



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**ESTABLECIMIENTO DE PROTOCOLOS PARA EL
INTERCAMBIO DE GERMOPLASMA DE
COCOTERO RESISTENTE A AMARILLAMIENTO
LETAL EN AMÉRICA LATINA Y EL CARIBE**

Tesis que presenta

ANALES OLINDA SKEETE

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

2018

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.
Posgrado en Ciencias Biológicas



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente hago constar que el trabajo de tesis de **Analesa Olinda Skeete** titulado **"Establecimiento de protocolos para el intercambio de germoplasma de cocotero resistente a amarillamiento letal en América Latina y el Caribe"** fue realizado en el Laboratorio de Cocotero de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección del Dr. Carlos Oropeza Salín, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Esta tesis tiene una orientación para el desarrollo socioeconómico de la región de América Latina y el Caribe.

Atentamente.

Dr. Manuel Martínez Estévez
Director de Docencia

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

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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

Firma: _____

Nombre: Analesa Olinda Skeete

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán y forma parte del proyecto titulado “ESTABLECIMIENTO DE PROTOCOLOS PARA EL INTERCAMBIO DE GERMOPLASMA DE COCOTERO RESISTENTE A AMARILLAMIENTO LETAL EN AMÉRICA LATINA Y EL CARIBE” en el que participé bajo la dirección del Dr. Carlos Oropeza Salín.

AGRADECIMIENTOS

Con sincera humildad expreso mi gratitud a todas aquellas personas que han contribuido de manera directa e indirectamente en la elaboración de este trabajo de investigación y mi formación profesional, especialmente:

Al Gobierno de Guyana, particularmente al Ministro de Agricultura Min. Noel Holder y al CEO del National Agricultural Research and Extension Institute Dr. Oudhu Homenauth, por darme la oportunidad de realizar mis estudios en México.

Al embajador de México Mr. Iván Robero Sierra Medel, a Anaeli Victorica Razo, Maciel Franco Rocío Magalí y a todos los personales de la embajada de México en Guyana, por su apoyo, sus palabras de motivación y su comunicación constante para ver mi seguimiento durante el transcurso de mis estudios. ¡Gracias Mr. Ivan Robero Sierra Medel and the Mexican Embassy!

A mi asesor Dr. Carlos Oropeza Salín, por recibirme como estudiante y brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio bajo su supervisión. Por su asesoría, consejos, paciencia y generosidad. ¡Thank you Dr. Oropeza!

Al IICA/ CONACYT, por la beca docente de posgrado en maestría otorgado (No. 774366) para la realización de mis estudios. ¡Thank you IICA/CONACYT!

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), por aceptarme en su institución y brindarme la oportunidad de formarme como Maestro en Ciencias. Agradezco mucho a los personales de posgrado del CICY por su atención eficiente y amable, especialmente a M.A. Liligelia García, Alejandra Arceo García, Landy Rodríguez, Nancy Sulub H. y Mauricio Alvarado Sosa por su apoyo en los trámites necesario durante mi estancia en CICY y los curso tomados. ¡Thank you all very much!

Al coordinador de la Unidad de Biotecnología Dr. Sergio R. Peraza Sánchez y a Rangel Gamboa Canché por todo su apoyo durante mi estancia en CICY, especialmente durante el proceso de titulación. ¡Thank you faculty of Biotechnology!

A los técnicos Dr. Germán Nic-Matos, Dra. María del Socorro Narváez Cab, Ing. José Luis Chan Rodríguez, M.Sc. Iván Isidro Córdova Lara y al Ing. Miguel A. Fernández Barrera, por sus apoyos técnicos, consejos y conocimiento impartidos tanto en el laboratorio como en campo durante mi estancia de maestría. ¡Thank you all for your patience and time!

A mi comité tutorial: Dr. Carlos Oropeza Salín, Dra. Daisy Pérez Brito, Dr. Luis Alfonso Sáenz Carbonell y Dr. Carlos Fredy Ortiz García, por sus observaciones, comentarios, sugerencias y apoyo durante mi formación académica, la elaboración y conclusión de este trabajo científico. ¡Special thank you to my tutorial committee!

Al Sr. Mauricio Barreto y sus trabajadores por el financiamiento del viaje a Colima y por facilitar la realización y conclusión del aspecto práctico en campo de este trabajo. ¡Thank you Mr. Barreto!

A todo el personal del Laboratorio de Micropropagación de Cocotero, Sharon Arodi Velázquez Collí, Guillermo Martínez Rodríguez, Abril del Socorro Chan May e Ing. José Luis Chan, por la provisión de los materiales necesarios para trabajar, junto con sus apoyos y consejos técnicos en el área de micropropagación. ¡Thank you Coconut Micropropagation Lab!

A mis profesores de Biotecnología I, Biotecnología II, Aplicaciones de Biotecnología, Modelación Espacial con SIG y Percepción Remota y Embriogénesis Somática, por impartir sus conocimientos conmigo y apoyarme durante estos dos años. ¡A special thank you to all my professors!

A mi comité de revisión de tesis Dr. Gabriel Lizama Uc, Dr. Carlos Oropeza Salín, Dra. Daisy Pérez Brito, Dr. Luis Alfonso Sáenz Carbonell y Dr. Carlos Fredy Ortiz García, por sus observaciones, comentarios y contribuciones para mejorar y finalizar mi trabajo de tesis. ¡Thank you revision committee!

A mis compañeros del Laboratorio de Cocotero muchas gracias por compartir sus experiencias, conocimientos, tiempo y paciencia conmigo especialmente al M.Sc. Rafael

Sánchez y M.Sc. Gustavo Solís Rivera por sus consejos y la ayuda en el laboratorio.
¡Thank you team coco!

Al CICY junto con el Laboratorio de Cocotero gracias por la donación de las plantas de cocotero a Guyana. Su apoyo fue enorme y formó parte del desarrollo y fortalecimiento de no sólo de mi trabajo de investigación sino también de mi país y de la relación que Guyana lleva con México. ¡Thank you CICY México!

A los personales del laboratorio de Biotechnology and Plant Genetic Resources at the National Agriculture Research and Extension, especialmente a M.Sc. Cleveland Paul and M.Sc. Samantha Brotherson, fue un gran placer trabajar con ustedes durante la aclimatación de las plantas. Su apoyo, tiempo y ayuda son muy apreciables. ¡Thank you team Biotech!

Al M.Sc. Marnus Cherry, por su enorme contribución durante mi formación, tanto académica como personal, sus consejos para el mejoramiento de mi trabajo científico y su apoyo durante mis momentos de desafíos. Gracias por estar siempre a mi lado y nunca darse por vencido en mí. ¡Thank you Mr. Cherry!

Finalmente, a mi preciosa familia y amistades en Guyana, Cuba, Angola, Dominica y Santa Lucia, especialmente a mi amado hijo Nathaniel Sedoc, a mi madre cariñosa Barbara Dey, a mis hermanos Keon Skeete, Melissa Skeete, Kwesi Skeete, Karen Dey y Colin Dey. A mis queridos amigos especiales Dr. Arnaldo Faustino, Jonnel Moore, Ing. Utica Alves, Lic. Jewel Nicole Ana Todd, Nelsy Cruz Delgado, Marcia Dean, M.Sc. Trevorne Douglas, Claudia Elisa Macías Carranco, Jorge Ek, Bio. Antonio Puch y M.Sc. Jorge Luis Espadas, un millón de gracias por todo lo que han hecho por mí, sus palabras de motivación en mis momentos desesperados y difíciles, su comunicación constante, sus comprensiones; su apoyo, amor y amistad son lo que en realidad me sostiene. Thank you all for always having confidence in me and supporting me throughout this journey. I owe it all to each and every one of you. You are my world. ¡I LOVE YOU ALL!

DEDICATORIAS

A Dios

Por proveerme la fuerza, sabiduría, fe y paciencia para llegar hasta este punto en mi vida, tanto académicamente como personalmente. Por brindarme salud para lograr mis objetivos, completar mis estudios y proporcionarme su infinito amor.

A mi querida madre Barbara Dey

Por su inmenso apoyo durante el transcurso de mi vida, especialmente por cuidar a mi hijo Nathaniel, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una mejor persona, mamá e investigadora pero más que nada, por su amor.
¡GRACIAS MAMA!

A mi precioso hijo Nathaniel Sedoc

Nathaniel siempre has sido mi fuente de sonrisas, motivación y mi más importante razón por concluir esta etapa de mi vida. ¡TE AMO MI AMOR!

ÍNDICE

LISTADO DE FIGURAS	VII
LISTADO DE CUADROS	IX
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	3
ANTECEDENTES	3
1.1 CULTIVO DE COCOTERO (<i>COCOS NUCIFERA L.</i>)	3
1.1.1 ORIGEN E IMPORTANCIA DEL COCOTERO EN EL MUNDO	3
1.1.2. USOS DE <i>COCOS NUCIFERA L.</i>	5
1.1.3 PRINCIPALES TIPOS DEL COCOTERO	6
1.2 PROPAGACIÓN DEL COCOTERO	11
1.2.1 PROPAGACIÓN POR SEMILLA.....	11
1.2.2 MICROPROPAGACIÓN POR EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA <i>IN VITRO</i> DE COCOTERO.....	12
1.3. TRANSMISIÓN/ELIMINACIÓN DEL FITOPLASMA DE ALC POR TÉCNICAS DE CULTIVO <i>IN VITRO</i>	17
1.3 PROBLEMÁTICA DEL COCOTERO	17
1.4.1 PLAGAS Y ENFERMEDADES DEL COCOTERO	18
1.4.2 AMARILLAMIENTO LETAL DEL COCOTERO (ALC)	18
1.4.3 AGENTE CAUSAL Y VECTOR.....	19
1.4.4 FITOPLASMAS.....	19

1.4.6 SINTOMATOLOGÍA.....	22
1.5 MÉTODO DE DETECCIÓN DE LOS FITOPLASMAS.....	23
1.6 CONTROL DEL AMARILLAMIENTO LETAL DEL COCOTERO	25
1.7 GERMOPLASMA RESISTENTE A AMARILLAMIENTO LETAL DEL COCOTERO	25
1.8 INDEXACIÓN	27
1.8.1 INDEXACIÓN EN EL CULTIVO DE COCOTERO	28
1.9 MOVIMIENTO DEL GERMOPLASMA DE COCOTERO.....	29
JUSTIFICACIÓN	30
HIPÓTESIS	30
OBJETIVO GENERAL	30
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	31
CAPÍTULO II	33
2.1 INTRODUCCION	33
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
2.2.1 IDENTIFICACIÓN DE FOCOS DEL ALC.....	35
2.2.2 COLECTA DE MUESTRAS EN EL CAMPO.....	35
2.2.3 COLECTA DE CALLOS EMBRIOGÉNICOS Y HOJAS DE PLANTAS <i>IN VITRO</i>	35
2.2.4 EXTRACCIÓN DEL ADN EMPLEANDO EL MÉTODO DE (CTAB)	36
2.2.5 AMPLIFICACIÓN DEL GEN 18S	36

2.2.6 DETECCIÓN POR PCR TIEMPO REAL	37
2.2.7 CURVA ESTÁNDAR PARA DETERMINAR EFICIENCIA DE LA SONDA LY16 POR PCR TIEMPO REAL	38
2.3 RESULTADOS	39
2.3.1 IDENTIFICACIÓN DE FOCOS DEL ALC.....	39
2.3.2 EXTRACCIÓN DEL ADN	39
2.3.3 AMPLIFICACIÓN DEL GEN 18S	39
2.3.4 CURVA ESTÁNDAR PARA DETERMINAR EFICIENCIA DE LA SONDA LY16 POR PCR TIEMPO REAL	40
2.3.5 INDEXACIÓN DEL FITOPLASMA DE ALC EN EL BANCO DE GERMOPLASMA DE COCOTERO <i>IN VITRO</i> Y CAMPO (“RANCHO LA CURVA”)	41
2.2 DISCUSIÓN	43
CAPÍTULO III	48
3.1 INTRODUCCIÓN	48
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	50
3.2.1 COLECTA DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS MOLECULAR	50
3.2.2 FORMACIÓN DE CALLOS EMBRIOGÉNICOS PARTIENDO DE UN EXPLANTE (INFLORESCENCIAS) POSITIVAS A ALC	51
3.2.3 EXTRACCIÓN DEL ADN EMPLEANDO EL MÉTODO DE (CTAB)	51
3.2.4 AMPLIFICACIÓN DEL GEN 18S EN LOS TEJIDOS DE CALLOS PROVENIENTES DE UN EXPLANTE POSITIVO A ALC.....	52
3.2.5 DETECCIÓN POR PCR TIEMPO REAL	52

3.2.6 APLICACIÓN DE ANTIBIÓTICO	52
3.3 RESULTDOS.....	53
3.3.1 COLECTA DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS MOLECULAR	53
3.3.2 AMPLIFICACIÓN DEL GEN 18S EN LOS TEJIDOS DE CALLOS PROVENIENTES DE UN EXPLANTE POSITIVO A ALC.....	53
3.3.3 CARACTERÍSTICAS DE LOS CALLOS OBTENIDO A PARTIR DE UN EXPLANTE POSITIVO A ALC	54
3.3.4. DETECCIÓN DEL FITOPLASMA DE ALC EN LAS DIFERENTES ESTRUCTURAS OBTENIDO A PARTIR DE UN EXPLANTE POSITIVO A ALC	56
3.4 DISCUSIÓN	57
CAPÍTULO IV	59
4.1 INTRODUCCION	59
4.2 MATERIALES Y METODOS	60
4.2.1 EVALUACIÓN DE CONDICIONES DE ENVÍO.....	60
4.2.2 PROCESO DE ENVÍO	60
4.2.3 ACLIMATACIÓN DE LOS COCOTEROS MICROPROPAGADOS.....	61
4.2.4 PARÁMETROS EVALUADOS DURANTE EL PROCESO DE ENVÍO Y ACLIMATACIÓN.....	64
4.3 RESULTADOS	65
4.3.1 EVALUACIÓN DE CONDICIONES DE ENVÍO.....	65
4.3.2 ACLIMATACIÓN DE LOS COCOTEROS MICROPROPAGADOS EN CICY	65
4.3.3. SOBREVIVENCIA DE LAS PLÁNTULAS DE COCOTERO DURANTE EL PROCESO DE ACLIMATACIÓN EN CICY	65

CASO DE GUYANA	67
4.3.4 PLÁNTULAS DE COCOTERO SOBREVIVIENTES DURANTE EL PROCESO DE ACLIMATACIÓN EN GUYANA	69
4.4 DISCUSION	72
CAPÍTULO V	74
5.1 DISCUSIÓN GENERAL	74
5.2 CONCLUSIONES GENERALES	77
5.3 PERSPECTIVAS	78

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1. Principales productores de cocotero en el mundo.	4
Figura 1.2. Características del cocotero variedad Alto del Atlántico. (Ramkhelawan <i>et al.</i> , 2016).	7
Figura 1.3. Variedades de enanos malayos de cocotero popular en el Caribe (Créditos de la foto: Pinterest.com, 2016, Vendio Services, 2016). Tomado del Reporte técnico de Ramkhelawan <i>et al.</i> , 2016.....	8
Figura 1.4. Variedades híbridas de cocotero (Créditos fotográficos: TNAU, 2012; Widayat, 2014).	10
Figura 1.5. Variedad híbrida mexicana “Donaji”. Ríos, 2011.....	11
Figura 1.6. Proceso de micropropagación por embriogénesis somática en el cultivo de cocotero usando plúmulas como explante.	14
Figura 1.7. Proceso de regeneración de plántulas de cocotero mediante embriogénesis somática (Chan <i>et al.</i> , 1998).	15
Figura 1.8. Cambios morfológicos que ocurren durante el desarrollo del callo embriogénico inducido por estructuras embriogénicas utilizadas como explantes (Sandoval-Cancino <i>et al.</i> , 2016).....	16
Figura 1.9. Figura 1.10 Plantaciones de cocotero afectados por ALC en (A) Jamaica y (B) México.	19
Figura 1.10. Fitoplasma de ALC. A. Micrografía electrónica (ME) de un OTM en una sección longitudinal de un tubo criboso de una palma de cocotero. Las flechas señalan las membranas unitarias típicas de los OTM. Línea = 0.1 μ m. B. ME de una célula floemática (SE) de una hoja basal joven de una palma infectada por fitoplasmas (flechas). CW: pared celular. Línea: 2.0 μ m (Mc Coy <i>et al.</i> , 1983).....	20
Figura 1. 11. <i>Haplaxius crudus</i> , vector de transmisión del ALC.....	21

Figura 1.12. Sintomatología de ALC en cocotero. A. Palmas sin frutos muestran amarillamiento en el follaje. B. Palmas con frutos presentan caída de nueces. C y D. Necrosis de inflorescencia. E. Amarillamiento de follaje empieza en las hojas más viejas y continua hacia las jóvenes F (Zizumbo-Villarreal <i>et al.</i> 2008).....	22
Figura 1.13. Mortalidad de los ecotipos del banco de germoplasma mexicano.	27
Figura 2.1. Curva estándar. A) Curva estándar de amplificación. Esta imagen muestra la amplificación de una serie de diluciones para determinar la eficiencia de la sonda LY. La curva se produce al graficar el promedio de los Cts obtenidos de cada uno de los triplicados. B) Se observa el valor de $R^2:0.99$, con una eficiencia de E: 102.	40
Figura 3.1. Inflorescencias de la palma de cocotero G-8-3 tratada con antibiótico.	50
Figura 3.2. Características de los callos obtenidos del explante positivo a ALC durante la embriogénesis somática en cocotero A Callo necrótico B Callo esponjoso, C callos con estructuras embriogénicas obtenidos en el segundo ciclo D Callos con estructuras embriogénicas obtenidos en el tercer ciclo.	54
Figura 4.1. Proceso de empaque de las plántulas de cocotero micropropagada para su envío.	61
Figura 4.2. Plántula de cocotero en aclimatación.	62
Figura 4. 3. Condensación en las bolsas transparente durante el proceso de aclimatación. A y B tratamientos de cero y siete días, y D tratamiento de treinta días.	66
Figura 4.4. Plántulas de cocotero sobrevivientes al momento de remover las bolsas transparentes a los quince días con respecto a su diferente tiempo en el medio de transporte.	69

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1. Composición de alimentos de cocotero fresco (Morerias <i>et al.</i> , 2013).	5
Cuadro 1.2. Recomendaciones generales para el movimiento de germoplasma de cocotero.....	28
Cuadro 2.1. Amplificación del gen 18s en las muestras de ADN de los callos embriogénicos y hojas de plántulas de cocotero micropropagados extraído por el método de CTAB.	40
Cuadro 2.2. Indexación del fitoplasma de ALC en las muestras de cocotero proveniente del cultivo <i>in vitro</i>	41
Cuadro 2.3. Indexación del fitoplasma de ALC en las muestras de cocotero proveniente del rancho “LA CURVA”.....	42
Cuadro 3.1. Detección de fitoplasmas de ALC en inflorescencias de la palma G-8-3 tratado con antibiótico.....	53
Cuadro 3.2. Amplificación del gen 18s en los tejidos de callos provenientes de un explante positivo a ALC en los tres ciclos.	54
Cuadro 3.3. Formación de callo embriogénico a partir de una inflorescencia proveniente de una palma enferma.	55
Cuadro 3.4. Detección del fitoplasma de ALC en las diferentes estructuras obtenido durante el proceso de embriogénesis somática proveniente una inflorescencia positiva a ALC.	56
Cuadro 4.1. Tabla comparativa de los componentes utilizados para preparar el sustrato y su disponibilidad en Guyana.	63
Cuadro 4.2. Plántulas de cocotero sobrevivientes con respecto a sus diferentes tratamientos hasta la fecha.	67
Cuadro 4.3. Resumen de los problemas enfrentados con respecto del recibo de las	

plántulas de cocotero micropropagadas y cómo resolver dichos problemas. 68

Cuadro 4.4. Plántulas de cocotero sobrevivientes con respecto a las diferentes variedades recibido y aclimatado en Guyana..... 70

Cuadro 4.5. Porcentaje de plántulas de cocotero micropropagados sobrevivientes en diferentes países con respecto al época de envió..... 71

ABREVIATURAS

2,4-D	2,4- Ácido diclorofenoxiacético
ADN	Acido Desoxirribonucleico
ALC	Amarillamiento Letal del Cocotero
BAP	6-Benciladenina
CARICOM	La Comunidad del Caribe
CE	Callos embriogénicos
CICY	Centro de Investigación Científica de Yucatán
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio
ES	Embriogénesis Somáticas
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FAOSTAT	Estadística de Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
ia	Ingrediente activo
MVT	Alto de Markham Valley
MXPT	Alto pacífico mexicano
MYD	Enano malayo amarillo
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SENASICA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SNICS	Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas
VTT	Alto de Vanuatu

RESUMEN

El cocotero (*Cocos nucifera* L.) es una planta perenne de importancia económica debido a su contribución sustancial a la seguridad alimentaria. Sin embargo, a pesar de su potencial económico, existen diversos factores que limitan su producción, entre ellos, la enfermedad del amarillamiento letal de cocotero (ALC). El ALC es una enfermedad devastadora que ha erradicado millones de cocoteros en América Latina y el Caribe, donde la única manera para controlar esta enfermedad incurable es mediante la replantación con materiales resistentes. Se planteó como objetivo de este trabajo de investigación establecer protocolos para el intercambio seguro de germoplasma de cocotero para el movimiento de material libre de fitoplasma del ALC en América Latina y el Caribe. Los resultados obtenidos revelaron que las plántulas de cocotero producidas y analizadas están libres de fitoplasma de ALC, lo que indica que el método de indización utilizado para la detección del fitoplasma de ALC es reproducible. Al mismo tiempo, los resultados preliminares demuestran la ausencia de fitoplasma de ALC en callos embriogénicos obtenidos de explantes de inflorescencia positivos a ALC, lo que podría indicar que el fitoplasma no es transmisible por micropropagación. Los ensayos del protocolo de aclimatación y transporte nos permitieron estimar que el tiempo máximo en el cual las plantas pueden permanecer en el medio de transporte es de 7-21 días con 80-100% de supervivencia, reduciéndose a 33% después de 30 días.

