambas variedades se usaron los tejidos de tronco extraídos con tarjetas FTA y con el Kit de ChargeSwitch con fines comparativos.

3.4 DISCUSIÓN

Para la tecnología FTA, la aplicación de muestra de la planta es el paso con mayor limitación, ya que requiere mucho trabajo cuando se aplica la muestra por presión en la tarjeta; por ejemplo para algunos cultivos como el maíz que tiene el tejido foliar muy duro, una gran cantidad de tiempo se gasta en una sola muestra. Trabajos anteriores reportan que la cantidad de material vegetal aplicado sobre la tarjeta FTA es crítico y tiene que ser presionado hasta que se observa suficiente savia en la tarjeta (Drescher y Graner, 2002). Por ello primeramente se realizaron tres pruebas para saber la mejor forma de aplicar el tejido de tronco de cocotero en la tarjeta FTA. En base a los resultados obtenidos se decidió emplear el extracto en agua ultrapura, debido a que se busca mejorar e implementar un protocolo de extracción de ADN más rápido, además que sea aplicable a condiciones de campo y con los procedimientos más sencillos.

Los resultados obtenidos en la cuantificación indicaban aparentemente que el ADN de las muestras no tenía la calidad y pureza para análisis con microsatélites, sin embargo se reporta que las ventajas que ofrecen los microsatélites se deben, en parte, al empleo de amplificación por PCR con cebadores largos, específicos de cada *locus*, ya que el tejido que se utiliza no necesita ser de mucha calidad, e incluso ADN en estado avanzado de degradación es suficiente para ser analizado (Picó *et al.*, 2012), por lo que se realizó una prueba preliminar con microsatélites, para esto se llevo a cabo una amplificación de las muestras con el iniciador A3 (figura 3.2), ya que el ADN obtenido de tarjetas FTA no es posible visualizarlo en geles de agarosa, en los artículos se reportan geles obtenidos de tarjetas pero realizando una amplificación previa (Manual Whatman FTA® Elute 2006; Burgos *et al.*, 2007) además se reporta que el material genético extraído se encuentra atrapado en el mismo soporte por lo que no pude ser revelado directamente mediante electroforesis en gel de agarosa; previamente debe ser amplificada la muestra por PCR (Zurita, 2006). Al llevar a cabo la electroforesis capilar y analizar los resultados con la ayuda del programa GeneMarker (figura 3.3) se pudo observar que se obtuvieron los mismos alelos tanto para las muestras extraídas con el Kit y con las tarjetas FTA (figura 3.4). Los resultados presentados hasta el momento nos permiten ver un potencial para el uso de las tarjetas FTA para la extracción de muestras de ADN obtenidas de tronco,

utilizando solo agua para la extracción y el ADN que se obtiene es adecuado para análisis con microsatélites.

Posteriormente se realizaron varias pruebas con las tarjetas para obtener el mejor método para llevar a cabo los análisis microsatelitales. En la prueba realizada con el equipo de PCR tiempo real empleando discos y elución (figura 3.5) se observó que al emplear los discos se tiene problemas en la amplificación, por el contrario al emplear la elución no se presento ningún problema. De igual manera al comparar dos diferentes tratamientos de elución los resultados no mostraron diferencias entre los tratamientos ya se empleando discos y elución. En los lavados realizados a los discos, los resultados indicaron que estos se pueden emplear hasta para dos PCR a partir de la PCR original, lo que nos ahorraría tiempo y reactivos para lavar y eluir los discos por cada reacción de PCR y de esta manera se obtendrían los resultados en un corto tiempo.

Hasta ahora en las pruebas realizadas se ha empleado la elución de ADN obtenido de las tarjetas FTA; pero cabe mencionar que el fabricante propone la utilización directa de las tarjetas (sin eluir) (Manual Whatman. FTA®, 2002) pero al utilizar discos en el equipo de PCR tiempo real (C1000 Thermal Cycler BioRad), se observó que algunas muestras no amplificaban por lo que se probó el equipo Rotor GeneQ por sus características descritas anteriormente, en el cual observamos que solamente una muestra no amplificó al emplear discos eluidos y directos, por otro lado la elución no presento ningún problema como se esperaba. Es importante mencionar que es una primera prueba que se realizó con este equipo por lo que se recomendaría realizar más pruebas para confirmar los resultados.