ABSTRACT

The coconut palm (*Cocos nucifera* L.) is a perennial plant of economic importance due to its substantial contribution to food security. However, despite its economic potential, there are several factors that limit its production, among them, the coconut lethal yellowing (LY) disease. LY is a devastating disease that has eradicated millions of coconut trees in Latin America and the Caribbean, where the only way to control this incurable disease is through replanting with resistant materials. The objective of this research work is to establish protocols for the safe exchange and movement of coconut germplasm material free of LY phytoplasma in Latin America and the Caribbean. The results obtained revealed that the coconut seedlings produced and analyzed are free of LY phytoplasma, which indicates that the indexing method used for the detection of the LY phytoplasma is reproducible. At the same time, preliminary results demonstrate the absence of LY phytoplasma in embryogenic calluses obtained from positive inflorescence explants, which could indicate that the phytoplasma is not transmissible by micropropagation. The trials of the acclimation and transport protocol allowed us to estimate that the maximum time in which plants can remain in the means of transport is 7-21 days with 80-100% survival, reducing to 33% after 30 days.

INTRODUCCIÓN

El cocotero (*Coco nucifera* L.) es una de las plantas de mayor interés comercial cultivada en más de 80 países del mundo. Es un cultivo perenne muy importante por su contribución sustancial en la seguridad alimentaria, a una mejor nutrición, fuente de ingresos y generación de empleos. (Kumar *et al.*, 2010; Oropeza *et al.*, 2010).

El mercado mundial de cocotero está liderado por los países asiáticos. Los principales productores de cocotero en el mundo son Indonesia, Filipinas, India, Brasil y Sri Lanka (FAOSTAT, 2016). México ocupa el octavo lugar a nivel mundial en la producción de cocotero. En los años 70s existían aproximadamente 207,000 has de cocotero en la región tropical, siendo la copra la actividad primaria de más de 50 000 familias. Los principales estados productores de cocotero en México son; Campeche, Colima, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Oaxaca, Tabasco, Nayarit, Sinaloa, Veracruz y Yucatán. (SAGARPA, 2016).

En América Latina y el Caribe, la palma de cocotero desempeña un papel multifuncional. A nivel de la pequeña agricultura. A nivel industrial, los productos de valor agregado del cocotero son fuentes importantes de empleo e ingresos en las comunidades rurales. Más allá de la costa, la palma de cocotero es muy popular en el Caribe como parte del paisaje y embellecimiento del hogar (Singh *et al.*, 2007). Los principales países productores de cocotero en el caribe son Jamaica y República Dominicana.

A pesar del creciente potencial económico del cocotero y su demanda actual, existen limitaciones importantes para su producción sustentable como plagas, enfermedades, erosión genética y situaciones adversas como huracanes y sequías (Batugal, 1999). Las enfermedades como el amarillamiento letal del Cocotero (ALC) en América (Harrison y Oropeza, 2008) y África (Eden-Green, 1997) y cadang-cadang en las Filipinas (Hanold y Randles, 1991) son un reto significativo para el incremento en el nivel de producción en la mayoría de los países productores de cocotero.

La principal estrategia empleada para conservar y proteger al cultivo de cocotero contra ALC, es mediante la replantación de variedades resistentes. Hasta la fecha, en México se han identificado los Enanos Malayos (amarillo, rojo y verde), los 'Altos del Pacifico', Altos de Panamá en Jamaica y Altos del Pacifico mexicano (Been *et al.*, 1980; Zizumbo *et al.*, 2008) como ecotipos resistentes al ALC. Además, existen cultivares híbridos registrados ante el Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS) en México

como el Chactemal (Michoacán), Ordaz (Colima), Xcaret (Nexpa), Cancún (San Luis-San Pedro) y Donaji (Oaxaca), producto del cruzamiento entre el Malayo Enano Amarillo y los Criollos Altos del Pacífico. Estos híbridos poseen características deseables de resistencia al amarillamiento letal, precocidad, y alta producción de copra y agua (Ríos, 2013). El aumento en las capacidades de producción es difícil de satisfacer, ya que depende mayormente de la propagación a través de semillas con la desventaja de ser un proceso lento. Por lo tanto, es necesario considerarse medios alternativos de propagación, como la propagación *in vitro* o la micropropagación por embriogénesis somática (Solís-Ramos *et al.*, 2012).

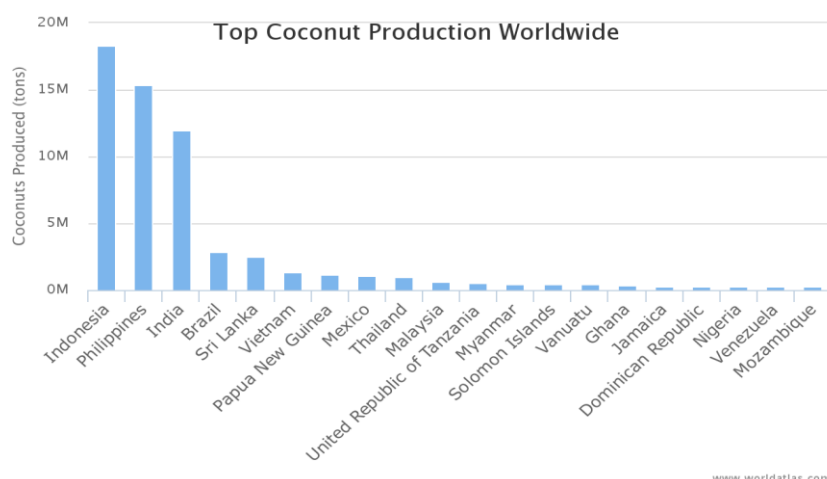
Para asegurar la sanidad de las plántulas de cocotero propagados por micropropagación o propagación normal (semillas) es necesario el uso de metodologías adecuadas para la detección del fitoplasma de ALC. Por lo tanto, se plantea el desarrollo de un método de indexación que permitirá la detección del fitoplasma de ALC en las cadenas de propagación (micropropagados o propagación normal) y posteriormente la generación de plántulas certificadas libres de fitoplasmas para evitar la dispersión de la enfermedad a través del movimiento de plántulas micropropagadas dentro y fuera del país. Además, se plantea el desarrollo de protocolos para el proceso de aclimatación de plántulas de cocotero micropropagados asegurando su sobrevivencia durante el medio de transporte y en invernadero para su apropiado establecimiento en campo.

Esta tesis está orientada a atender al tema del intercambio del germoplasma de cocotero dentro América Latina y el Caribe.

CAPÍTULO I**ANTECEDENTES****1.1 Cultivo de cocotero (*Cocos nucifera* L.)****1.1.1 Origen e importancia del cocotero en el mundo**

Cocos nucifera L. es una de las plantas de mayor interés comercial internacional. Se considera que es originaria del sudeste de Asia. El cocotero desempeña un papel importante en la vida económica, cultural y social de más de 80 países tropicales (Oyoo *et al.*, 2015). Indonesia y Filipinas son el primer y segundo país de mayor producción de cocotero en el mundo, seguidos por India, Brasil y Sri Lanka. Brasil, México y Jamaica ocupan el cuarto, octavo y decimosexto lugar en la producción mundial de cocotero y son los líderes en la producción de cocotero en América Latina y el Caribe (Figura 1.1). La superficie mundial total sembrada con cocoteros se estima en 12.44 millones de hectáreas. Los países asiáticos y el Pacífico constituyen el 89.4 por ciento de la superficie total de cocotero mundial con 11.12 millones de hectáreas (Shashikumar *et al.*, 2014; FAOSTAT, 2016).

Los registros históricos coloniales revelan que las primeras introducciones de cocotero en México se llevaron a cabo en la costa del Pacífico a través de los puertos de Salagua o Santiago en Colima y Acapulco en Guerrero. En la costa del Golfo de México, se llevó a cabo a través de los puertos de Veracruz y Campeche. La primera introducción podría haber sido en la costa del Pacífico en 1539 desde Panamá. Más tarde, desde las Islas Salomón en 1569 y desde las Filipinas entre 1671 y 1815. Las introducciones por la costa del Golfo de México se llevaron a cabo en 1549 desde Cabo Verde y Santo Domingo (Zizumbo, 1996).



Fuente: FAOSTAT data, 2016

Figura 1.1. Principales productores de cocotero en el mundo.

A lo largo de los años, el cocotero ha sido referido como "el árbol de los cielos" y "árbol de cien usos" (Rillo, 1999), lo que indica su notable utilidad y cualidades. Es una importante fuente de ingresos para las familias rurales y juega un papel importante en la generación de riqueza y en la mejora de la calidad de vida en muchos países tropicales. Los rendimientos sostenibles pueden aumentarse proporcionando materiales de siembra de alta calidad junto con una mejor gestión de las plantaciones de cocotero (Ramkhelawan *et al.*, 2016).

En el Caribe, la palma de cocotero desempeña un papel multifuncional. A nivel de cultivo a pequeña escala, el cocotero es un importante contribuyente a la seguridad alimentaria. A nivel industrial, los productos de valor agregado del cocotero son fuentes importantes de empleo e ingresos en las comunidades rurales. El cocotero produce una variedad de productos que se consumen regional e internacionalmente. Estos incluyen frutos verdes y secos frescos, copra, aceite de coco, agua de coco, entre otros. El aceite de coco se consume como alimento mientras que una cantidad significativa se emplea en la industria oleo-química. También se utiliza en la preparación de alimentos y en el proceso de fabricación de jabón. Además, la envoltura se utiliza para diversas fibras, carbón y otros productos aún no totalmente comercializados. Más allá de la costa, la palma de cocotero es muy popular en el Caribe para el paisajismo y embellecimiento del hogar (Ramkhelawan *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2007).

1.1.2. Usos de *Cocos nucifera* L.

El cultivo del cocotero es considerado como uno de los cultivos con mayor diversidad de usos y aplicaciones debido a que se pueden aprovechar todas las partes de esta planta. Existen aproximadamente 360 usos domésticos del cocotero. Según un dicho de Sri Lanka: «el cocotero puede ser usado de 99 maneras, pero con toda seguridad se encontrará una centena». La palma de coco tiene diversos usos. La madera del cocotero se usa para la construcción de casas, puentes y granjas. El palmito (la yema terminal del cocotero) se consume como alimento crudo o cocido, contiene 3% de almidón y 5% de azúcar. Las raíces tienen propiedades antidiarreicas. Las hojas de las palmas son usadas para techos, canastas, sombreros, alfombras, etc. El agua de cocotero se consume como bebida rehidratante, aunque también ha sido usado como sustituto de sueros ya que posee un alto valor nutritivo (Cuadro 1.1) (Moreiras *et al.*, 2013). La nuez es su principal producto y existen una gran diversidad de usos: el aceite de coco usado en alimentos, cosmetología, combustibles y lubricantes; la harina de coco (que es un subproducto de la extracción de aceite) se usa como alimento para ganado; la copra (que es la pulpa blanca seca del cocotero) se usa como materia prima para la extracción de aceite y en la industria alimenticia como cocotero rallado, deshidratado, conservas, y otros. El cocotero tiene otros usos como materia prima tales como para la producción de carbón y carbón activado (usado en filtros de aire) o como combustible para calderas y cocinas. También se usa para fabricar botones, cucharas y adornos (Lizano *et al.*, 2005).

Cuadro 1.1. Composición de alimentos de cocotero fresco (Moreiras *et al.*, 2013).

	Por 100 g de porción comestible	Por trozo (80 g)	Recomendaciones día-hombres	Recomendaciones día-mujeres
Energía (Kcal)	373	209	3.000	2.300
Proteínas (g)	3,2	1,8	54	41
Lípidos totales (g)	36	20,2	100-117	77-89
AG saturados (g)	30,9	17,30	23-27	18-20
AG monoinsaturados (g)	2,4	1,34	67	51
AG poliinsaturados (g)	0,61	0,34	17	13
ω-3 (g)*	—	—	3,3-6,6	2,6-5,1
C18:2 Linoleico (ω-6) (g)	—	—	10	8
Coolesterol (mg/1000 kcal)	0	0	<300	<230
Hidratos de carbono (g)	3,7	2,1	375-413	288-316
Fibra (g)	10,5	5,9	>35	>25
Agua (g)	46,6	26,1	2.500	2.000
Calcio (mg)	13	7,3	1.000	1.000
Hierro (mg)	2,1	1,2	10	18
Yodo (μg)	1	0,6	140	110
Magnesio (mg)	52	29,1	350	330
Zinc (mg)	0,5	0,3	15	15
Sodio (mg)	17	9,5	<2.000	<2.000
Potasio (mg)	405	227	3.500	3.500
Fósforo (mg)	94	52,6	700	700
Selenio (μg)	10,1	5,7	70	55
Tiamina (mg)	0,03	0,02	1,2	0,9
Riboflavina (mg)	0,02	0,01	1,8	1,4
Equivalentes niacina (mg)	1,1	0,6	20	15
Vitamina B ₆ (mg)	0,04	0,02	1,8	1,6
Folatos (μg)	26	14,6	400	400
Vitamina B ₁₂ (μg)	0	0	2	2
Vitamina C (mg)	2	1,1	60	60
Vitamina A: Eq. Retinol (μg)	0	0	1.000	800
Vitamina D (μg)	0	0	15	15
Vitamina E (mg)	0,73	0,4	12	12

1.1.3 Principales tipos del cocotero

Sólo hay dos tipos distintas de cocotero: el Alto y el Enano. La variedad Enana es más pequeña en estatura y su vida útil es corta en comparación con el alto (TNAU, 2012). Además de estas dos variedades, varios híbridos se desarrollaron al azar a través de cruces controlados entre los altos y los Enanos. Se conocen como T x D (Alto x Enano) o D x T (Enano x Alto) de acuerdo con la variedad elegida, como progenitor femenino en el cruzamiento (DeTaffin, 1998). La introgresión de altos y enanos y la selección y diseminación ulterior por el hombre produjeron una amplia gama de variedades y la distribución pan-tropical del cocotero que se observa hoy en día. (Harries, 1978).

Variedades altas. Las variedades altas se cultivan extensamente, para su copra, aceite y fibra, en todas las áreas de cocoteros del mundo y toleran diversas condiciones de suelo y clima. El tronco tiene una base hinchada característica llamada "bole". Son conocidas como variedad "típica", alcanzan una altura de 20 a 30 metros y cada corona puede tener de 35 a 40 frondas, que cuando están completamente abiertas, pueden alcanzar una longitud de aproximadamente 6 m (Figura 1.2). Maduran lentamente, y florecen de los 6 a 10 años después de haber sido plantadas. Tienen una vida económica media de 60 a 70 años y generalmente viven de 80 a 90 años (Tnau, 2012). La nuez es de tamaño mediano a grande y varía de forma esferoidal a lineal-oblonga, con colores que van desde verde, amarillo y naranja hasta tonos marrones. La nuez madura 12 meses después de la polinización y la copra, aceite y fibra de esta variedad son de muy buena calidad (Ramkhelawan *et al.*, 2016).

En el Caribe, las cultivares altas predominantes son el Alto de Panamá y el Alto de Jamaica o el Atlántico (Singh *et al.*, 2008). El Alto Atlántico ha sido señalado como susceptible a la enfermedad de amarillamiento letal. Las variedades altas pueden crecer vigorosamente en los suelos arenosos de las costas y son tolerantes a la sequía. También pueden resistir los vientos fuertes debido a su estructura de raíz fibrosa masiva. Un árbol maduro puede producir más de 120 nueces al año. La nuez produce mucha carne y unas 6.000 nueces producen una tonelada de copra (Ghose y Gopalakrishnam, 2013). En México, las variedades o ecotipos predominantes son los Altos mexicanos 1 2 y 3 señalados como variedades con un alto porcentaje de resistencia a la enfermedad de amarillamiento letal (Zizumbo *et al.*, 1999).



Figura 1.2. Características del cocotero variedad Alto del Atlántico.
(Ramkhelawan *et al.*, 2016).

Variedades Enanas. Las variedades enanas (Figura 1.3) se clasifican con base al color de la nuez. Estas variedades producen nueces de colores: verdes, rojas o naranjas, doradas o bronceadas, y marrones. La resistencia del enano malayo al amarillamiento letal es la característica que los hace como los más importantes del mundo. Esta variedad enana se cultiva en todos los países del Caribe. En Surinam, Guyana, Santa Lucía y Belice, hay un cultivar enano marrón que llega a producir de 2.5 a 3 años después de la siembra, y a los seis años bajo un buen manejo puede rendir entre 15 a 20 nueces por racimo (Ramkhelawan *et al.*, 2016). Los enanos se plantan generalmente para las nueces tiernas (producción del agua) y con propósitos ornamentales. Son de talla baja (8-10 m, 20 años después de la siembra). Se cree que los enanos son mutantes de los tipos altos. Estas variedades comienzan a producir alrededor del tercer año, y a veces a menos de un metro de altura del tallo, pero su vida productiva es corta, de 30 a 40 años (Tupinambá *et al.*, 2005).

El Enano Malayo puede producir entre 80 y 100 frutos secos al año por palma, con una densidad de plantación de 205 palmas por hectárea y sin riego (Santos *et al.*, 1996). Las nueces suelen ser más pequeñas y redondas. Tienen muy poca pulpa, pero su agua es muy dulce. El pedúnculo es corto pero el racimo está bien soportado por el pecíolo de la hoja. Los árboles enanos por lo general producen mayor cantidad de frutas y de menor tamaño que las variedades altas; sin embargo, son muy resistentes. Una nuez

descascarada pesa alrededor de 85 gramos con un 60% de contenido de aceite. Los árboles enanos son más sensibles a la sequía, a la salinidad y al viento que las variedades altas y prosperan mejor en tierra adentro, en suelos fértiles y bien drenados. Las variedades enanas amarillas y verdes son utilizadas como madre femenina en los programas de mejoramiento en el desarrollo de híbridos de alto rendimiento (Ghose y Gopalakrishnam, 2013; Ramkhelawan *et al.*, 2016).

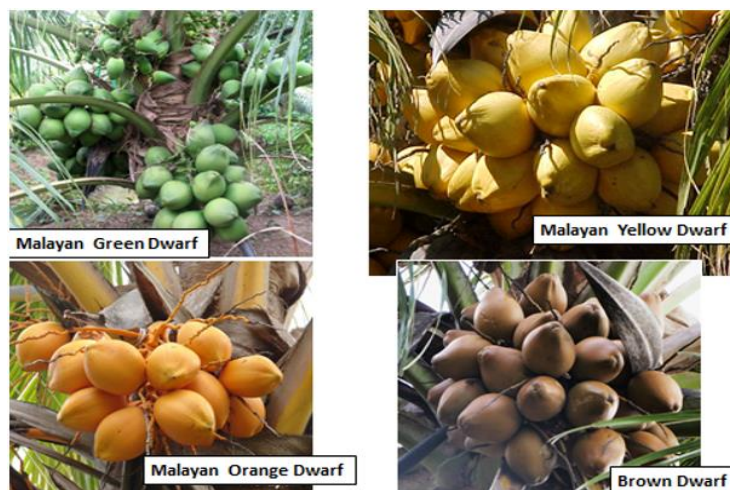


Figura 1.3. Variedades de enanos malayos de cocotero popular en el Caribe (Créditos de la foto: Pinterest.com, 2016, Vendio Services, 2016). Tomado del Reporte técnico de Ramkhelawan *et al.*, 2016.

Híbridos. Son productos de cruzamientos Inter varietales de dos formas morfológicas de cocotero. Los cruces naturales entre altos y enanos ocurren esporádicamente en poblaciones tradicionales. En Jamaica, el programa de mejoramiento de la Junta de la Industria del Cocotero produjo híbridos F1, utilizando combinaciones del enano malayo y los cultivares altos seleccionados de Jamaica y Panamá. Posteriormente se realizaron ensayos de evaluación en campo y se seleccionó el Maypan para su plantación comercial, en 1974. Éste es más resistente que el Enano Malayo Amarillo y desde entonces en Jamaica ha reemplazado al enano malayo como el cultivar de cocotero que era el más sembrado. (Wallace, 1994). Produce frutos secos en un plazo de 3 años permitiendo una cosecha fácil y crece unos 18 m de altura. Tiene un pequeño fuste y una altura intermedia entre el alto y el enano. Es algo sensible a la sequía y a la salinidad, prefiere un suelo

fértil y bien drenado. Las nueces pueden ser verdes o marrones y los pecíolos de las frondas son de color verde limón o marrón. La corona tiene una forma de “V” como el enano malayo. Los híbridos de tipos altos, como la cruza del alto de Panamá y Jamaica x enano malayo, se han popularizado recientemente (Guyana Marketing Corporation, 2014). Los rasgos variables existentes entre las poblaciones de altos y enanos, y dentro de los altos, proporcionan una buena oportunidad para producir varios recombinantes que podrían mostrar las características deseadas. Las plántulas híbridas muestran un crecimiento rápido y una mayor producción de hojas. Tienen una alta capacidad de carga, muestran precocidad en la floración y dan mayor rendimiento, cantidad y mejor calidad de copra y aceite en comparación con los padres (Figura 1.4). Poseen características que son intermedias a las de Enanos (E) y Altos (A). Aunque cruzamientos de A x E y E x A producen plantas útiles, los datos de la investigación y la experiencia de campo indican que el entrecruzamiento E x A es mejor para la regularidad en producción (Ghose y Gopalakrishnam, 2013). Las plántulas híbridas en la siembra exhiben una tasa de crecimiento rápido con una tasa más alta de producción de hojas. Estos cocoteros florecen a temprana edad y dan un mayor rendimiento, cantidad y calidad de copra y aceite (65 - 69%) en comparación con sus padres. Comienzan a producir a los cuatro años después de la siembra, tienen un alto rendimiento anual de alrededor de 95 a 116 frutos secos por árbol y producen copra de buena calidad. Los híbridos como todos los tipos de cocotero funcionan bien bajo buenas prácticas de manejo y responden bien a la aplicación de fertilizantes y al riego (Ghose y Gopalakrishnam, 2013). Los frutos secos de árboles híbridos no deben usarse para la producción de plántulas debido a la variabilidad genética inherente de las generaciones F1.

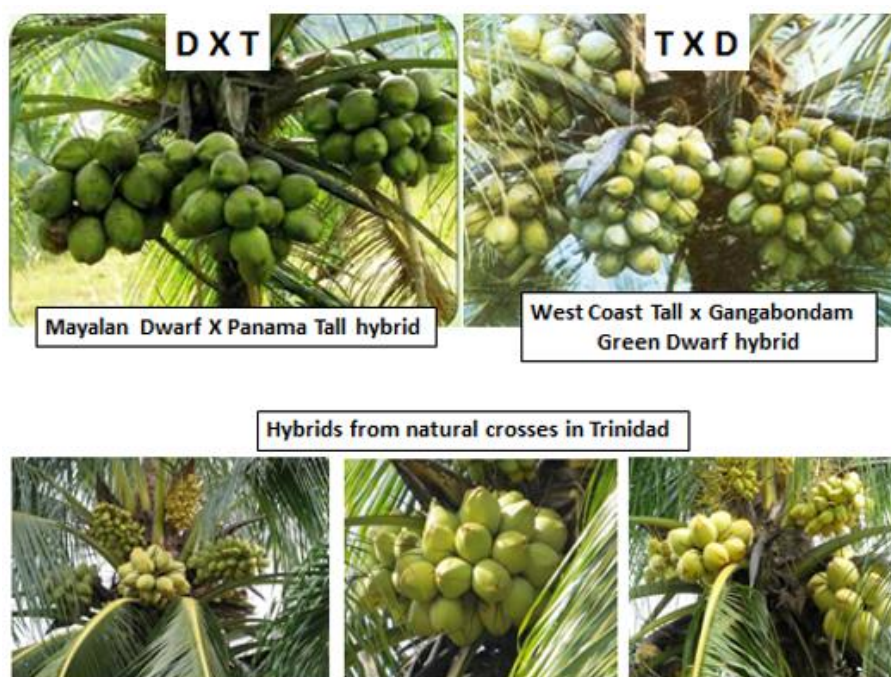


Figura 1.4. Variedades híbridas de cocotero (Créditos fotográficos: TNAU, 2012; Widayat, 2014).

Palmas híbridas en México. En 1994 el INIFAP inició la producción masiva de híbridos de cocotero, empleando como progenitor femenino al Malayo Enano Amarillo y como progenitor masculino al criollo Alto del Pacífico. El primero como donador de la resistencia al amarillamiento letal y el segundo proporcionando la productividad y rusticidad. El híbrido, resultado de la cruce del cocotero Enano Malayo Amarillo con el Cocotero Alto Pacifico presenta ensanchamiento basal del tallo en la primera etapa de desarrollo semejante al del cocotero alto, sin embargo, al paso de dos o tres años este abultamiento se reduce rápidamente para conservar una protuberancia media con respecto a los cocoteros altos (Palacios, 2013). En términos generales, el híbrido reúne las siguientes características: inicia la producción a los cuatro años y medio, produce de 120 a 130 frutos por planta por año, produce un promedio de 200 gramos de copra por nuez, se adapta a suelos pobres y resiste periodos de inundaciones hasta por un mes y sequias hasta por dos meses (Domínguez *et al.*, 1999).

Algunos ejemplos de híbridos elites en México son: el Chactemal (Michoacán), el Ordaz (Colima), el Xcaret (Nexpa), el Cancún (San Luis-San Pedro) y el Donaji (Oaxaca) que es

el producto del cruzamiento entre el Malayo Enano Amarillo y los Criollos Altos del Pacífico (Figura 1.5). Estos híbridos poseen características deseables de resistencia al amarillamiento letal, precocidad, y alta producción de copra y agua (Ríos, 2011).



Figura 1.5. Variedad híbrida mexicana “Donaji”. Ríos, 2011

1.2 Propagación del cocotero

1.2.1 Propagación por semilla

El cocotero se propaga sólo por semilla, aunque existe una gran necesidad de desarrollar métodos de propagación clonal para calidades superiores de cocotero. Existen algunos cultivares propagados por semilla que mantienen sus características con bastante regularidad. Es importante seleccionar las semillas de árboles que producen cosechas abundantes de cocoteros de alta calidad. Los cocoteros con su endocarpo, se colocan en el semillero a una distancia de 30 cm y se colocan lado a lado, con los poros de germinación hacia arriba. El brote saldrá a través del poro de germinación funcional. Tan pronto como ocurre la brotación (alrededor de un mes después de la siembra, el brote produce las raíces que pasan a través de la corteza hacia el suelo. En un lapso de 6 a 18 meses, las plántulas alcanzan el tamaño suficiente para su trasplante.

La propagación de los genotipos es muy lenta y difícil de cumplir a través de la propagación natural. Por lo tanto, deben ser considerados enfoques alternativos para la

rápida propagación y siembra de materiales mejorados. En este sentido, la biotecnología, enfocada principalmente en el cultivo de tejidos *in vitro*, parece proporcionar una alternativa conveniente para el futuro, debido a su potencial para la propagación clonal masiva en esta especie (Perera *et al.*, 2007; 2009).

1.2.2 Micropropagación por embriogénesis somática *in vitro* de cocotero

La micropropagación puede ser considerada como una extensión de la mayoría de los métodos de propagación convencional y consiste en la propagación de plantas en un ambiente controlado, bajo condiciones asépticas empleando medios de cultivos artificiales y adecuados. Es un método de propagación muy útil y se emplea en la mayoría de los programas de mejoramiento genético debido a su potencial de producir masivamente plantas de calidad uniforme a escala comercial partiendo de un genotipo y/o explante elite con una tasa de multiplicación grande (Olmos *et al.*, 2004). Las principales cualidades de la micropropagación son la rapidez y la multiplicación clonal de genotipos de plantas seleccionadas y libres de enfermedades y plagas (Husseeey, 1983; Smith y Drew, 1990). Una de las herramientas de micropropagación más usadas hoy en día es la propagación clonal, principalmente la embriogénesis somática.

La embriogénesis somática es un fenómeno que ocurre naturalmente y se observó por primera vez en plantas del género *Kalanchoe* (Garcés *et al* 2007, 2009., Fehér, 2015). Este fenómeno ha sido reproducido en condiciones de laboratorio para estudiar el desarrollo embrionario, identificar los mecanismos reguladores de la embriogénesis vegetal a nivel celular, molecular y tisular y también ayudar en el proceso de regeneración de la planta (Loyola-Vargas, 2016, Mahdavi-Darvari *et al.*, 2015). La embriogénesis somática es la reestructuración de células somáticas para mantener la división, generar embriones somáticos y un organismo completo idéntico a la especie progenitora bajo condiciones de inducción (Verdeil *et al.*, 2001; Quiroz Figueroa *et al.*, 2006). También se define como un proceso en el que una estructura bipolar, que se asemeja a un embrión cigótico, se desarrolla a partir de una célula no cigótica sin conexión vascular con el tejido original. (Von Arnold *et al.*, 2002). Los primeros reportes de inducción de embriogénesis somática fueron reportados por Steward *et al.*, (1958); Reinert, (1959) en los años 50 usando como modelo de estudio la planta zanahoria. Sin embargo, en cocotero los

primeros trabajos de embriogénesis somática fueron realizados por Eeuwens en (1976). Uno de los factores más importantes y vital para la inducción de embriogénesis somática son los reguladores de crecimiento vegetal como las auxinas que son responsables de la regulación de las respuestas del tejido introducido a cultivo *in vitro*. Al introducir los explantes seleccionados a en un medio de cultivo adecuado bajo condiciones específicas se estimula la producción de brotes y su posterior subcultivo en forma repetitiva, hasta producir una gran cantidad de plántulas, con las características genéticas de la planta madre.

Desde los años setenta del siglo pasado, se han realizado intentos para clonar *in vitro* el cocotero. Se han evaluado diferentes tipos de explantes: hojas inmaduras, raíces, embriones e inflorescencias inmaduras con diferentes grados de éxito, siendo posible la inducción de la embriogénesis y regeneración a partir de inflorescencias inmaduras (Verdeil *et al.*, 1994) y de plúmula (Hornung, 1995; Oropeza y Chan, 1995). En el caso particular de plúmula es posible obtener embriones somáticos y regeneración de plantas en forma reproducible y con una eficiencia mayor a la alcanzada con otros tipos de explantes (Chan *et al.*, 1998), pero su magnitud es todavía baja con relación a lo necesario para una aplicación práctica. La baja capacidad embriogénica del cocotero está asociada a diversas causas como el intenso necrosamiento del tejido, la heterogeneidad en las respuestas a diferentes estímulos, fuerte capacidad de enraizamiento y una alta formación de tejido tipo haustorial (Verdeil y Buffard, 1995) así como la formación anormal de embriones somáticos (ES).

El cocotero es una especie recalcitrante debido a que presenta una baja capacidad embriogénica atribuida a diversas causas. En esta especie, la formación de embriones somáticos a partir de callos embriogénicos (CE) ocurre cuando el callo es cultivado íntegramente sin sufrir fragmentación o división. Los ES crecen fusionados y su desarrollo no es sincronizado lo que limita la individualización de éstos, así como su desarrollo independiente hasta la formación de una planta completa (Azpeitia Morales *et al.*, 2009).

El desarrollo de protocolos de micropropagación para el cocotero ha progresado lentamente por ser una especie de monocotiledóneas, pero recientemente se ha logrado a través de la embriogénesis somática (Sáenz-Carbonell *et al.*, 2013). Entre los explantes probados, las plúmulas de embriones cigóticos han sido el tejido más sensible en

términos de la formación embriogénica de callos, la producción de embriones somáticos y la conversión a plántulas (Figura 1.6) (Chan *et al.*, 1998; Azpeitia Morales *et al.*, 2003).

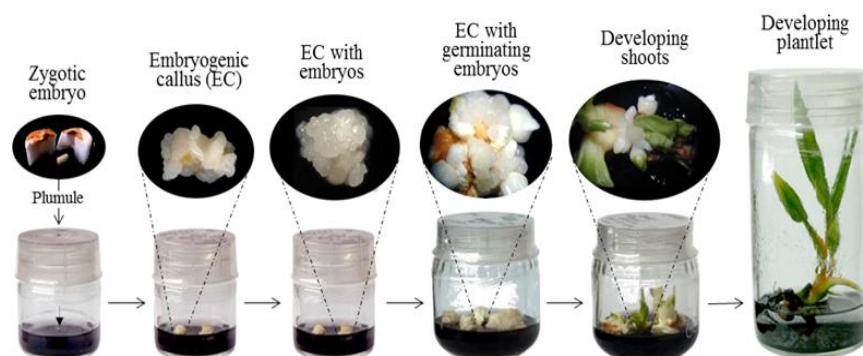


Figura 1.6. Proceso de micropropagación por embriogénesis somática en el cultivo de cocotero usando plúmulas como explante.

Chan *et al.* (1998) generaron exitosamente un protocolo de propagación masiva reproducible en el laboratorio de embriogénesis somática en cocotero del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY). Se usaron explantes de plúmulas de embriones cigóticos los cuales se colocaron en medios de cultivos artificiales usando 1 μ M de 2,4-D (medio 1) a una concentración en condiciones de oscuridad y posteriormente, en el mismo medio, combinado con 6-benciladenina (BAP) a una concentración de 50 μ M (medio 2) en fotoperiodo. Usando este protocolo se logró obtener rendimientos de 57% de inducción de callo, comparado con resultados obtenidos por Verdeil y colaboradores (1994) quienes obtuvieron un rendimiento del 30%; además, se obtuvo un rendimiento del 22% de callos con embriones somáticos los cuales germinaron y se obtuvieron 11.5 brotes por callo, de los cuales el 50% logró desarrollarse hasta plántula para la micropropagación de cocotero usando explantes inmaduros de rachillas (Figura 1. 7).

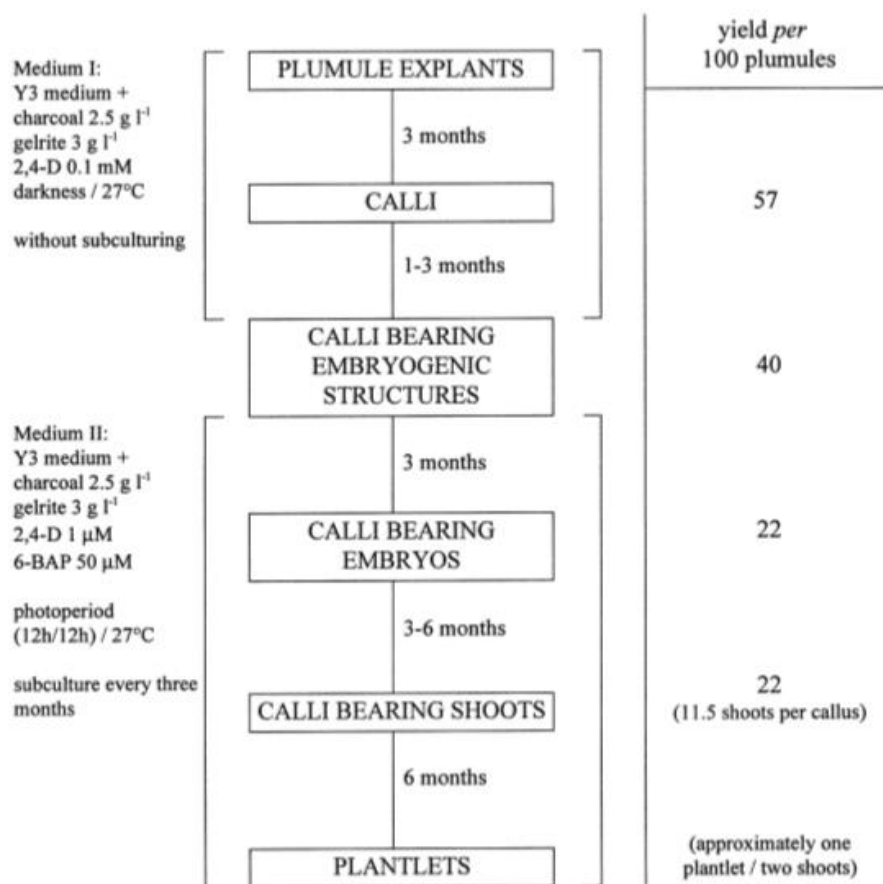


Figura 1.7. Proceso de regeneración de plántulas de cocotero mediante embriogénesis somática (Chan *et al.*, 1998).

Sandoval-Cancino *et al.* (2016) desarrollaron un protocolo para producir y multiplicar callos embriogénicos de palmas híbridas. Este protocolo es actualmente empleado en el CICY para la producción de callos embriogénicos de plantas híbridas de gran interés utilizando como explante rachillas (inflorescencia del cocotero).