Al obtener el mejor método de aplicación del tejido de tronco de cocotero a la tarjeta FTA y la mejor elución para la extracción de ADN, se procedió a realizar un análisis genético con los datos obtenidos de la electroforesis capilar. En la figura 3.10 se pudo observar el agrupamiento de las muestras de la variedad WAT (Alto Oeste Africano) extraídas con tarjetas FTA y Kit de ChargeSwitch por lo que formaron un mismo grupo, lo mismo ocurrió para la variedad EMA (Enano Malayo Amarillo). En los resultados obtenidos se esperaba que no hubiera diferencias entre los individuos de cada variedad ya que se empleó el mismo tejido para ambos protocolos, sin embargo se obtuvieron valores diferentes entre los individuos con los iniciadores utilizados para la variedad WAT (cuadro 3.7) esto

posiblemente se debió a los diferentes métodos de extracción de ADN empleados para el tejido de tronco, ya que con las tarjetas, las muestras WAT2 y EMA 4 con los iniciadores A3, H4 y F2 no se obtuvieron resultados posiblemente por inhibidores que pudieran tener las muestras, cabe mencionar que estos son los primeros estudios que se realizan empleando extracto de tronco aplicado en tarjetas para análisis genéticos y con el cual se obtuvo buenos resultados con la mayoría de las muestras, lo que nos sugiere que el ADN de tronco de cocotero aplicado en la tarjeta FTA empleando solamente agua ultrapura para el extracto, puede ser prometedor para llevar a cabo la colecta de tejido en campo y su posterior extracción de ADN, además de que se obtuvo buenos resultados con los análisis genéticos con microsatélites al ser comparadas con muestras extraídas con el kit. De igual manera la conservación y transporte de muestras de un país a otro, es difícil debido a requisitos fitosanitarios los cuales a veces son difíciles de obtener. En cuanto a la conservación los viajes de colecta suelen ser largos y hacen difícil la conservación de las muestras, por lo que al emplear las tarjetas FTA estos problemas se reducirían, además se tendría la seguridad de que al llegar al laboratorio las muestras van a estar en buen estado para ser analizadas y obtener resultados confiables en diferentes estudios y más cuando se trata de análisis tan sensibles como los microsatélites. Los resultados obtenidos sugieren que las tarjetas FTA son adecuadas como medio para la colecta, transporte y conservación de ADN de cocotero.

3.5 CONCLUSIONES

1. Se utilizaron tres métodos de aplicación a las tarjetas FTA y en todos los casos las tarjetas pueden retener ADN extraído de tronco que puede ser eluido de ellas.
2. El ADN eluido se uso para análisis con microsatélites y de las tres formas de aplicación la que funcionó mejor fue el extracto en agua ultrapura, después en CTAB y por último el presionado.
4. Se pudo comprobar que los discos de las tarjetas FTA cargados con ADN se pueden reutilizar para varias reacciones de amplificación.
5. Con el Rotor GeneQ que utiliza un sistema de emisión de luz horizontal, no se tuvieron problemas de interferencia con los discos, por lo que resultó ser un equipo más confiable.
6. Se obtuvieron buenos resultados al emplear el ADN extraído del tejido de tronco con tarjetas FTA para los estudios genéticos con microsatélites, al ser comparados con los resultados obtenidos con el Kit de ChargeSwitch.
7. Estos resultados muestran que las tarjetas FTA son adecuadas como medio para la colecta, transporte y conservación de ADN de cocotero.

3.6 REFERENCIAS

- Burgos, W., Rosero, C., Cárdenas, H., Solarte, C. (2007). Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP's) a partir de muestras de sangre almacenadas en tarjetas FTA® para la especie *Cavia porcellus* Lin. (Rodentia: Caviidae). Rev Col Cienc Pec Vol. 20:1, 2007
- Drescher A. y Graner A (2002). PCR-genotyping of barley seedlings using DNA samples from tissue prints. Plant Breeding. 121:228-231.
- Harries, H. C (1978). The evolution, dissemination and classification of *Cocos nucifera* L. The Botanical Review, 44: 265-319.
- Harries H.C. (1990). Malesian origin a domestic *Cocos nucifera*, in The plant diversity of Malesia, Baas P., K. Kalkman and R. Geesink (eds), Kluwer, Dordrecht, pp 351-357.
- Harries, H. C. (2000). Coconut, in Treecrop Ecosystems, Last, F. T. (ed), pp. 321-338.
- Manual Whatman. FTA® protocols: collect transport, archive and access nucleic acids all at room temperature (2002); URL <http://www.cosmobio.com.ar/docs/fta%20protocols.pdf>
- Manual Whatman FTA® Elute protocols. Long-term DNA storage at room temperature combined with easy elution for multiple applications from a single sample (2006). [http://www.whatman.com/References/FTA%20Elute%20Data%20Sheet\(1\).pdf](http://www.whatman.com/References/FTA%20Elute%20Data%20Sheet(1).pdf)
- Mbogori, M.N. Kimani, M. Kuria, A. Lagat, M. Danson, J.W. (2006). Optimization of FTA technology for large scale plant DNA isolation for use in marker assisted selection. Biotechnology Centre, Kenya Agricultural Research Institute, Kenya.