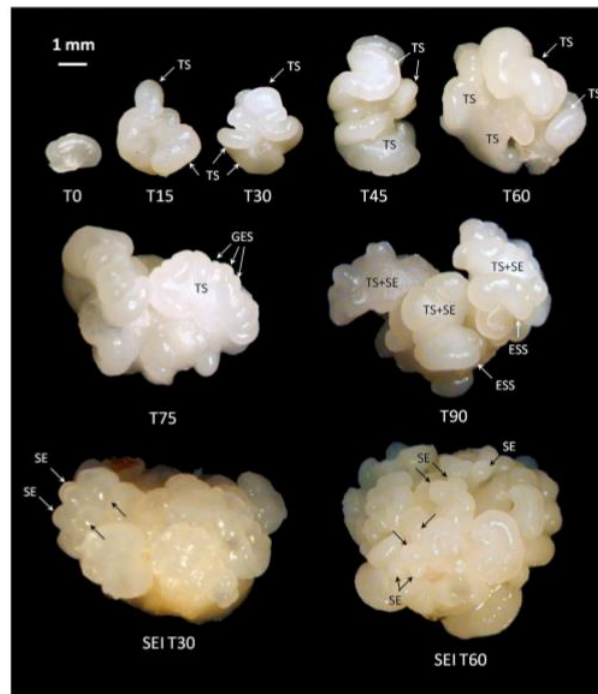


Figura 1.8. Cambios morfológicos que ocurren durante el desarrollo del callo embriogénico inducido por estructuras embriogénicas utilizadas como explantes (Sandoval-Cancino *et al.*, 2016).

1.3. Transmisión/eliminación del fitoplasma de ALC por técnicas de cultivo *in vitro*

Las técnicas de cultivo *in vitro* o micropropagación son una excelente alternativa para superar las dificultades de la propagación convencional del cocotero y de propagación masiva de plantas élites. Además, de su utilidad para la propagación, también se utilizan de forma rutinaria para la erradicación de virus y fitoplasmas en diferentes cultivos, a la par de métodos de eliminación como la termoterapia, quimioterapia y crioterapia (Parmessur *et al* 2002; Singh *et al* 2007; Gribaudo *et al* 2007).

Hasta la fecha no existe reportes de la eliminación del fitoplasma de ALC en cocotero provenientes de explantes positivos a la enfermedad en cultivo *in vitro*. Sin embargo, hay reportes de la eliminación de otros tipos de fitoplasma en cultivos como; fitoplasma de amarillos de caña de azúcar utilizando rollos de hojas jóvenes como explante para el proceso de micropropagación generando callos y luego plántulas normales (Parmessur *et al.*, 2002). Ende acuerdo a lo planteado anteriormente, es necesario estudiar si el fitoplasma de ALC es transmisible a cultivo *in vitro* y determinar si dicha técnica puede ser utilizado para su eliminación. Por lo tanto, se decidió responder esta pregunta en mi trabajo de investigación para asegurar la generación de plántulas de cocotero libres del fitoplasma.

1.3 Problemática del cocotero

La productividad de las plantaciones de cocotero en México es muy baja debido al uso de técnicas de manejo muy rudimentarias, incluyendo instrumentos manuales básicos como el machete y mano de obra barata, no especializada; sólo los contados grandes productores ocasionalmente utilizan maquinaria. Las plantaciones en México parecen abandonadas y sólo reciben un manejo mínimo que no resulta el más adecuado, siendo la cosecha, la mayoría de las veces, la única práctica que se realiza (Sánchez *et al.*, 2002). Del cultivo del cocotero dependen de manera directa un millón de campesinos e indirectamente otros dos millones más de personas, entre los que se encuentran los comerciantes e industriales del producto y artículos terminados. Por ello, se requiere de la preservación y el fomento de las plantaciones, a través de un programa integral para el desarrollo del cocotero, con lo que básicamente se promovería el desarrollo sustentable de las costas tropicales de México (Sánchez *et al.*, 2002).

1.4.1 Plagas y enfermedades del cocotero

La producción natural de cocotero ha disminuido de manera considerable en los últimos años debido a diversos problemas. En la actualidad, el cultivo atraviesa por una problemática compleja cuyo componente principal es la fitosanidad; dentro de este aspecto destaca el daño causado por el ácaro *Eriophyes guerreronis* (Keifer) y el acaro rojo de las palmas (*Raoiella indica* Hirst), los Picudos *Rynchophonus palmanum* (Linn.), (Villanueva *et al.*, 1985; SAGARPA, 2013), *Phytophthora palmivora* (Blaha *et al.*, 2004), Hartrot o la marchitez de los Cedros causada por el protozoario *Phytophthora* sp (Dollet, 1993) y una de las más importantes por su grado de devastación es el amarillamiento letal causado por fitoplasmas (Oropeza *et al.*, 2011).

1.4.2 Amarillamiento letal del cocotero (ALC)

El Amarillamiento letal del cocotero (ALC) es una enfermedad asociada con fitoplasmas que ha destruido una gran cantidad de cocoteros diferentes en partes de América latina, el Caribe y África (Ntushello *et al.*, 2013). El ALC afecta más de 38 especies de palma oriundas del Caribe, en donde sus efectos han sido más notables en cocotero que en otras palmas, debido a su producción comercial, llegando a matar millones de palmas en los últimos cincuenta años (Figura 1. 8) (Oropeza *et al.*, 2011).

ALC fue Identificado por primera vez en Jamaica donde causó la muerte de 7 millones de palmas de cocotero siete millones de palmas de cocotero en 1961 a 1983 (Myrie, 2012; Jones, 2002). En otras latitudes, bajo diferentes nombres: África, “Akwawilt” en Nigeria, “Cape St. Paul Wilt” en Ghana y “Kain-cope disease” in Togo, mato millones de palmas de cocotero (Eziashi and Omamor, 2010). En Tanzania, una estimación de ocho millones de palmas de cocotero, alrededor del 38% de la población, fueron devastadas por el “amarillamiento letal” desde la década 1960s (Mugini, 2002). Paradójicamente, las enfermedades tipo amarillento no siempre son letales (Ntushello *et al.*, 2013), pero pueden ocasionar igualmente pérdidas económicamente devastadoras debido a la reducción del rendimiento, como en la India, donde la enfermedad de la raíz (marchitez) es una "enfermedad no letal debilitante" (Manimekalai *et al.*, 2014).

El ALC se observó por primera vez en México en la Isla de Cozumel, Quintana Roo en 1977 y fue confirmada cinco años después mediante microscopía electrónica (McCoy *et al.*, 1982). Veinte años después de su descubrimiento había ocasionado la pérdida de 650

mil de palmeras. Las entidades afectadas fueron Quintana Roo, Yucatán, Campeche y Tabasco. El ALC destruyó 13,000 ha de palmas en la Península de Yucatán y aproximadamente 5 millones de palmas en total (Mc Coy *et al.*, 1983).



Figura 1.9. Figura 1.10 Plantaciones de cocotero afectados por ALC en (A) Jamaica y (B) México.

1.4.3 Agente causal y vector

El agente causal del ALC es un fitoplasma del grupo 16SrIV (Firrao *et al.*, 2004) “*Candidatus Phytoplasma palmae*” que pertenece a la clase Mollicutes (Plasvic *et al.*, 1972; McCoy *et al.*, 1983) y es transferido de una palma enferma a otra palma enferma por el homóptero *Haplaxius crudus* (Howard *et al.*, 1983). La secuencia y detalle de la progresión de los síntomas puede variar según el subgrupo de fitoplasmas, ubicación geográfica, especie huésped y variedad (Dollet *et al.*, 2009; Harrison *et al.*, 2014).

1.4.4 Fitoplasmas

Los fitoplasmas antiguamente denominados organismos tipo micoplasma (MTO) se descubrieron por primera vez a principios de los años 90 del siglo pasado (Kunkel, 1926). Los fitoplasmas son microorganismos procariotas sin pared celular; viven como parásitos obligados de los vegetales. Los fitoplasmas normalmente habitan el floema de las plantas a bajas concentraciones y tienen una distribución desigual en las plantas leñosas, especialmente en monocotiledóneas (Seemüller *et al.*, 1998)

Las características comunes que presentan los fitoplasmas son: microorganismos pleomórficos, es decir, sin ninguna forma bien definida (Figura 1. 9), son incultivables, su

ADN contiene un alto contenido de Tiamina y Adenina, tiene dimensiones reducidas (0.2-1.0 μm) y están asociados con vectores de insectos para su transmisión en la naturaleza (Lee *et al.*, 2000, Bai *et al.*, 2006). Estas bacterias están limitadas al hábitat intracelular. Mediante la amplificación de secuencias altamente conservadas de regiones del gen 16SrDNA por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sobreponiendo los productos finales de una digestión enzimática del genoma, con enzimas de restricción RFLP (Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción), se clasificaron inicialmente a los fitoplasmas en 18 grupos y en más de 40 subgrupos el sistema de clasificación de fitoplasmas más completo y ampliamente aceptado (Lee *et al.*, 2004; Arocha *et al.*, 2005; Al-Saady *et al.*, 2008). Actualmente el número de grupos taxonómicos sigue sin estar claro; trabajos recientes sobre resúmenes de restricción simulados por computación del gen 16Sr sugirieron hasta veintiocho grupos (Wei *et al.*, 2007; Ntushelo *et al.*, 2013). En América Latina y el Caribe los fitoplasmas que ocasionan el ALC han sido clasificados dentro del grupo 16SrIV y subgrupos: 16SrIV-A 16SrIV-B, 16SrIV-C, 16SrIV-D, 16SrIV-E and 16SrIV-F, señalado al subgrupo A como el subgrupo responsable de ALC. En México se han identificado los subgrupos A, B y D (Hernández *et al.*, 2018) mientras que en el caribe se han identificado los subgrupos A, B, D, E y F (Ntushello *et al.*, 2013).

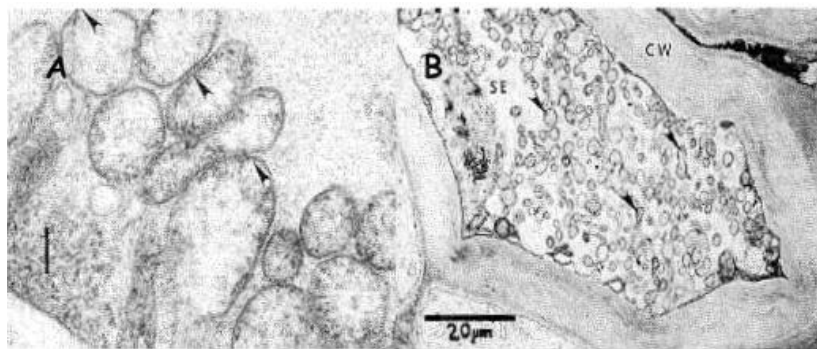


Figura 1.10. Fitoplasma de ALC. **A.** Micrografía electrónica (ME) de un OTM en una sección longitudinal de un tubo criboso de una palma de cocotero. Las flechas señalan las membranas unitarias típicas de los OTM. Línea = 0.1 μm . **B.** ME de una célula floemática (SE) de una hoja basal joven de una palma infectada por fitoplasmas (flechas). CW: pared celular. Línea: 2.0 μm (Mc Coy *et al.*, 1983).

1.4.5 *Haplaxius crudus* vector de transmisión de ALC

Ensayos realizados por Howard *et al* 1983 demostró la transmisión del fitoplasma de ALC por el insecto *Haplaxius crudus* en palmas como *Cocos nucifera*, *Pritchardia thusrtonii*.

Además (Schuiling, 1976) realizó estudios de poblaciones de Homoptera en áreas afectadas por ALC en Jamaica y (Woodiel, 1978) en Florida donde se determinó que el *H. Crudus* era el principal vector responsable de la transmisión del ALC en ambas plantaciones de cocotero.

El insecto vector del patógeno de ALC es el “chicharrita de la palma”, conocido científicamente como *Haplaxius crudus* (Van Duzee) (Figura 1.10) (Hemiptera: Cixiidae), antes conocido como *Myndus crudus* (Pardey *et al.*, 2016). *Haplaxius crudus* fue descrito por primera vez en 1907 como *Myndus crudus* por Van Duzee a partir de adultos colectados en Hope Bay y en Troja, Jamaica (Van Duzee, 1907). Un aspecto característico de estos insectos es que sus estados inmaduros (denominados ninfas) se alimentan de las raíces de las poaceas, pero cuando llegan a la etapa adulto, emergen del suelo y vuelan hacia el follaje donde se alimentan de las palmas mediante su aparato bucal que es del tipo chupador-picador (Pardey *et al.*, 2016).

Este homóptero está ampliamente distribuido en las regiones tropicales y subtropicales del continente americano. En la región del Caribe y Florida, la enfermedad de ALC también es transmitida por *Haplaxius crudus* Van Duzee, y posiblemente por especies de la familia *Cedusa* (Derbidae) (Brown *et al.*, 2006).



Figura 1. 11. *Haplaxius crudus*,
vector de transmisión del ALC.

1.4.6 Sintomatología

Los síntomas detallados de ALC se describen en Arellano y Oropeza (1995), Bertaccini *et al.*, (2014), Córdova *et al.* (2014), Dollet *et al.* (2009), CABI (2012) y (McCoy *et al.* 1983). Los síntomas típicos del ALC son la caída de frutos tanto maduros como no desarrollados, necrosamiento de las inflorescencias, amarillamiento de las hojas maduras hacia las más jóvenes, así como la caída de las hojas dejando vivo únicamente el tallo (Figura 1. 11). Según Mc Coy desde 1983 el primer síntoma hasta la muerte de la planta transcurre un período de entre 3 a 6 meses.

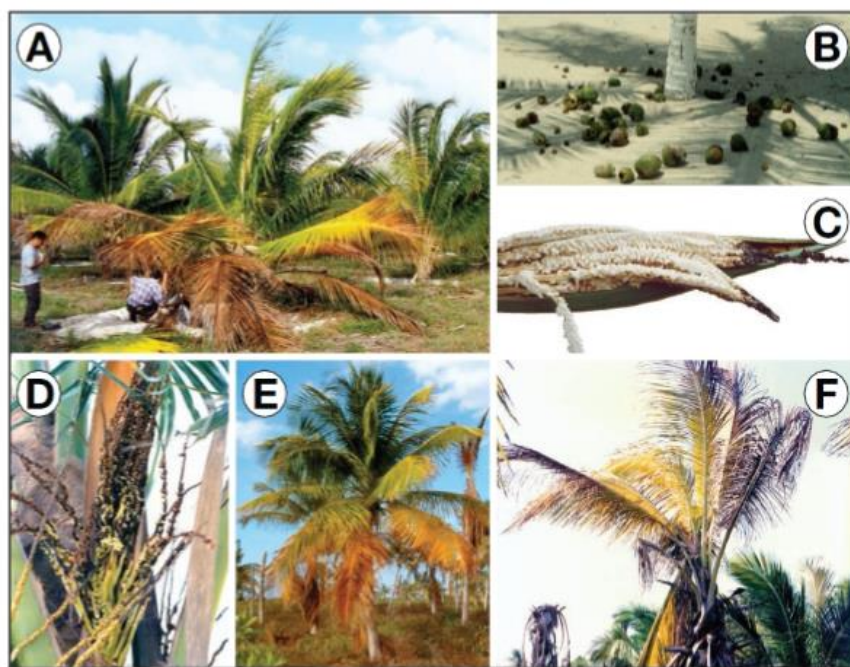


Figura 1.12. Sintomatología de ALC en cocotero. **A.** Palmas sin frutos muestran amarillamiento en el follaje. **B.** Palmas con frutos presentan caída de nueces. **C** y **D.** Necrosis de inflorescencia. **E.** Amarillamiento de follaje empieza en las hojas más viejas y continua hacia las jóvenes **F** (Zizumbo-Villarreal *et al.* 2008).

1.5 Método de detección de los fitoplasmas

La detección del fitoplasma con fines de diagnóstico se ha complicado por varios factores, entre los cuales se incluyen la incapacidad de cultivar estos patógenos en los medios artificiales, su pequeño tamaño y su presencia en un número reducido de tejidos vegetales (Thomas y Norris, 1980). La detección e identificación de fitoplasmas es necesaria para un diagnóstico más preciso de enfermedades (Nejat *et al.*, 2010). El Amarillamiento Letal de Cocotero se detecta generalmente mediante convencionales y moleculares.

Método Convencional

La detección convencional se basa en la descripción visual de la sintomatología que se presentan las plantas enfermas descrito por Mc Coy y colaboradores en 1983. Desgraciadamente este método no es confiable debido a que la sintomatología que presenta el ALC es muy parecida a la que ocasionan otros patógenos, como en la Pudrición del Cogollo (Hartrot) ocasionada por protozooario *Phytopmonas* sp o el Anillo Rojo ocasionada por el nemátodo *Bursaphelenchus cocoterophylus* (Coob) Baujard. La caída de frutos secos y prematuros y la decoloración foliar también pueden ser inducidos por factores abióticos tales como deficiencias nutricionales, temperaturas menores de 20 °C (De taffin, 1999). La aparición y la progresión característica de los síntomas (desarrollo del síndrome) es lo que identifica con precisión la enfermedad de ALC (Harrison *et al.*, 1995). Además de los síntomas, para el diagnóstico inequívoco de la enfermedad se requiere una confirmación adicional de la presencia de fitoplasma en los tejidos de palma afectados. Esto se ha llevado a cabo tradicionalmente mediante microscopía electrónica o por tinción con DAPI junto con la microscopía de epifluorescencia. Aunque son bastante sensibles, ambas técnicas no son específicas ya que no pueden distinguir un fitoplasma de otro (Harrison *et al.*, 1995).

Métodos Moleculares

Los ensayos de “Reacción en Cadena de la Polimerasa” (PCR) proporcionan un medio mucho más sensible que las pruebas serológicas o los ensayos de hibridación de ADN para la detección de fitoplasmas y facilita a los investigadores detectar y estudiar todo el

espectro de cepas de fitoplasma asociadas con plantas o vectores de insectos en todo el mundo (Lee *et al.*, 2000). La PCR implica una amplificación dirigida por cebador del ADN diana, usando un ADN polimerasa termoestable (Saiki *et al.*, 1988). Es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia diana es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células (Tamay *et al.*, 2013). Un problema importante en la detección de fitoplasmas del ALC es su distribución desigual y a su baja concentración en algunos tejidos de las palmas afectadas por esta enfermedad (Harrison y Oropeza, 2008), particularmente en palmas en las primeras etapas de desarrollo de la enfermedad o en las palmas asintomáticas. Esta limitación suele superarse usando PCR anidada, que implica dos ciclos de amplificación y posterior procesamiento de amplificación, RFLP o análisis de la secuencia de los productos resultantes, para determinar con precisión la identidad de fitoplasma. Desafortunadamente, este es un proceso que consume tiempo y es más propenso a generar contaminaciones por arrastre, entre otras desventajas (Cordova *et al.*, 2014).

Una alternativa viable es el uso de la PCR en tiempo real, junto con el uso de la tecnología de sonda TaqMan; esto se ha desarrollado recientemente para ensayos específicos, precisos y altamente sensibles para la detección del fitoplasma de ALC. La PCR en tiempo real es una técnica que combina la amplificación y la detección en un mismo paso. Es una técnica que posee muchas ventajas con respecto a la PCR convencional en términos de precisión, rango dinámico, tiempo de análisis corto, alta capacidad de automatización, rapidez en la visualización del producto (elimina la necesidad de realizar una electroforesis posterior) y ausencia de manipulaciones posteriores a la PCR que evitan la contaminación por arrastre (Higuchi *et al.*, 1993; Schaad and Frederick, 2002; Córdoba *et al.*, 2014).

El Ct, del inglés cycle threshold, equivale al número de ciclos necesarios para que cada curva alcance un umbral en la señal de fluorescencia. La comparación y los Ct entre las muestras permite calcular la diferencia en la cantidad inicial de las moléculas del ADN o ADNc específico que se desea evaluar, ya que mientras mayor cantidad del ADN blanco haya en una muestra, menor el número de ciclos (Ct) que se requiere para alcanzar este umbral. Entonces, el Ct es un valor directamente proporcional a la cantidad inicial del ADN blanco y a partir de este valor se puede calcular la cantidad del ARNm o del ADN. El valor

de Ct puede ser asignado de manera automática por el Software del equipo mediante diferentes algoritmos o bien se puede asignar de forma manual. Como todo valor de fluorescencia, el Ct es no un valor que puede ser afectado por características propias del equipo detector, como los filtros utilizados y el tiempo de vida de la lámpara, etc., por lo que no es posible comparar valores de Ct entre diferentes experimentos y/o equipos (Aguilera *et al.*, 2014). Es importante tener en cuenta que, debido a la distribución estadística, siempre hay un alto nivel de variación de Ct cuando las cantidades objetivo se aproximan a la copia única (valores de Ct de 34 - 40). Por lo tanto, las masas de muestra que producen valores Ct en este rango inevitablemente darán lugar a una menor precisión y, en consecuencia, a una menor potencia para detectar cambios de bajo rugosidad (Applied Biosystems, 2004).

1.6 Control del amarillamiento letal del cocotero

A la fecha no existe un método de control para la enfermedad del ALC debido a la complejidad de su agente causal: los fitoplasmas. Sin embargo, existen diferentes estrategias que se emplean para la disminución y/o dispersión de la enfermedad. Algunos de estos manejos se basan en la aplicación de antibióticos como la tetraciclina, el control del vector, la implementación de normas cuarentenarias estrictas para el movimiento de germoplasma de cocotero y la resiembra con variedades resistentes a la enfermedad. La aplicación de tetraciclina sólo permite la remisión de la sintomatología de la enfermedad, requiere mucha aplicación y es costoso (Howard y Mc Coy, 1980 y Mc Coy *et al.*, 1983).

Hoy en día la manera más eficiente para combatir a la enfermedad es mediante la siembra de variedades resistentes y la implementación de la indexación en los diferentes procesos de propagación (micropropagación y por semillas) afín de asegurar la reproducción de materiales libre del fitoplasmas.

1.7 Germoplasma resistente a amarillamiento letal del cocotero

La búsqueda de germoplasma resistente a ALC empezó en Jamaica por Been *et al.*, (1980) donde la enfermedad causo mayor daño y era urgente encontrar una posible solución. Ellos encontraron que el Enano Malayo Amarillo es una variedad con alta sobrevivencia al ALC y el Alto de Panamá es una variedad con una sobrevivencia

intermedia a la enfermedad por lo que crearon el híbrido MAYPAN conocido como la variedad resistente a ALC en Jamaica. Sin embargo, en los últimos años se empezó a sospechar que esta variedad estaba perdiendo sus características de resistencia. El “MAYPAN” que fue identificada como material resistente actualmente no lo es, debido a reportes de nuevos brotes de la enfermedad de ALC en estos cultivares (Lebrun *et al.*, 2010).

Desde la introducción de ALC en México, en 1977, los investigadores se vieron forzados a identificar las variedades resistentes. Zizumbo *et al.*, (1999) colectaron y probaron dieciocho poblaciones de cocotero de diferentes áreas de México, principalmente de la Costa Pacífica. Estas poblaciones fueron agrupadas en cinco ecotipos: Alto Atlántico de México, Enano Malayo Amarillo y Alto Pacífico de México 1, 2 y 3 (MPT). Las poblaciones de altos del Golfo de México distribuidos en la costa del Atlántico y la Península de Yucatán presentaron características de los Alto del Atlántico, los cuales son susceptibles al ALC.

En 1991, Zizumbo y colaboradores expusieron a estas poblaciones colectados a una zona donde la enfermedad de ALC se encontraba activa. Así reportaron que las variedades de los Alto atlánticos mexicanos eran susceptibles a la enfermedad y la variedad Enano malayo amarillo se consideró como la variedad más resistente. Los ecotipos Altos pacífico mexicano 2 y 1, son los más resistentes comparado con el ecotipo Alto pacífico mexicano 3 con resistencia intermedia (Figura 1.12).

Sin embargo, la base genética del cocotero es pequeña por lo que es necesario probar germoplasma de otras partes del mundo para poder disponer de una mayor diversidad genética (y Aké, 2004).

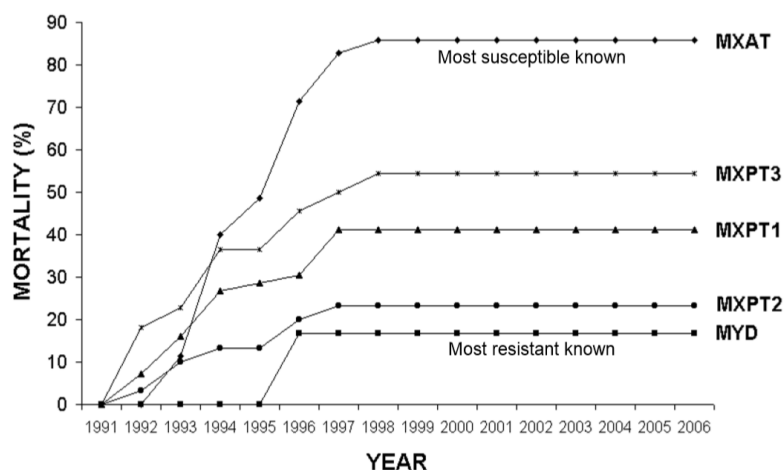


Figura 1.13. Mortalidad de los ecotipos del banco de germoplasma mexicano.

1.8 Indexación

La indexación es el término utilizado para cualquier procedimiento que pone a prueba la presencia de patógenos, con el propósito de tener plantas “libres de patógenos, para la distribución nacional e internacional y su propagación en programas de producción de plantas.

Dado que las epidemias son impulsadas por la cantidad de inóculo inicial y la velocidad a la que se infecta el tejido de la planta no infectada, es deseable tener procedimientos de diagnóstico o de indexación que permitan detectar el inóculo inicial. La detección temprana de patógenos permite la aplicación rápida de las estrategias de manejo y reduce la posibilidad de la dispersión del patógeno y el desarrollo de epidemias. La indexación es también importante en la producción de sistemas de certificación de plantaciones o plantas "libres de enfermedad". Idealmente, la técnica de indexación debe ser altamente sensible, ya que no sólo se trata de mantener los niveles de inóculo por debajo del umbral en que se inicia la epidemia, sino de que el material de siembra esté libre del patógeno. La indexación es también importante para la implementación de estrategias de cuarentena externas para mantener los países libres de enfermedades exóticas. (Goulter & Randles, 1997).

El logro de materiales libres de patógenos a través de la indexación y sus pruebas puede llevarse a cabo en diferentes etapas de la producción (Janse & Wenneker, 2002).

1.8.1 Indexación en el cultivo de cocotero

La indexación ha sido utilizada en muchos cultivos para la detección de virus y bacterias para lograr la certificación de plantas libres de patógenos. Sin embargo, en el cultivo de cocotero existe la indexación sólo para el germoplasma de Vanuatu (para el virus de la descomposición foliar del cocotero), en Guam (para el viroide tinangaja) y en algunas partes de Filipinas (cadang-cadang viroid) (Diekmann 2005).

El Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI) ha publicado con la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) las Normas Técnicas para el Movimiento Seguro de Germoplasma (Frison *et al.*, 1993). La recomendación general es mover los cultivos de embriones o el polen, y no las semillas (Tabla 1. 2) (Diekmann, 2005).

En el cultivo de cocotero no existe un protocolo para la indexación de fitoplasmas de ALC en plántulas producidas por micropropagación o por semillas en vivero; por lo tanto, trae como consecuencias una restricción para poder realizar intercambio de germoplasma de cocotero por la desconfianza de introducir materiales no indexados. Por lo cual, es necesario el desarrollo de protocolos de indexación en cocotero para ALC.

Cuadro 1. 2. Recomendaciones generales para el movimiento de germoplasma de cocotero.

Summary of FAO/IBPGR Technical Guidelines for the Safe Movement of Coconut Germplasm
Source: (Frison *et al.* 1993)

Pathogen	Specific Recommendation(s)
Coconut foliar decay virus (CFDV)	Indexing or exclusion of germplasm from Vanuatu
Coconut cadang cadang viroid (CCCVd)	Indexing or exclusion of germplasm from the Philippines
Tinangaja viroid (CTVd)	Indexing or exclusion of germplasm from Guam
Viroid-like sequences	Indexing recommended for germplasm that is moved from countries where these sequences are known to occur to countries where they have not yet been reported.
Lethal yellowing (Phytoplasma, MLO)	Transmission through seed, embryo culture or pollen not reported
Kerala wilt (Phytoplasma, MLO)	
Tatipaka disease (Phytoplasma, MLO)	
Blast (Phytoplasma, MLO)	A nursery disease which does not occur on adult trees
<i>Marasmiellus</i> spp. (bole rot, shoot rot)	Possibly seed-borne, can be eliminated in embryo culture
<i>Phomopsis coccoloba</i> (leaf spot) <i>Bipolaris incurvata</i> (leaf blight)	May be dispersed on husks. Recommendations are: • Embryo and pollen transfer should be carried out • Healthy nuts should be partially de-husked and treated with an appropriate fungicide
<i>Phytophthora palmivora</i> , <i>P. katusae</i> (bud rot, fruit rot)	Nuts may be infected internally, but then do not germinate. Recommendations are: • Embryo and pollen transfer should be carried out • Healthy nuts should be partially de-husked and treated with an appropriate fungicide

1.9 Movimiento del germoplasma de cocotero

Debido a la necesidad de replantar plantaciones de cocotero con materiales resistentes, altamente productivos y élites, es imperativo el movimiento seguro del germoplasma de cocotero a sitios y/o países que lo requieren. El movimiento seguro significa el movimiento del germoplasma de cocotero sin introducir plagas y enfermedades, o al menos aquellas plagas para las cuales se perciben riesgos de efectos indeseables después de la introducción a una región previamente no afectada (Eden-Green y Mpunami, 2005).

Sin embargo, es necesario el cumplimiento de los principios fitosanitarios generales recomendados para el movimiento de germoplasma de cocotero como semillas de nueces, cultivos de embriones y polen para eliminar el riesgo de diseminación de la mayoría de las plagas de artrópodos y hongos patogénicos, aunque es necesario encontrar alternativas a la fumigación de semillas por el bromuro de metilo debido a que este producto químico fue eliminado en virtud del Protocolo de Montreal sobre las sustancias que agotan la capa de ozono (Eden-Green y Mpunami, 2005).

Gracias a la ciencia y tecnología, existen otra forma de mover el germoplasma de cocotero, sin tener la necesidad de aplicar químicos tóxicos y con un mínimo de posibilidades de llevar insectos o patógenos. Este método se basa en el movimiento de plántulas de cocotero micropropagados en frascos plásticos bien sellados, indexadas para las principales plagas y enfermedades cuarentenarias, antes de ser enviados a su destino final.

JUSTIFICACIÓN

La manera más eficaz de enfrentar a la enfermedad de ALC y su manejo es mediante la distribución y replantación de materiales resistentes lo que además contribuye a la reducción y la dispersión del fitoplasma causante de la enfermedad. Por lo tanto, se plantea el desarrollo de protocolos para el intercambio seguro de germoplasma de cocotero resistente al ALC en América Latina y el Caribe; mediante la selección de materiales libres de fitoplasma, desarrollando e implementando métodos de indexación con base en técnicas de PCR para la detección del fitoplasma del ALC y optimizando los protocolos de envío y de aclimatación de plántulas de cocotero provenientes de cultivo *in vitro*.

HIPÓTESIS

La generación de un protocolo para el intercambio seguro de germoplasma de cocotero resistente al ALC, que incluye la metodología de indexación puede ayudar a evitar el intercambio de germoplasma infectado y contribuir con ello al intercambio seguro de germoplasma de coco entre países.

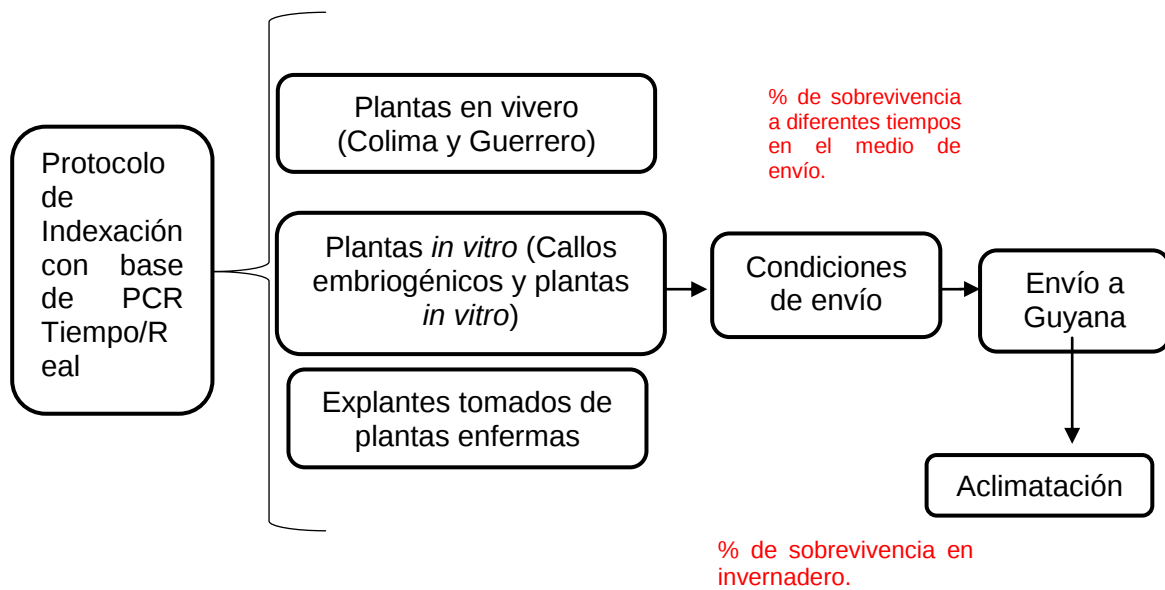
OBJETIVO GENERAL

Establecer protocolos para el intercambio seguro de germoplasma de cocotero libre de fitoplasma del ALC, para el movimiento de material en América Latina y el Caribe.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desarrollar un protocolo de indexación del fitoplasma de ALC y su aplicación para el intercambio seguro de cocotero.
- Evaluar la permanencia del fitoplasma de ALC en el proceso de micropropagación partiendo de explantes positivos a ALC.
- Evaluar y optimizar los protocolos de envío y de aclimatación de plántulas de cocotero provenientes de cultivo *in vitro*.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



CAPÍTULO II

DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE INDEXACIÓN DEL FITOPLASMA DE ALC

2.1 INTRODUCCION

El cocotero (*Cocos nucifera* L.) es considerado como la joya de los trópicos y es sin duda el cultivo arbóreo más importante del mundo debido a sus diversos usos. El cocotero desempeña un papel importante en la vida socioeconómica y cultural de más de 80 países tropicales (Oyoo *et al.*, 2015) y se considera como una fuente importante de ingresos para las familias rurales, desempeñando un papel importante en la mejora de la calidad de vida en muchos países tropicales. (Ramkhelawan *et al.*, 2016).

A pesar de todo el potencial que presenta, este cultivo está siendo devastado por la enfermedad ALC, causada por fitoplasma del grupo 16SrIV “*Candidatus Phytoplasma palmae*” subgrupo A mediante la transmisión del vector *Haplaxius crudus* y por semillas infectadas con el fitoplasma (Sáenz *et al.*, 2017). Desde su descubrimiento por primera vez en Jamaica en el año 1961 esta enfermedad incurable sigue extendiéndose a otros países en el Caribe, América Central y América Latina registrando pérdidas catastróficas.

Hasta la fecha la única manera de combatir a la enfermedad es mediante la resiembra de variedades resistentes como el Enano Malayo Amarillo (altamente tolerante), el Alto del Panamá (medianamente tolerante) y el híbrido ‘Maypan’ (EMA x AP) que fueron identificados como tolerantes a la enfermedad en Jamaica (Been, 1991). En México, Zizumbo *et al.*, (1999), realizaron un estudio para evaluar el germoplasma presente en el país y su resistencia a la enfermedad de ALC. Estos resultados indicaron la existencia de tres ecotipos: Alto del Atlántico (AA), Alto Pacífico 1, 2 y 3 y el Enano Malayo Amarillo dando énfasis a los ecotipos Alto Pacífico y los enanos malayo amarillo como los más resistente a la enfermedad en México.

Basado en los resultados obtenidos de los estudios anteriormente mencionados y a la presencia del (ALC) en la zona tropical, se han importado grandes volúmenes de semillas de variedades tolerantes a la enfermedad para su siembra en diferentes países (Arango, 2012). Sin embargo, la propagación de genotipos seleccionados para satisfacer la demanda en rápido crecimiento es muy lento y difícil de cumplir a través de la propagación natural (Perera *et al.*, 2007). Por lo tanto, se ha considerado la micropropagación *In vitro* de materiales elites o bien identificadas para su propagación

rápida y masiva para la distribución y siembra de materiales mejorados (Perera *et al.*, 2009). Sin embargo, es posible restablecer las densidades de cultivo de cocotero dentro y fuera de un país mediante la importación de materiales tolerantes a ALC y altamente productivo para poder satisfacer la demanda creciente de materiales de propagación y complementar a la propagación natural.

Diekmann, (2005), planteo que “es evidente que el movimiento de plantas o partes de plantas entre países o continentes conlleva el riesgo de introducir plagas exóticas o patógenos. Los países menos desarrollados carecen a menudo de instalaciones adecuadas de cuarentena vegetal y de diagnóstico por lo que son especialmente vulnerables a los efectos perjudiciales de las nuevas enfermedades introducidas. Es extremadamente importante que se reconozca el riesgo y que se elija una forma mínima de transferencia de riesgo de germoplasma, como las plántulas *in vitro* en lugar de las nueces”. Por lo tanto, se propone desarrollar un protocolo de indexación para el intercambio de germoplasma de cocotero con plántulas micropropagado (*in vitro*) para minimizar la dispersión del fitoplasma de ALC dentro y/o fuera del país. A pesar de que se recomienda la transferencia de germoplasma con plántulas *in vitro*, este protocolo engloba medidas fitosanitarias, que deben ser consideradas en la realización del intercambio de germoplasma con nueces, esto debido a que Sáenz *et al.*, (2017) evidenciaron la transferencia del fitoplasma por semillas indicando un riesgo al realizar el intercambio de germoplasma con semillas sin protocolos de indexación empleada. Este protocolo satisfará los criterios para exportar y/o importar materiales de interés (plántulas o semillas) para ser usados en los programas de rehabilitación del cultivo.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Identificación de focos del ALC

Para llevar a cabo la identificación de áreas con focos de ALC contactamos los oficiales del Comité de Sanidad Vegetal en Colima para conocer de la presencia de brotes de ALC en estos sitios, a fin de realizar una colecta de estos materiales para la detección del fitoplasma de ALC.

2.2.2 Colecta de muestras en el campo

Se realizó una colecta de diferentes tejidos de palmas en campo en Tecoman Colima en el vivero y las zonas aledañas del rancho “La Curva”.

En las zonas aledañas del vivero se tomó una distancia de 10 km para recolectar muestras de palmas sintomáticas y asintomáticas para realizar una detección del fitoplasma en las muestras recolectadas. Se recolectaron ocho muestras (Norte, Sur, Este y Oeste) de tejidos de tronco y hojas para el análisis. En el vivero un total de 56 muestras de hojas fueron recolectadas y analizadas para la presencia del fitoplasma de ALC. De estas muestras 31 son provenientes de la cama de germinación y 26 de las plantas fueron embolsadas del mismo vivero.

En el caso de la Huerta Madre que está ubicada en Colima también se realizaron colectas de muestras de hojas de diez palmas para la detección de ALC y asegurar la ausencia del fitoplasmas en estas palmas, debido a que son usadas como la fuente de explantes (embriones) para los cultivos *In vitro* y las semillas se recolectan para su propagación natural en el rancho “La Curva” Tecoman Colima.