- Picó, M.B y Esteras, C. (2012). Marcadores moleculares basados en PCR: Marcadores SSR o STR. <http://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/16743/SSR>.(Consultado: 6/Marzo/2013).
- Saghai-Marrof M. A., Soliman, K., Jorgensen, R.A., Allard, R.W. (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. PNAS 81:8014-8018.
- Sambrook, D.J., Fritsch, E.F y Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Yeh F. C. y Yang, R. (1999). POPGENE, version 1.31 Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis: quick user guide. Edmonton, Alberta, Canada: University of Alberta, Center for International Forestry Research.
- Zurita I.K (2006). Comparación de la eficacia de asilamiento de AND humano a partir de manchas de sangre recolectadas en papel filtro Whatman N°3, papel nucleico y papel FTA. Tesis de licenciatura. Universidad Mayor de San Andrés.



CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

4.1 DISCUSIÓN GENERAL

Los esfuerzos que en la actualidad se realizan para el estudio de la variabilidad genética demandan el empleo de efectivas y novedosas herramientas. Las técnicas de marcadores de ADN están siendo utilizadas para la identificación, caracterización y evaluación de la diversidad genética en los cultivos (Coto y Cornide, 2003). Las metodologías moleculares han revolucionado el análisis genético en el caso específico del cocotero. Las técnicas de RAPD (Ashburner *et al.*, 1997; Manimekalai y Nagarajan, 2006) y los RFLPs (Lebrun *et al.*, 1998; Teulat *et al.*, 2000) fueron aplicadas en cocotero mostrando ser adecuadas para la identificación de poblaciones próximas, comportamiento de híbridos y evaluación de la distancia genética entre sus países.

De igual manera para *Cocos nucifera* se han desarrollado marcadores microsatelitales (Rivera *et al.*, 1999; Baudouin y Lebrun, 2002) para estudios de diversidad, relaciones genéticas, estructura de poblaciones entre otras, por lo que han demostrado ser una herramienta muy poderosa debido principalmente a sus secuencias multialelicas y altamente polimórficas y a su capacidad de ser amplificadas por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)(Lebrun *et al.*, 1998; Baudouin y Lebrun, 2002; Meerow *et al.*, 2003; Lowe *et al.*, 2004; Perera *et al.*; 2000; 2001; 2003; Rajesh *et al.*, 2008). Tras la amplificación del fragmento que contiene el SSR, se procede a la separación y visualización de estos fragmentos. Existen diversas metodologías para la visualización y la interpretación de resultados, los más sofisticados son los secuenciadores automáticos basados en la electroforesis capilar. Este método se empleo para llevar a cabo este estudio.

Es importante mencionar que para el cocotero se utiliza una metodología de SSR que requiere el uso específico de muestras de tejido de hoja. Sin embargo, dado que algunas palmas pueden alcanzar alturas de hasta 30 m, en particular para ciertos ecotipos, se dificulta mucho la colecta de muestras. Por otro lado, estos estudios requieren de transportar muestras de un país a otro, una labor difícil debido a requerimientos fitosanitarios. Por lo que en el presente trabajo primeramente se evaluó la posibilidad del uso de la base de tronco de cocotero como fuente de tejido para la obtención de muestras de ADN para análisis con microsátélites. En los resultados obtenidos se observó el agrupamiento de las muestras, al emplear el tejido de hoja y tronco de la variedad WAT (Alto Oeste Africano) estos formaron un mismo grupo sin diferir del tejido, de igual manera esto ocurrió con la variedad EMA (Enano Malayo Amarillo) tanto al emplear tejido de hoja como de tronco estos formaron un solo grupo.

También se evaluó el uso de tarjetas FTA (Flinders Technology Associates) como medio de colecta, transporte y conservación de ADN de cocotero para su posterior uso en estudios con SSR. En los resultados se observó el agrupamiento de las muestras de la variedad WAT (Alto Oeste Africano) extraídas con tarjetas FTA y kit de ChargeSwitch, las cuales formaron un mismo grupo, lo mismo para la variedad EMA (Enano Malayo Amarillo). Lo que nos sugiere que el ADN de tronco de cocotero aplicado en la tarjeta FTA empleando solamente agua ultrapura para el extracto, puede ser prometedor para llevar a cabo la colecta de tejido en campo y su posterior extracción de ADN, además de que se obtuvo buenos resultados con los análisis con microsátélites al ser comparadas con muestras extraídas con el kit.

Los resultados del presente estudio muestran que el tejido de tronco de cocotero es una fuente adecuada de ADN para análisis con marcadores moleculares microsatelitales. Esto nos permite entonces aprovechar las ventajas de colectar muestras de tronco en comparación con hoja: (a) no hay que dedicar tiempo a buscar a alguien que acceda a la copa de la planta para tomar muestras de hojas; (b) no hay que pagar a alguien por realizar esta labor que puede costar 200 pesos por muestra (costo en Panamá), (c) no hay riesgo de accidentes, y (d) la colecta es mucho más rápida. Una dificultad que podría encontrarse al tomar muestras de tronco es que los dueños de las plantas no estuvieran de acuerdo en hacer perforaciones. Sin embargo, de acuerdo a la experiencia del grupo

de cocotero del CICY, al realizar la colecta de dicho tejido en palmas tanto enfermas como sanas en diferentes plantaciones, hasta el momento nunca se ha presentado ningún problema por parte de los dueños de las plantaciones.

Así que tanto desde el punto de vista de contar con ADN adecuado para los análisis con marcadores microsatelitales representa una alternativa útil con respecto al uso establecido de muestras de hoja. De igual manera los resultados muestran que el ADN de tronco de cocotero conservado y transportado en tarjetas FTA puede ser útil para estudios de marcadores moleculares así como para otras aplicaciones como la detección de patógenos por PCR. Esta metodología permite coleccionar, transportar y conservar ADN de cocotero de una manera más fácil, sin riesgos de accidentes, evitando problemas fitosanitarios en las aduanas y que además se tenga la seguridad de que al llegar al laboratorio las muestras estarán en perfectas condiciones para ser sujetas a análisis.

4.2 CONCLUSIONES GENERALES

1. Los tejidos de tronco de palmas pueden servir como fuente de ADN para la caracterización genética con microsatélites.
2. El costo y tiempo invertidos para la colecta de tejido de tronco resultan ser menores que para la colecta de tejido de hoja, por lo que es más conveniente desde el punto de vista práctico.
3. El ADN de tronco de palmas al ser conservado y transportado en tarjetas FTA puede ser útil para estudios de marcadores moleculares.

4.3 PERSPECTIVAS

En este trabajo se pudo comprobar que el tejido de tronco de cocotero puede servir como fuente de ADN para estudios con marcadores moleculares como los microsatélites empleando dos variedades ya caracterizadas (WAT y EMA) las cuales se emplean comúnmente como estándares para determinar el tamaño de alelos obtenidos, por lo tanto en estudios sucesivos se propone la posibilidad de evaluar un mayor número de muestras y de esta manera poder identificar individuos y poblaciones que puedan ser útiles en programas de mejoramiento genético.

El empleo de tarjetas FTA como medio para la conservación y transporte de ADN de tronco de cocotero permitirá una colecta más fácil, rápida y menos costosa útil para traer numerosas muestras de cualquier parte del mundo. Esto evitará limitaciones por restricciones fitosanitarias y el ADN obtenido será útil para análisis genéticos y de otros tipos como la detección por medio del ADN de patógenos como *Mindus crudus*, el cual es causante del amarillamiento letal.

4.4 REFERENCIAS

- Ashburner, G. R., Thompson, W. K., Dhalloron, G. M. (1997). RADP analysis of South Pacific coconut palm populations. *Crop Sci* 32: 992-997.
- Baudouin, L. y Lebrun, P. (2002). The development of a microsatellite kit and dedicated software for use with coconuts. *Burotop*, 17, 16-20.
- Coto, O. y Cornide, M., T. (2003). Principales aplicaciones de los marcadores moleculares. En: Félix Varela (ed.). *Marcadores moleculares. Nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas.* pp . 92-119.
- Lebrun, P.; N'Cho, Y. P.; Seguin, M.; Grivet, L.; Baudouin, L. (1998). Genetic diversity in coconut (*Cocos nucifera* L.) revealed by Restriction Length Polymorphism (RFLP) markers. *Euphytica* 101: 103-108.
- Lowe, A., Harris, S.; Ashton, P. (2004). *Ecological genetics; design, analysis, and application.* Blackwell Science. Victoria, Australia. 326 p.
- Manimekalai, K., Nagarajan, P. (2006). Assessing genetic relationships among coconut (*Cocos nucifera* L.) accessions using inter Simple Sequence Repeat markers. *Scientia Horticultura* 108: 49-54.
- Meerow, A, R. Wisser, J. Brown, D. Kuhn, R. Schnell y T. K. Broschat (2003). Analysis of genetic diversity and population structure within Florida coconut (*Cocos nucifera* L.) germplasm using microsatellite DNA, whit special emphasis on the Fiji Dwarf cultivar. *Theoretical and applied genetics*, 106(4), 715-726.
- Perera, L., Russell, J., Provan, J. y Powell, W. (2000). Use of microsatellite DNA markers to investigate the level of genetic diversity and population genetic structure of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Genome*, 43(1), 15-21.