2.2.3 Colecta de callos embriogénicos y hojas de plantas *in vitro*

Los callos embriogénicos y las hojas de plantas de cultivo *in vitro* provinieron del banco de germoplasma del laboratorio de Micropropagación de Cocotero de CICY. Los callos embriogénicos utilizados en este estudio fueron de los eco tipos Alto pacifico mexicano descendientes de Michoacán (M1 150-19) y Colima (C2 35) y los Enanos malayo verde (EMV F15-P7) con sesenta callos embriogénicos representado cada línea y un total de ciento ochenta callos embriogénicos analizados en total.

Las hojas de las plantas provenientes de cultivo *In vitro* fueron colectadas al momento de realizar el mantenimiento de las mismas, sepárandolas cuidadosamente con un bisturí. Se colectaron y analizaron 100 hojas: 60 de la línea de Michoacán y 40 de Colima.

Las colectas de estos materiales se basaron en sus grados de resistencia a la enfermedad de ALC que fueron evaluados y comprobados por Zizumbo *et al.*, (2008) además, en su uso en el intercambio de germoplasma de cocotero con diferentes países.

2.2.4 Extracción del ADN empleando el método de (CTAB)

El procedimiento empleado para la extracción de ácidos nucleicos fue el método de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) descrito por Doyle, J., y Doyle. (1990) y modificado por Harrison *et al.* (1994) para la detección y diagnóstico del ALC. Se pesó cada muestra de los callos embriogénicos, se envolvieron en papel aluminio y se sumergieron en nitrógeno líquido. Cada muestra individual se pulverizó en un y posteriormente se transfirió a un tubo de 1.5 mL donde se adicionaron 300 µL de tampón CTAB y β-mercaptoethanol. Las muestras se incubaron a 64 °C durante una hora y se enfriaron a temperatura ambiente. El CTAB se removió mediante lavados con volúmenes iguales de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25: 24: 1 v/v/v) y con una centrifugación a 14000 rpm durante 10 min. Se recuperó el sobrenadante y se realizó un segundo lavado con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1 v/v). Los ácidos nucleicos totales se precipitaron mediante la adición de isopropanol frío y acetato de sodio, se incubaron por una hora a -20°C, y se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se retiró y el ácido nucleico se lavó con etanol al 70%. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 50 µL de tampón TE (Tris 1 mM, EDTA 0.1 mM, pH 8) y las muestras se almacenaron a -20 °C

El procedimiento de extracción fue modificado dependiendo del tejido a extraer: callos embriogénicos (0.10 g), hojas de plántulas micropropagada (0.5 g), hojas y tallo de las muestras provenientes del campo (1g).

Una vez finalizado el proceso de extracción, se determinó la concentración, calidad y la presencia de sustancias inhibitorias en las muestras del ADN extraído.

2.2.5 Amplificación del gen 18s

Se realizó una prueba de inhibición a las muestras extraídas empleando el método de CTAB, para asegurar que las muestras no contenían sustancias inhibitorias. Esta prueba se basó en la utilización de la sonda 18S, que es el método más usado para detectar la presencia de sustancias inhibitorias en las muestras de ADN. Para ello, se eligieron al azar diferentes muestras del ADN de los callos embrionarios y de las hojas de cultivos *in vitro* y se realizaron diluciones de 1:10 individualmente. De estas diluciones se tomó 1 µL como ADN templado. Como templado negativo se usó agua. Las reacciones se realizaron en volúmenes de 20 µL conteniendo cada uno 10 µL de master mix TaqMan, 8.7 µL de agua, 0.3 µL de sonda (18S) y 1 µL de ADN. La amplificación se realizó con un sistema de PCR en tiempo real Rotor-Gene Q (QIAGEN), con tres ciclos: 2 min a 50 °C para activar al AmpErase UNG, 10 min a 95 °C para activar la polimerasa AmpliTaq Gold DNA seguido por 40 ciclos a 95 °C durante 15 segundos y 1 min a 61 °C. Los valores de ciclo umbral (Ct) de cada reacción de PCR se establecieron manualmente para intersectar la fase exponencial de las curvas de amplificación, pero la línea de base fue ajustada automáticamente por el software de gestión de CFX IQ (Bio-Rad, EE. UU.)

2.2.6 Detección por PCR tiempo real

La detección del fitoplasma fue realizado por PCR en tiempo real, según el método descrito por Córdova *et al.* (2014) con algunas modificaciones: las reacciones se realizaron en volúmenes de 20 µL conteniendo cada uno 10 µL de master mix TaqMan, 8.5 µL de agua, 0.5 µL de sonda (LY16 Córdova *et al.* 2014) y 1 µL de ADN. La amplificación se realizó como se describió en el acápite anterior. Los valores de ciclo umbral (Ct) de cada reacción de PCR se establecieron manualmente para intersectar la fase exponencial de las curvas de amplificación, pero la línea de base fue ajustada automáticamente por el software de gestión de CFX IQ (Bio-Rad, EE. UU.) La detección se realizó en lotes de veinte muestras por análisis. Se utilizó agua como control negativo y como control positivo muestras de palmas identificadas positivamente a fitoplasmas en campo y luego por PCR/Tiempo real.

De acuerdo con los resultados obtenidos de la curva estándar establecida por Nic-Matos *et al.* (2018, datos no publicados), los valores de $Ct \leq 35$ se consideran como positivos y valores ≥ 36 se consideran como negativos.

2.2.7 Curva estándar para determinar eficiencia de la sonda ly16 por PCR tiempo real

Se estableció una curva estándar, para determinar la eficiencia de la sonda empleada para la amplificación de los productos obtenidos en este trabajo. Para esto, se tomó una muestra positiva al AL conocida, y se hicieron diluciones de 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000, 1:1000000, 1:10000000 y 1:100000000 de manera triplicada. Las reacciones se llevaron a cabo en volúmenes de 20 µl conteniendo cada uno 10 µl de TaqMan máster mix, 8.5 µl de agua, 0.5 µl de sonda (LY16 Córdova et al 2014) y 1 µl de ADN. La amplificación se realizó con un sistema de PCR en tiempo real, empleando el equipo Rotor-Gene Q (QIAGEN) bajo las mismas condiciones utilizado para la reacción del PCR en tiempo real.

La eficiencia de la reacción de la PCR se calcula utilizando una “curva” proveniente de la amplificación de una dilución serial de un estándar. Los valores de Ct de las curvas obtenidas se grafican contra el logaritmo del factor de dilución del número de copias del molde o de la concentración de la muestra. La recta está descrita por la siguiente ecuación: $Ct = k \log (N_0) + Ct (1)$; donde Ct (1), que la ordenada al origen corresponde a una dilución del estándar que contiene una sola molécula del ADN blanco. La eficiencia de la reacción se calcula con la siguiente fórmula: $E = 10^{-1/k} - 1$. Cuando la pendiente (k) de la recta obtenida es cercana o igual a -3.32, la eficiencia de la amplificación es igual a 100% (Aguilera et al., 2014).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Identificación de focos del ALC

Los oficiales de Sanidad Vegetal en Colima confirmaron la ausencia de plantas sintomáticas de ALC en el área. El informe se adjunta a este trabajo de investigación.

2.3.2 Extracción del ADN

La extracción de ADN empleando el método de CTAB resultó en la obtención de altas cantidades de ADN; sin embargo, se observó la presencia de residuos desconocidos en algunos de los pozos del gel de agarosa. Además, se observó una alta cantidad de ARN en las muestras extraídas utilizando el método de extracción de Doyle y Doyle 1990. Debido a estas observaciones se realizó una prueba de inhibición.

2.3.3 Amplificación del gen 18s

Se realizó la amplificación del gen 18S en los ADN's obtenido empleando el método de CTAB para determinar si las muestras estaban libres de agentes o sustancias inhibitorias. Los resultados obtenidos indican que en las muestras de ADN de los callos embriogénicos y las hojas de plantas micropropagadas; empleando el método de extracción de CTAB y la técnica de PCR Tiempo-Real usando la sonda 18S no presenta sustancias ni agentes inhibitorias (Cuadro 2.1), indicando que todas las muestras de los callos embriogénicos y las hojas de plantas micropropagadas conforman el mismo gen constitutivo 18S.

Cuadro 2.1. Amplificación del gen 18s en las muestras de ADN de los callos embriogénicos y hojas de plántulas de cocotero micropropagados extraído por el método de CTAB.

Tejidos evaluados	Muestras evaluadas	Muestras con amplificación del gen 18S	Rango de valor Ct*	Control positivo	Control negativo
Callos embriogénicos	10	10/10	20.51-23.23	(+)	(-)
Hojas de plantas provenientes del cultivo <i>in vitro</i>	10	10/10	22.61-28.69	(+)	(-)

2.3.4 Curva estándar para determinar eficiencia de la sonda ly16 por PCR tiempo real

La figura 2.1 A y B muestran la pérdida de la linealidad de las muestras a partir de un valor de Ct de 35 indicando que la sonda LY16 detecta el fitoplasma de ALC hasta un valor de Ct a 35 en diluciones de 10^{-5} (figura 2.1 A). La figura 2.1. B muestra la linealidad de la curva obtenida a partir de los valores del Ct vs diluciones. Además, presenta los valores de la pendiente con -3.25 y un valor de eficiencia de 102%. Asimismo, se obtuvo un valor de R^2 de 0.99.

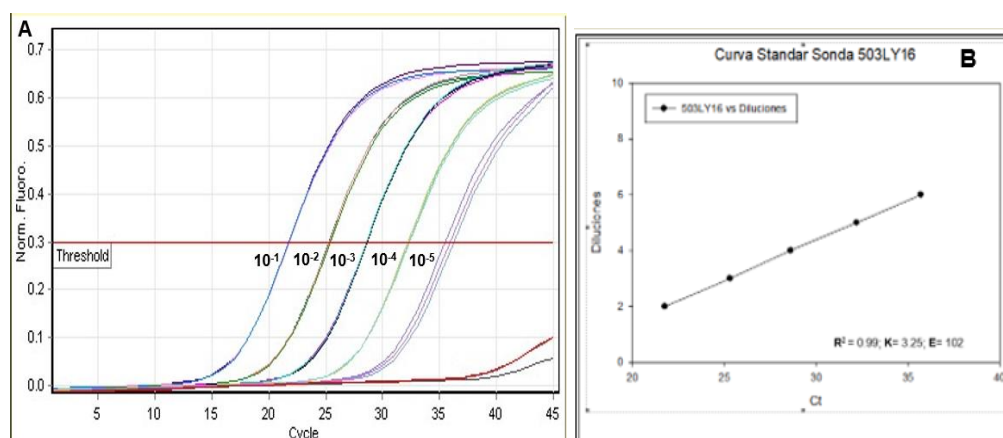


Figura 2.1. Curva estándar. A) Curva estándar de amplificación. Esta imagen muestra la amplificación de una serie de diluciones para determinar la eficiencia de la sonda LY. La curva se produce al graficar el promedio de los Cts obtenidos de

cada uno de los triplicados. B) Se observa el valor de $R^2:0.99$, con una eficiencia de E: 102.

2.3.5 Indexación del fitoplasma de ALC en el banco de germoplasma de cocotero *in vitro* y campo (“rancho la curva”)

La indexación del fitoplasma del ALC en los callos embriogénicos y las hojas de plántulas de cocotero provenientes del cultivo *in vitro* realizados por PCR-Tiempo Real reveló la ausencia del fitoplasma de ALC en los tejidos analizados (Cuadro 2.3).

Cuadro 2.2. Indexación del fitoplasma de ALC en las muestras de cocotero proveniente del cultivo *in vitro*.

Área Muestreada	Línea evaluadas	Muestras evaluadas	Muestras con detección positiva	Control positivo	Control negativo
Cultivos <i>in vitro</i> (Laboratorio de cocotero CICY)	Callos embriogénicos	180	0/180	(+)	(-)
	Hojas de plantas micropropagadas	100	0/100	(+)	(-)

Valores ≤ 35 positivos; valores ≥ 36 negativos

La indexación del fitoplasma de ALC (Cuadro 2.3) muestra la ausencia de este en todas las muestras analizadas, lo que corrobora su ausencia en el rancho “La Curva”.

Cuadro 2. 3. Indexación del fitoplasma de ALC en las muestras de cocotero proveniente del rancho “LA CURVA”.

Área Muestreada	Línea evaluadas	Muestras evaluadas	Muestras con detección positiva	Control positivo	Control negativo
En Campo (Rancho: “LA CURVA”)	Huerta Madre	10	0/10	(+)	(-)
	Altos Pacíficos 2 (Micropropagadas establecidas en campo)	10	0/10	(+)	(-)
	Vivero (Plantas en cama de germinación)	31	0/31	(+)	(-)
	Vivero (Plantas en Bolsas)	25	0/25	(+)	(-)
	Muestras en la zona periférico	8	0/8	(+)	(-)

Valores ≤ 35 positivos; valores ≥ 36 negativos

2.2 DISCUSIÓN

La propagación y diseminación de cocoteros libres del fitoplasmas de ALC es una prioridad para poder realizar un intercambio de germoplasma dentro o fuera de un país. Por lo tanto, es indispensable contar con herramientas/o métodos de detección precisos del fitoplasma de ALC. Uno de los métodos más usados hoy en día es la indexación. La indexación es el proceso de evaluación o selección de material vegetal para la detección de la presencia de una plaga o patógeno. Esto puede implicar una evaluación visual de una enfermedad o patógeno/plaga, ya sea con la ayuda de un microscopio o una prueba de laboratorio, para demostrar la presencia del patógeno. La indexación implica la realización de una evaluación de la presencia de un patógeno o plaga vegetal en particular. Incluso cuando se demuestra que el material de reproducción inicial está libre de la plaga/patógeno en cuestión, normalmente es necesario que se compruebe regularmente durante la multiplicación para asegurar que la plaga/patógeno e interés no ha sido reintroducido (Stead *et al.*, 1999).

La técnica de detección del amarillamiento letal más empleada es la detección por PCR en tiempo real. Este método posee muchas ventajas con respecto a la PCR convencional en términos de precisión, rango dinámico, tiempo de análisis corto, alta capacidad de automatización y ausencia de manipulaciones posteriores a la PCR que evitan la contaminación por arrastre (Higuchi *et al.*, 1993; Schaad y Frederick, 2002; Córdova *et al.*, 2014). Además de la tremenda sensibilidad de la PCR en Tiempo Real, esta permite desarrollar estrategias prácticas de muestreo para la indexación rutinaria de palmas para la detección de infección por el fitoplasma de ALC. Por lo tanto, tiene relevancia para el desarrollo de programas orientados al servicio tales como los que se ocupan de la salud de las plantas y el mejoramiento de las plantas (Harrison *et al.*, 1995) y por lo que este método fue empleado en este trabajo. A pesar de todas las ventajas que posee la técnica de detección por PCR en tiempo real es muy importante determinar la eficiencia de amplificación y que tan reproducible son las reacciones de PCR. Resultados obtenidos en este trabajo de investigación muestra que nuestro ensayo de PCR Tiempo Real fue reproducible y eficiente con un valor de R^2 de 0.99 y eficiencia de 102% respectivamente. Applied Biosystems (2004) y Rodríguez *et al.*, (2004) plantearon que un R^2 igual a 1 significa un ajuste lineal perfecto y con un valor <0.99 , la precisión de los datos es cuestionable. La eficiencia de la amplificación por PCR es la velocidad a la que se genera un amplicón de PCR, comúnmente expresado como un valor porcentual. Si un amplicón

de PCR particular se duplica en cantidad durante la fase geométrica de su amplificación por PCR, entonces el ensayo de PCR tiene una eficacia del 100%. Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos donde el valor de eficiencia fue de 102%

El valor de la pendiente fue de -3.25 indicando una buena eficiencia de amplificación Applied Biosystems indican que “La pendiente de una curva estándar se usa comúnmente para estimar la eficiencia de amplificación de PCR de una reacción de PCR en tiempo real. Una curva estándar de PCR en tiempo real se representa gráficamente como una gráfica de línea de regresión semi logarítmica de valor de Ct frente a log de ácido nucleico de entrada. Una pendiente de curva estándar de -3,32 indica una reacción de PCR con una eficacia del 100%. Las pendientes más negativas que -3.32 (por ejemplo, -3.9) indican reacciones que son menos del 100% de eficiencia. Las pendientes más positivas que -3.32 (por ejemplo, -2.5) pueden indicar problemas en la calidad de la muestra o el pipeteo”.

Se observó la pérdida de la linealidad de la curva estándar a partir de los valores de Ct por encima de 35. Esta pérdida de la linealidad permitió saber, que la sonda LY16 no puede detectar fitoplasmas de ALC a partir del valor de Ct 35 con una dilución de 10^{-5} , por lo tanto, una muestra se considera positiva si tiene un valor de Ct menor o igual a 35 y negativas a las muestras que presenten un valor de Ct mayor o igual a 36. A pesar de que la sonda LY16 no detectó fitoplasma de ALC en diluciones de 10^{-8} , es difícil encontrar fitoplasmas tan diluido en un tejido de cocotero. También en Applied Biosystems, (2004) propusieron que es importante tener en cuenta que, debido a la distribución estadística, siempre hay un alto nivel de variación de Ct cuando las cantidades objetivo se aproximan a una copia única. Por lo tanto, las masas de muestra que producen valores Ct en este rango (valores de Ct de 35 - 40) inevitablemente presentarán una menor precisión y, en consecuencia, una menor potencia para detectar cambios de bajo rugosidad.

Para poder realizar una detección adecuada y verdadera por PCR en tiempo real es necesaria la obtención de ADNs genómicos de buena calidad. El método de extracción de ADN empleado en este trabajo fue el método de bromuro de cetil-trimetil-amonio (CTAB) descrito por Doyle, J., y Doyle, (1990) y modificado por Harrison *et al.*, (1994) siendo el método más utilizado para extracción del ADN en muestras de cocotero debido a la cantidad de ADN obtenido con este método. Sin embargo, el método de CTAB a pesar de ser muy utilizado para la extracción de ADN de otros tejidos de coco (tronco y hojas) nunca había sido utilizado para la extracción del ADN en callos embriogénicos. Se reporta por primera vez con resultados valiosos el uso de dicha metodología para la extracción de

ADN en callos embriogénicos de cocoteros. Los resultados obtenidos comprobaron que el método de CTAB es adecuado para su implementación en la extracción de ADN en callos embriogénicos debido a que las muestras no presentaban sustancias inhibitorias (Cuadro 2.1).

Basado en la sensibilidad y especificidad de la máquina y reacción del PCR en tiempo real, es necesaria la obtención del ADN libre de sustancias inhibitorias para evitar la obtención de falso negativos. La prueba de inhibición utilizada en este trabajo indico la ausencia de sustancias inhibitorias en las muestras del ADNs extraídos (callos embriogénicos y hojas). El uso de la sonda 18S es muy empleado para la detección de sustancias inhibitorias en diferentes muestras gracias a su gran nivel de especificidad para la amplificación del gen 18S ribosomal que se encuentra ampliamente distribuido en las células eucariotas. Los resultados del cuadro 2.2 corroboran esta teoría con los resultados positivos obtenidos indicando la ausencia de sustancias inhibitorias. Contrariamente, resultados negativos indican la presencia de sustancias inhibitorias.

La prueba de inhibición, un buen método para la extracción de ADN y establecimiento de la curva estándar son detalles importantes para asegurar que nuestro método de indexación y/o diagnóstico sea reproducible. Stead *et al.*, (1999) mencionaron que “los métodos de diagnóstico utilizados deben ser tan baratos y rápidos como sea posible, pero lo más importante es que sean específicos, sensibles, reproducibles y, a menudo, requieren cuantificación más que por simple presencia o ausencia”. Por lo tanto, la técnica PCR en tiempo real y el método de extracción CTAB fueron empleados en este trabajo.

Además, de tener un método de indexación eficiente, es necesaria la determinación del momento ideal para la indexación del fitoplasmas del ALC en las plantas de cocotero micropropagadas, ya que es un aspecto fundamental para la generación de plantas indexadas. Los callos embriogénicos y las hojas de plantas de cultivos *In vitro* analizados empleando la técnica de PCR en tiempo real resultaron negativos (Cuadro 2.3 y 2.4) a la presencia del fitoplasma de ALC indicando la ausencia del fitoplasmas de ALC en las plántulas de cocoteros micropropagados en el laboratorio de micropropagación del Centro de Investigación Científica de Yucatán. Estos resultados fueron esperados ya que a pesar de no haber realizado el análisis de detección del fitoplasma de ALC en los tejidos (explantes de plúmulas) antes que se introdujeron al cultivo *in vitro* sabemos que los embriones que se introdujeron a cultivo *in vitro* fueron colectados de plantas sanas que no

fueron afectadas por ALC y hasta la fecha siguen vivas. Además, esta teoría fue confirmada con los resultados negativos obtenidos de la huerta madre donde algunos de los embriones fueron recolectados (Cuadro 2.4).

Los resultados de la indexación de las muestras obtenidas de la huerta madre resultaron ser negativas a la presencia del fitoplasma de ALC. Este hecho coincide con los resultados obtenidos de los callos embriogénicos, las hojas de plantas provenientes a cultivo *In Vitro* y las plantas producidas en el rancho “LA CURVA” por medio de propagación natural, debido a que los materiales utilizados para su propagación (*In vitro* y en campo) son provenientes de esa huerta madre y su resistencia a la enfermedad ALC fue comprobada por Zizumbo *et al.*, (2008).

A pesar de que los tejidos (callos embriogénicos, hojas de plantas del cultivo *in vitro* (cuadro 2.3), muestras de la zona aledaña, la huerta madre y del vivero (cuadro 2.5)) analizados son de plantas madres libre del fitoplasma y resistentes al fitoplasma de ALC es necesario realizar el proceso de indexación para asegurar que estas palmas producidas se mantengan libres del patógeno y que el patógeno no sea introducido en el proceso de micropropagación ni por la propagación natural. Stead *et al.*, (1999) indicaron la necesidad de verificar regularmente durante la multiplicación que la plaga/patógeno en estudio no ha sido reintroducido al sistema de propagación. Se considera que la implementación del método de indexación usando la técnica de PCR en tiempo real es crucial para un diagnóstico preciso.

Los resultados obtenidos en este capítulo indican que las plantas producidas en el laboratorio de micropropagación de cocotero del CICY y el rancho “LA CURVA” puede ser considerado como plantas indexadas y/o certificadas indicando su utilidad en el intercambio de germoplasma de cocotero con países de interés y con estados de interés en México.

Es importante destacar que hoy en día no existe un método de indexación para el fitoplasma de ALC, sin embargo, autores como Conci *et al.*, (2016) han reportado la utilización del método de PCR Tiempo-Real para la detección de los fitoplasmas Argentina Strawberry filodia (ASP) y la hoja roja de fresa (StrawRL) y la utilización de los métodos de cultivo *in vitro* para su eliminación. La indexación es muy utilizada para la detección y eliminación de virus en varios cultivos como caña de azúcar (Adilakshmi *et al.*, 2016), virus Cítricos (Hyun *et al.*, 2017) y Virus de la pudrición foliar del coco (CFDV) (Diekmann, 2005) entre otros. Sin embargo, es muy importante la inclusión del método de indexación utilizando la técnica de PCR/Tiempo-Real para el movimiento seguro del germoplasma de

cocotero (*ex situ*) garantizando un intercambio adecuado minimizando el riesgo de transferencia del fitoplasma de ALC. Por lo tanto, consideramos a este protocolo como una herramienta significativa que debe ser implementado en cualquier sistema de propagación ya sea con o sin intención de realizar un intercambio de germoplasma de cocotero para tener un control adecuado de la enfermedad. Es imperativo recordar que un sistema fitosanitario efectivo actúa como un filtro y no como una barrera para el intercambio de germoplasma de cocotero (Diekmann, 2005).

CAPÍTULO III

EVALUACIÓN DE LA PERMANENCIA DEL FITOPLASMA DE ALC EN LA CADENA DE MICROPROPAGACIÓN

3.1 INTRODUCCIÓN

Los fitoplasmas, anteriormente denominado organismo tipo micoplasma (MLO), son bacterias procariotas diminutos sin paredes celulares, con un tamaño menor, imposibles de aislar y cultivarse en medios artificiales y están reportados en asociación con numerosos cultivos de gran importancia (Bertaccini, 2007). Muchas de las enfermedades económicamente importantes pertenecen a las plantas leñosas, que incluyen al ALC (Mejía, 2014).

ALC es una enfermedad asociada con fitoplasmas que ha destruido una gran cantidad de cocoteros en partes de América Latina, el Caribe y África (Ntushello *et al* 2013). Debido a que las fitoplasmas habitan en las células cribosas del floema, su infección provoca alteraciones severas en el balance de fitohormonas y reguladores de crecimiento, excitando con ello diferentes sintomatologías (Reveles-Torres *et al.*, 2014) como: la caída prematura de frutos tanto madura como no desarrollada, necrosis de las inflorescencias, amarillamiento de las hojas maduras hacia las más jóvenes y las hojas eventualmente caen y queda únicamente el tallo (McCoy *et al.*, 1982).

A pesar de muchos años de investigaciones hasta la fecha no existe un remedio para esta enfermedad señalando que su principal forma de transmisión es mediante vectores (Howard *et al.*, 1983) y recientemente Sáenz *et al.*, (2017) han corroborado la transmisión del fitoplasma de ALC mediante semillas. La única forma para combatir a esta enfermedad es mediante la identificación de materiales resistente y la micropropagación de dichos materiales identificado para posteriormente utilizarlos en la plantación y para sostener la demanda actual del cultivo. Recientemente se ha desarrollado un protocolo de propagación masiva, comenzando con explantes de plumas, en el proceso de embriogénesis somática a través la producción de callos embriogénicos y su multiplicación, con rendimientos estimados de 100,000 embriones somáticos por explante (Pérez-Núñez *et al.*, 2006). Este protocolo actualmente se está aplicando en México, para la propagación de plantas seleccionadas a partir de semillas, obtenidas mediante polinización controlada. Sin embargo, no es útil para la propagación de las palmas

híbridas utilizando su semilla debido a la segregación (Namboothiri *et al.*, 2008). Basado en estas observaciones Sandoval-Cacino *et al.*, (2016) han desarrollado un protocolo para la propagación masiva de cocotero utilizando explantes de Rachilla de inflorescencias inmaduras, lo que permite la clonación de palmas frutales con características deseadas. Además, de ser utilizado para la micro producción de plantas híbridas sería una nueva vía para propagar palmas de coco usando otro tipo de explante. Debido a este nuevo protocolo y la posibilidad de transferencia del fitoplasma de ALC por semillas surgió la necesidad de determinar la transmisibilidad del fitoplasma de ALC en las cadenas de micropropagación, partiendo de un explante positivo a ALC y de no persiste el fitoplasma en las cadenas de micropropagación, se podrían producir plantas susceptibles para fines de investigación. Asimismo, este nuevo protocolo formaría parte del proceso de indexación del fitoplasma de ALC asegurando la producción de materiales libres del fitoplasma de ALC.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Colecta de muestras para el análisis molecular

Se realizó una colecta de inflorescencias de una palma identificada positivamente a ALC en San Crisanto de la costa de Yucatán. Las Inflorescencias de una palma (G-8-3) tratada, tres meses antes, con antibiótico fueron colectadas. Las inflorescencias fueron colectadas y enumeradas siguiendo el protocolo descrito por Perera *et al.* (2010) identificando la inflorescencia abierta más joven como etapa 0, las etapas de madurez de proceso fueron designadas como -1, -2, -3 hasta la -12 donde la la inflorescencia -1 correspondió a la inflorescencia más madura que se abriría a continuación. El -1 siendo la más madura y el -12 la fase más inmadura. Las inflorescencias -11 y -12 no se reflejan en la figura 3.1 debido a que fueron desinfectadas inmediatamente y guardado en cooler para ser transportado al laboratorio para ser sometido a cultivo *in vitro*. Sin embargo, solo se usó la inflorescencia -12 de la palma G-8-3, como explante para ser sometido a cultivo *in vitro* y evaluar la permanencia del fitoplasma de ALC en la cadena de micropropagación por embriogénesis somática debido al tener al tamaño adecuado (10cm). Sandoval-Cancino *et al.* (2016) estableció que las mejores respuestas de inducción se dan con inflorescencias de tamaños 10 cm.



Figura 3.1. Inflorescencias de la palma de cocotero G-8-3 tratada con antibiótico.

3.2.2 Formación de callos embriogénicos partiendo de un explante (inflorescencias) positivas a ALC

La inflorescencia -12 de la palma G-8-3 fue sometido a cultivo *in vitro* siguiendo al protocolo de Sandoval-Cancino *et al.* (2016) donde se evaluó la permanencia del fitoplasma de ALC en los ejidos que no respondieron al completar su ciclo de micropropagación por embriogénesis somática. Al momento de ser sembrada o subcultivados en la primera y segunda ciclos de resiembra, se analizó el tejido completo (callo embriogénico, el tejido restante de los callos embriogénicos) para determinar si el fitoplasma se persiste en el tejido. Además, se tomó en cuenta la cantidad de muestras que formo callos embriogénicos, los que fueron esponjosos y los que no respondieron con la finalidad de establecer si un explante enferma afectaría el proceso de formación de los callos embriogénicos y sus diferentes fases.

3.2.3 Extracción del ADN empleando el método de (CTAB)

El procedimiento empleado para la extracción de ácidos nucleicos fue el método de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) descrito por Doyle, J., y Doyle. (1990) y modificado por Harrison *et al.* (1994) para la detección y diagnóstico del ALC. Se pesó 1g de cada muestra de las inflorescencias y se pulverizaron con la ayuda del nitrógeno líquido. Cada muestra individual se pulverizó en un y posteriormente se transfirió a un tubo de 2 mL donde se adicionaron 5 mL de tampón CTAB y β -mercaptoethanol. Las muestras se incubaron a 64 °C durante una hora y se enfriaron a temperatura ambiente. El CTAB se removió mediante lavados con volúmenes iguales de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25: 24: 1 v/v/v) y con una centrifugación a 14000 rpm durante 10 min. Se recuperó el sobrenadante y se realizó un segundo lavado con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1 v/v). Los ácidos nucleicos totales se precipitaron mediante la adición de isopropanol frío y acetato de sodio, se incubaron por una hora a -20oC, y se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se retiró y el ácido nucleico se lavó con etanol al 70%. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 50 μ L de tampón TE (Tris 1 mM, EDTA 0.1 mM, pH 8) y las muestras se almacenaron a -20 oC

El procedimiento de extracción fue modificado dependiendo del tejido a extraer: callos embriogénicos (0.10 g), hojas de plántulas micropropagada (0.5 g), hojas y tallo de las muestras provenientes del campo (1g).

Una vez finalizado el proceso de extracción, se determinó la concentración, calidad y la presencia de sustancias inhibitorias en las muestras del ADN extraído.

3.2.4 Amplificación del gen 18s en los tejidos de callos provenientes de un explante positivo a ALC

Se realizó una amplificación del gen 18s en los tejidos de callos provenientes de un explante positivo a ALC a las muestras extraídas empleando el método de CTAB para asegurar que las muestras no contenían sustancias inhibitorias. Esta prueba se basó en la utilización de la sonda 18S que es el método más usado para detectar la presencia de sustancias inhibitorias en las muestras de ADN y se procedió de la misma manera del capítulo 11

3.2.5 Detección por PCR tiempo real

La detección del fitoplasma en los diferentes estadios de las inflorescencias colectada y en los tejidos de callos obtenidos de un explante positivo a ALC fueron realizado empleando el método de en PCR Tiempo Real, método descrito por Córdova et al. (2014) con algunas modificaciones. Las reacciones se realizaron en volúmenes de 20 μ L conteniendo cada uno 10 μ L de TaqMan máster mix, 8.5 μ L de agua, 0.5 μ L de sonda (LY16) y 1 μ L de ADN. La amplificación se realizó con un sistema de PCR en tiempo real Rotor-Gene Q (QIAGEN). La PCR se inició con tres ciclos: 2 min a 50 °C para activar AmpErase UNG, 10 min a 95 °C para activar AmpliTaq Gold DNA polimerasa seguido por 35 ciclos a 95 °C durante 15 segundos y 1 min a 61 °C. Los valores de ciclo umbral (Ct) de cada reacción de PCR se establecieron manualmente para intersectar la fase exponencial de las curvas de amplificación, pero la línea de base fue ajustada automáticamente por el software de gestión de CFX IQ (Bio-Rad, EE. UU.) Se utilizó agua como control negativo y como control positivo muestras de palmas que fueron identificadas positivamente en campo y luego por PCR- Tiempo real posteriormente. Valores ≤ 35 se considera como positivo y valores ≥ 36 se considera como negativos. Estas consideraciones fueron tomado basado en los resultados obtenido de la curva estándar establecido por Matos et al (CICY unpublished data).

3.2.6 Aplicación de antibiótico

La palma G-8-3 fue identificada con síntomas de ALC y luego comprobada por PCR en Tiempo-Real a ser positivo a la presencia del fitoplasma de AL. Se aplicó un gramo de oxitetraciclina con la ayuda de una jeringa y un taladro para mantener la palma viva hasta el momento de colectar las inflorescencias. Después tres meses las inflorescencias fueron colectadas y sometidas en cultivo *in vitro*.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Colecta de muestras para el análisis molecular

Los resultados obtenidos de este análisis revelaron la presencia del fitoplasma del ALC en todos los diferentes estadios de las inflorescencias colectadas de la palma de cocotero G-8-3 desde el estado -5 al -12 (Cuadro 3.1.).

Cuadro 3.1. Detección de fitoplasmas de ALC en inflorescencias de la palma G-8-3 tratado con antibiótico.

Estadio de desarrollo de inflorescencia	Detección	Control positivo	Control Negativo
-5	(+)	(+)	(-)
-6	(+)		
-7	(+)		
-8	(+)		
-9	(+)		
-10	(+)		
-11	(+)		
-12 *	(+)		

*: Inflorescencia sometida a cultivo *in vitro*. Valores ≤ 35 positivos; valores ≥ 36 negativos.

La inflorescencia -12 fue detectado positivamente a la presencia de fitoplasma de ALC y fue sometido a cultivo a *in vitro* para la determinación si el fitoplasma de ALC es transmisible en cultivo *in vitro*.

3.3.2 Amplificación del gen 18s en los tejidos de callos provenientes de un explante positivo a ALC

Se amplificó el gen constitutivo 18S en las muestras de los tejidos provenientes de un explante positivo a ALC indicando la ausencia de sustancias inhibitorias en las muestras del ADN obtenido. Estos resultados se reflejan en el cuadro 3.2 donde las muestras analizadas en los tres diferentes ciclos se amplifico el gen 18S.

Cuadro 3. 2. Amplificación del gen 18s en los tejidos de callos provenientes de un explante positivo a ALC en los tres ciclos.

Ciclos de Cultivo	Muestras evaluadas	Muestras con amplificación del gen 18S	Control positivo	Control negativo
1	6	6/6	(+)	(-)
2	11	11/11	(+)	(-)
3	10	10/10	(+)	(-)

3.3.3 Características de los callos obtenido a partir de un explante positivo a ALC

Se observó que el uso de la inflorescencia -12 como explante para la inducción de embriogénesis somática fue apropiado basado en las diferentes estructuras obtenidas. A final del periodo del primero ciclo de cultivo (90 días) se observó que la mayoría de los tejidos formo callos necróticos figura 3.3 A y callos esponjosos figura 3.3 B. Mientras que en el segundo ciclo figura 3.3. C and el tercer ciclo figura 3.3 D se observó la formación de callos con estructuras embriogénicas.

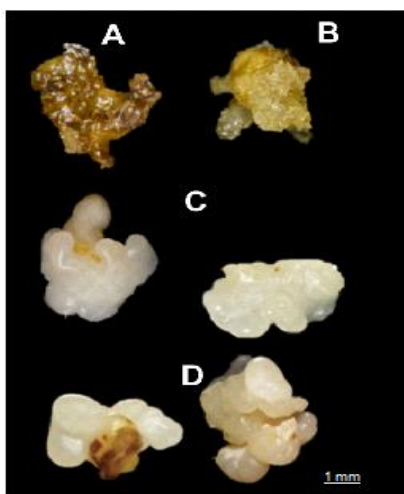


Figura 3.2. Características de los callos obtenidos del explante positivo a ALC durante la embriogénesis somática en cocotero A Callo necrótico B Callo esponjoso, C callos con estructuras embriogénicas obtenidos en el segundo ciclo D Callos con estructuras embriogénicas obtenidos en el tercer ciclo.

Se formaron callos necróticos, esponjosos y callos con estructuras embriogénicas en los tres ciclos; sin embargo, se observó un mayor porcentaje (37.3) de callos necrosados en el primer ciclo comparado con el segundo (0%) y tercero (9%) cuadro 3.5. Además, se observó que en el primer ciclo partiendo de explantes de rebanadas de inflorescencias 9 % de las estructuras sometido a cultivo *in vitro* respondió produciendo callos embriogénicos y los demás respondieron formando callos esponjosos y necrosados (53.1% y 37.3%). Las estructuras embriogénicas de los callos embriogénicos obtenidos en el primer ciclo fueron utilizados como explantes para la generación de más callos embriogénicos en los siguientes ciclos resultando en un incremento de callos embriogénicos el 9% en el primer ciclo hasta el 50.2 % en el tercer ciclo (cuadro 3.5). Estos callos embriogénicos con estructuras embriogénicas están actualmente en cultivo *in vitro* para la formación de embriones somáticos con estructuras embriogénicas que es la fase de embriogénesis somática que sigue. Es importante recordar que no todos los explantes sometidos a cultivo *in vitro* son capaces de dar respuestas embriogénicas y por eso se da contabilidad para los callos esponjosos y necrosados.

Cuadro 3.3. Formación de callo embriogénico a partir de una inflorescencia proveniente de una palma enferma.

Ciclos de Cultivo	Explantes de rachilla cultivados	Respuesta					
		Callos embriogénicos		Callos esponjosos		Callos necrosados	
		n	%	n	%	n	%
1	Rebanadas de inflorescencia	45	9	252	53.1	177	37.3
2	Estructuras Embriogénicas	89	45.1	108	54.8	0	0
3	Estructuras Embriogénicas	103	50.2	83	40.4	19	9.2

3.3.4. Detección del fitoplasma de ALC en las diferentes estructuras obtenido a partir de un explante positivo a ALC

A pesar de que la inflorescencia -12 repercutió positivo al momento de someterlo a cultivo *in vitro*; al analizar las diferentes estructuras obtenidos en los tres ciclos para la presencia del fitoplasma de ALC todos resultaron a ser negativas al tener la presencia del fitoplasma de ALC (Cuadro 3.4); indicando la eliminación del fitoplasma de ALC en los callos embriogénicos.

Cuadro 3.4. Detección del fitoplasma de ALC en las diferentes estructuras obtenido durante el proceso de embriogénesis somática proveniente una inflorescencia positiva a ALC.

Ciclos de Cultivo	Muestras evaluadas	Muestras con detección positiva	Control positivo	Control negativo
1	6	0/6	(+)	(-)
2	11	0/11	(+)	(-)
3	10	0/10	(+)	(-)

Valores ≤ 35 positivos; valores ≥ 36 negativos

3.4 DISCUSIÓN

La detección del fitoplasma de ALC en explantes de inflorescencias es un proceso adecuado antes y durante el proceso de micropropagación para asegurar la ausencia del fitoplasma de ALC en el sistema de micropropagación por lo que debe incluirse como parte del proceso de indexación en la cadena de micropropagación.