- Perera, L., Ruseell, J., Provan, J. y Powell, W. (2001). Levels and distributions of genetic diversity of coconut (*Cocos nucifera* L., var. *Typica form typica*) from Sri Lanka assessed by microsatellite markers. *Euphytica*, 122(2), 381-389.
- Perera, L., Russell, J., Provan, J. y Powell, W. (2003). Studying genetic relationships among coconut varieties/populations using microsatellite markers. *Euphytica* 132, 121-128.
- Rajesh, M., Nagarajan, P., Jerard, B., Arunachalam V. y Dhanapal, R. (2008). Microsatellite variability of coconut accessions (*Cocos nucifera* L.) from Andaman and Nicobar Islands. *Current Science* 94(12), 1627-1631
- Rivera, R., Edwards, K., Barker, J.H., Arnold, G.M., Ayad, G., Hodgkin, T. y Karp, A. (1999). Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in *Cocos nucifera* L. *Genome*, 42, 668-675.
- Teulat, B.; Aldam, C.; Trehin, R.; Lebrun, P.; Barrer, J. H. A.; Arnod, G. M.; Karp, A.; Baudouin, L.; Rognon, F. (2000). An analysis of genetic diversity in coconut (*Cocos nucifera* L.) populations across the geographic range using Sequence-Tagged Microsatellites (SSRs) and AFLPs. *Theor Appl Genet* 100: 764-771.

ANEXOS I

Análisis de costos

Anexo I (1). Costos de extracción de ADN por una muestra

MÉTODOS DE EXTRACCIÓN			
SÍLICA		CTAB	
Reactivo	Precio	Reactivo	Precio
PVP (1 gr)	\$ 4.36	Buffer de extracción (5 ml)	\$ 1.77
Buffer de extracción (5 ml)	\$ 0.58	Fenol- cloroformo (1 ml)	\$ 8.14
SDS (100 µl)	\$ 0.14	Isopropanol (800 µl)	\$ 4.66
Acetato de Potasio (500 µl)	\$ 0.58	Acetato de sodio (100 µl)	\$ 0.04
Sílica (300 µl)	\$ 0.23	Etanol al 70 % (500 µl)	\$ 0.97
Etanol al 70 % (500 µl)	\$ 0.97	1 punta de 5000 µl	\$ 1.22
1 punta de 5000 µl	\$ 1.22	2 tubos de 2 ml	\$ 5.74
2 tubos de 2 ml	\$ 5.74	7 puntas de 1000 µl	\$ 2.87
4 puntas de 200 µl	\$ 1.20	2 tubos de 1.5 ml	\$ 0.54
3 puntas de 1000 µl	\$ 1.23	4 puntas de 200 µl	\$ 1.20
4 tubos de 1.5 ml	\$ 1.08	Agua ultrapura (50 µl)	\$ 0.30
Agua ultrapura (30 µl)	\$ 0.18		
TOTAL	\$ 17.51		\$ 27.45

MÉTODOS DE EXTRACCIÓN			
KIT CHARGESWITCH		AGUA	
Materiales	Precio	Materiales	Precio
Kit (una muestra)	\$ 51.85	Agua (3 ml)	\$ 0.02
2 tubos de 2 ml	\$ 5.74	1 tubo Falcon (10ml)	\$ 2.00
2 tubos de 500 µl	\$ 1.14	1 punta de 1000 µl	\$ 0.41
7 puntas de 1000 µl	\$ 2.87		
5 puntas de 200 µl	\$ 1.50		
1 punta de 10 µl	\$ 1.57		
TOTAL	\$ 64.67		\$ 2.43

CONSERVACIÓN EN TARJETAS FTA	
Materiales	Precio
Kit (una muestra)	\$ 36.6
1 tubo de 500 µl	\$ 0.57
5 puntas de 200 µl	\$ 1.50
TOTAL:	\$ 38.67