Se reveló la presencia del fitoplasma en los diferentes estadios de la inflorescencia de la palma G-8-3 (Cuadro 3.1) antes de someter el explante (estadio de inflorescencia -12) a cultivo *in vitro*. Parthasarathy, (1974) planteo que los fitoplasmas se mueven de los tejidos de fuente fotosintatos para destruir los tejidos a través del floema. Por lo tanto, los fitoplasmas no serían detectables o serían menos abundantes en los tejidos como las hojas maduras e intermedias, mientras que serían más abundantes y más fácilmente detectables en los tejidos que consumen partes en expansión tales como hojas inmaduras, inflorescencias y raíces vértice, o en el tronco.

Las estructuras embriogénicas generadas a partir de la inflorescencia infectada con el fitoplasma de ALC al final del primer ciclo (90 días) fueron sub cultivado a cultivo *in vitro* para la generación de más tejidos debido a su baja tasa de rendimiento y, además, que es necesario para la obtención de callos completamente embriogénicos. Estos resultados concuerden con Sandoval-Cacino *et al.*, (2016) donde plantearon que el callo embriogénico se puede obtener de los explantes de rachilla, a través de un proceso emplazado de sub cultivar las estructuras embriogénicas, escasas al principio y cada vez más abundantes en los nuevos callos formados, para finalmente obtener callos completamente embriogénicos. Además, mencionaron en su protocolo que después de 90 días de cultivo, se pueden obtener callos consistentes en tejido esponjoso o necrótico similares a los resultados obtenidos en este trabajo.

El porcentaje de los callos embriogénicos generado fue de 9% a 50.2 % (Cuadro 3.5) y coincide con los resultados obtenidos por Sandoval-Cancino *et al.*, (2016) quien obtuvieron un porcentaje de formación de callos inferior al 20% en el primer ciclo de generación de callos embriogénicos y observo un incremento en los diferentes subcultivos realizado de 9.3% a 57.1%. A pesar de que los rendimientos obtenidos de los explantes provenientes de una palma enferma a ALC coinciden con los resultados de Sandoval-Cancino *et al.*, (2016) no se compara a los rendimientos de plúmula, que tuvieron respuestas del 40% o más (Pérez-Núñez *et al.*, 2006). Estos resultados pueden indicar

que un explante (inflorescencias/ rachilla) infectada con ALC puede resultar en el mismo comportamiento como un explante sano lo cual indica la necesidad de realizar el proceso de indexación en todos los tejidos a ser sometido a cultivo *in vitro*.

Las estructuras embriogénicas a los a los 90 días no fueron analizados debido a las pocas estructuras generada sin embargo se analizó los tejidos que no respondieron (necróticos y esponjosos) y estos tejidos se resultaron a ser negativos a la presencia del fitoplasma de ALC. Los tejidos analizados en el segundo a tercer ciclo fueron callos embriogénicos con estructuras embriogénicas y también resultaron a ser negativas a la presencia del fitoplasma de ALC. Estos resultados no fueron esperado debido a reportes recientes por Sáenz *et al.*, 2017 donde alcanzaron por primera vez mostrar la ocurrencia de la transmisión de fitoplasma de ALC en embriones de cocotero a plántulas mediante la germinación *in vitro* de embriones cigóticos de semillas de palmas infectadas con ALC indicando la transmisión del fitoplasma de ALC en semillas partiendo de un tejido enfermo. Sin embargo, Parmessur *et al.*, (2002) obtuvieron resultados similares a los obtenidos en este trabajo, pero en el cultivo de caña de azúcar y propusieron que la eliminación del fitoplasma fue debido a su localización dentro del floema y la falta de conexión entre los embriones somáticos y el floema limitando el movimiento del fitoplasma. Por lo tanto, plántulas regeneradas a partir de los callos están libres de fitoplasma. Sin embargo, se considera realizar más pruebas para poder corroborar esta teoría en el caso de cocotero, asimismo aumentar ensayos con inflorescencia positivas de mayor edad.

Las características de las diferentes estructuras obtenidos durante el proceso de embriogénesis somática en los diferentes ciclos son consistentes con las estructuras obtenidos de Sandoval-Cancino *et al.*, (2016).

Davies *et al.*, (1994) plantearon que las características de crecimiento *in vitro* de las plantas MLO infectadas y sanas fueron muy similares y, por lo tanto, parece posible que la multiplicación de algunas especies de plantas mediante micropropagación, sin pruebas adecuadas pueda resultar involuntariamente en la producción de plantas infectadas. Debido a este planteamiento incluimos el método de indexación en el proceso de micropropagación para asegurar la ausencia o presencia del fitoplasma de ALC en estos tejidos durante el proceso de micropropagación.

CAPÍTULO IV

EVALUACIÓN DE LOS PROTOCOLOS DE ENVÍO Y ACLIMATIZACIÓN DE PLÁNTULAS DE COCOTERO

4.1 INTRODUCCION

Los efectos drásticos de las enfermedades en el crecimiento, y el rendimiento de las plantas, y en los paisajes se pueden ver en diversos hábitats tanto agrícolas como naturales. Pocas enfermedades tienen efectos tan drásticos como los llamados letales, como la enfermedad ALC que mató a millones de palmas de cocotero (Diekmann, 2005). La comunidad de investigadores del cocotero está, por lo tanto, muy consciente de los riesgos que plantean las plagas y los patógenos en ella (Diekmann 2005). Al igual que muchas otras enfermedades de los vegetales ALC se está extendiendo a nuevas áreas, después de las costas del Golfo de México a diferentes partes en la cuenca del Caribe (Ntushello *et al.*, 2013).

Para poder sostener la producción requerida para satisfacer la demanda actual y futura de cocoteros, los países productores de cocotero deben renovar sus plantaciones e incrementar el área de cultivo. Para lograr esto, se requiere un gran número de plantas con germoplasma seleccionado con una alta productividad y resistencia a enfermedades (Solís-Ramos *et al.*, 2012).

La expresión cultivo *in vitro* de plantas, significa cultivar plantas dentro de un frasco de vidrio en un ambiente artificial. La micropropagación o propagación clonal, es una de las aplicaciones más generalizadas del cultivo *in vitro*, a través de la micropropagación, a partir de un fragmento (explante) de una planta madre, se obtiene una descendencia uniforme, con plantas genéticamente idénticas, denominadas clones (Castillo, 2004). La propagación *in vitro* del cultivo cocotero, es una alternativa de entrega de plántulas altamente productiva élite e indexada que puede satisfacer a la demanda existente. Sin embargo, es necesario establecer protocolos de envío y recepción (aclimatación) para asegurar el máximo optimización del material para facilitar el proceso de distribución de germoplasmas, y que actualmente se añora.

4.2 MATERIALES Y METODOS

4.2.1 Evaluación de condiciones de envío

Las *in vitro*-plántulas utilizadas en este experimento son provenientes del laboratorio de micropropagación de cocotero del Centro de Investigación Científica Yucatán AC para evaluar las condiciones de envoltura para el envío de las plántulas de cocotero micropropagada para lo cual se establecieron los siguientes tratamientos: Tiempo cero, siete días y treinta días en el primer ensayo; el segundo ensayo los tratamientos fueron quince días, veinte un días y treinta días señalando que el tiempo cero es el tratamiento de lo cual las plántulas fueron aclimatadas directamente de su medio liquido Y3. Los tratamientos de siete, quince, veinte uno y treinta días respectivamente representan la cantidad de tiempo en lo cual las plantas estuvieron en el proceso de transportación en medio Y3 semi sólido. Para cada tratamiento se utilizó seis plántulas como unidad experimental, en el primer y cinco en el segundo ensayo debido a la disponibilidad de plántulas al momento de realizar el ensayo. Es importante mencionar que la condición de transporte (medio Y 3 solido) es diferente al medio en lo cual las plantas generalmente se encuentran en su etapa vegetativa del miro propagación (medio liquido) y fueron trasladadas a este medio, de seis o cinco plántulas por frasco tapadas, para facilitar el transporte y reducir el movimiento de las plántulas durante el viaje y evitar derrame del medio.

4.2.2 Proceso de envío

Se realizó un envío a Guyana de 450 plántulas de cocotero micropropagados indexadas. De lo cual 340 fueron Alto Pacifico de México, 25 Vanuatu Tall (VTT), 60 Markham Valley Tall (MVT) y 25 Pilipog Green Dwarf (PILD). El envío se realiza por vía aérea mediante una empresa comercial. Las plántulas fueron enviadas en frascos plásticos en un medio Y3 semi solido estéril que contenía cinco plántulas por frasco. Previamente estos frascos fueron empacados en cajas y enviadas a Guyana (Figura 4.1). Se estimó un periodo de traslado entre siete a diez días para que las plántulas lleguen a su destino.



Figura 4.1. Proceso de empaque de las plántulas de cocotero micropropagada para su envío.

4.2.3 Aclimatación de los cocoteros micropropagados

Las plántulas de los tratamientos cero, siete, quince, veinte uno y treinta días fueron conservadas en el laboratorio de CICY y una vez simulado su periodo de envío, fueron aclimatados en el Centro de Investigación Científica Yucatán. AC y representaron los controles de sobrevivencia para las plantas que fueron enviados a Guyana.

Cuando las plantas cumplieron con sus perspectivas tiempo en el medio de transporte (siete, quince, veinte uno y treinta días) se realizó el proceso de aclimatación siguiendo el protocolo establecido por CICY. Este protocolo se basa en: preparar un sustrato para el establecimiento de las plántulas que contenía una mezcla de arena, tierra y peat moss (1v:1v:1v). Luego se preparó una solución (0.1g de fungicida Captan ultra 50 wp (ia: captan) en 100ml de agua) para la protección de las raíces de las plántulas. Antes de trasplantar las plántulas de cocotero en el sustrato se lavaron las plántulas con agua normal con la finalidad de quitar los desechos de los medios de transporte y otras sustancias. Se sumergió las raíces en la solución fungosa y posteriormente las plántulas fueron sembradas en su sustrato bolsas negras de polietileno. Una vez sembrado una bolsa transparente fue colocada arriba de plántula (Figura 4.2) con la finalidad de brindarle a la planta un ambiente húmedo y evitar la rápida deshidratación de la plántula. Se hicieron algunos agujeros en las bolsas transparentes para facilitar la transpiración de las plantas a su nuevo entorno y se pasaron al invernadero. Las plántulas no fueron regados durante el periodo que las bolsas transparentes estuvieron puestas (15 días). Se removió las bolsas transparentes a los quince días de estar en el invernadero y se aplicó un riego

por aspersión. A partir de este momento las plántulas de cocotero se riegaron diariamente tres veces al día dependiendo de la temperatura.



Figura 4.2. Plántula de cocotero en aclimatación.

El proceso anteriormente descrito fue realizado en Guyana con algunas modificaciones al sustrato debido a la disponibilidad de los componentes requerido. En el cuadro 9 se muestra una tabla comparativa de los componentes de los sustratos utilizado en Guyana y México.

Cuadro 4.1. Tabla comparativa de los componentes utilizados para preparar el sustrato y su disponibilidad en Guyana.

Componentes del sustrato establecido por el protocolo	Componentes disponible y utilizada en Guyana.	Equivalente
Peat moss	Promix	El promix es equivalente al peat moss.
Arena	Arena	La arena utilizada en Guyana es arena negra (tipo de arena disponible) En México se utilizó la arena blanca
Tierra	Tierra	La tierra no es lo mismo en ambos países
	Vermicompost (Materia orgánica)	Se incluyó la materia orgánica como parte del sustrato debido a que es utilizado como componente del sustrato utilizado para aclimatar plántulas micropropagadas en nuestro laboratorio.

Se preparó un total de tres sustratos para determinar cuál era el más adecuado para aclimatar las plántulas. Los sustratos se prepararon usando una proporción uno a uno (1: 1: 1) de la siguiente manera; Sustrato 1: contenía una mezcla de vermicompost (materia orgánica), suelo y promix; sustrato 2: contenía una mezcla de arena, suelo y promix y el sustrato 3: contenía promix y suelo.

4.2.4 Parámetros evaluados durante el proceso de envío y aclimatación

Durante el proceso de envío y aclimatación se cuantificó el número de plantas vivas y muertas y se calculó el porcentaje de sobrevivencia de las plántulas de acuerdo con el número de plantas enviadas afín de determinar el tiempo máximo y mínimo en lo cual las plántulas de cocotero micropropagados pueden tolerar en el medio sólido de transporte, llegar en buenas condiciones a su destino final y obtener el mayor porcentaje de plántulas sobrevivientes durante y después el proceso de aclimatación. Además, se describió el estado general de las plantas el medio de cultivo sólido, el sellado en el en invernadero durante el proceso de aclimatación.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Evaluación de condiciones de envío

Los diferentes tratamientos evaluados para determinar las condiciones adecuadas para enviar plántulas de cocotero micropropagada a diferentes destinos revelaron que las plántulas al estar en sus tratamientos de traslado de siete y treinta días estaban en buenas condiciones al momento de aclimatarlos en el primer ensayo. Mientras que en el segundo ensayo las plantas de los tratamientos de quince y veinte unos días estaba en buenas condiciones comparado a las plántulas de cocotero del tratamiento de treinta días (Fotos del segundo ensayo no está mostrado). Aunque sea el tratamiento de cero días no fue evaluado para el propósito de envío a otros países estos resultados indicó que plántulas de cocotero saliendo directamente del cultivo *in vitro* están en buenas condiciones al momento de aclimatarlos y pueden ser aclimatadas saliendo de su medio normal de cultivo *in vitro*.

Comparando las plántulas que estaban en el medio sólido de transportación con las plántulas que estaban en su medio normal de *in vitro* podemos apreciar que las plántulas de cocotero no difieren, en cuanto al estado fisiológico de las plántulas en ambos medios indicando que el medio sólido de transporte se puede utilizar como alternativa para enviar plántulas de cocotero micropropagadas.

4.3.2 Aclimatación de los cocoteritos micropropagados en cicy

El proceso de aclimatación usado en este experimento fue adecuado para aclimatar plántulas de cocotero micropropagado. Un aspecto fundamental al observar durante el proceso de aclimatación es la temperatura del invernadero y del ambiente para evitar que las plántulas no se deshidraten.

4.3.3. Supervivencia de las plántulas de cocotero durante el proceso de aclimatación en CICY

Los tratamientos cero y siete días fueron sembrados al mismo momento. Se observó la condensación en las bolsas transparentes horas después de sembrarlo indicando la conservación de la humedad en el ambiente creado evitando que las plántulas se deshidraten (Figura 4.4 A y B). Las mismas condiciones fueron observadas para las

plántulas del tratamiento de treinta días y se observó la condensación en las bolas transparente de lo indica la conservación de la humedad en el ambiente creado (**Figura 4.4 C**).

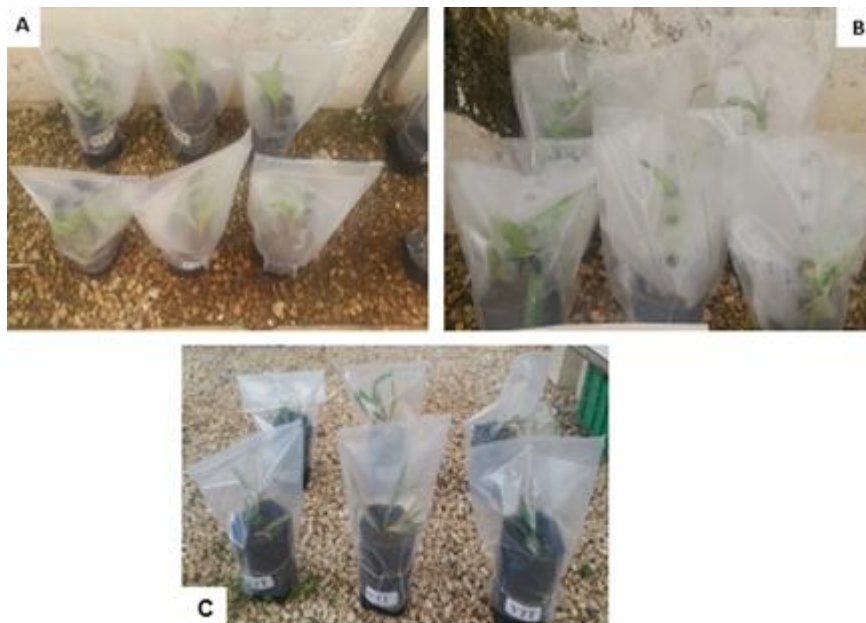


Figura 4. 3. Condensación en las bolsas transparente durante el proceso de aclimatación. **A y B** tratamientos de cero y siete días, y **D** tratamiento de treinta días.

A los quince días las bolas transparentes fueron removidos y se obtuvieron 100% (6/6 plántulas) de sobrevivencia para los tratamientos de cero y siete días (Cuadro 10) mientras que en el tratamiento de 30 día se reportó una sobrevivencia de 33 % (2/6) (Cuadro 10) de las plántulas de cocotero en el primer ensayo. En segundo ensayo se observó una sobrevivencia de 100% para el tratamiento de cero días (5/5), 80% (4/5) de sobrevivencia del tratamiento de quince días y de veintiún días y 40 % (2/5) de plantas sobrevivientes para los tratamientos de treinta días hasta la fecha. Se resume en el cuadro 10, la cantidad de plantas sobrevivientes por tratamiento y ensayo. Los resultados obtenidos de estos ensayos nos indican que las plantas pueden estar en su medio de transporte por un tiempo de veinte unos días y obtener resultados favorables al momento de aclimatarlos. A pesar de que la cantidad de plántulas utilizado por tratamiento no fue tan representativa debido a la poca cantidad de plantas utilizada los resultados permitieron tener una estimación de sobrevivencia al momento de aclimatarlo y se repetirá

el experimento con un mayor número de plantas para tener una mayor precisión de la cantidad del tiempo las plántulas pueden estar en su medio de transporte y comportar bien al momento de aclimatarlos.

Cuadro 4.2. Plántulas de cocotero sobrevivientes con respecto a sus diferentes tratamientos hasta la fecha.

Tiempo de Tratamiento (Días)	Número de plantas sobrevivientes		Promedio
	Ensayo 1 N=6	Ensayo 1 N=5	
0	6/6	5/5	5
7	6/6	ND	-
15	ND	4/5	-
21	ND	4/5	-
30	2/6	2/5	2

CASO DE GUYANA

Desafortunadamente los resultados esperados en caso de Guyana no se lograron debido a algunos problemas enfrentados (cuadro 11). Señalando como principal inconveniente el atraso en el transporte de las plántulas de Miami a Guyana. Se estimó un periodo de siete días para que las plantas llegaran a Guyana sin embargo demoró veinte un día en proceso de transporte a su destino y estaban en su medio de transporte tres días antes de ser enviado resultando en estar en su medio de transporte un total de veinte cinco días bajo condiciones desconocidas. Además, se observó contaminación del medio de transporte (principalmente en los recipientes que tenía rupturas) y plántulas con sintomatología de albinismo al momento de recibir las plantas.

Cuadro 4.3. Resumen de los problemas enfrentados con respecto del recibo de las plántulas de cocotero micropropagadas y cómo resolver dichos problemas.

Problemas enfrentados	Explicación	¿Cómo resolver?
Mayor tiempo de traslado de Mérida a Guyana	Las plantas fueron enviadas durante la época más ocupada del año. Atraso en el vuelo de Miami a Guyana	Realizar envíos en fechas de menor tráfico de la empresa transportadora. Usar envío tipo exprés.
Cajas de envío dañadas	Mal manejo del envío	Igual que arriba y usar cajas más pequeñas y robustas.
Recipiente con plantas estaban rotos	Mal manejo del envío	Igual que arriba y usar cajas más pequeñas y robustas.
Contaminación del medio de envío	Mal manejo del envío	Igual que arriba y usar cajas más pequeñas y robustas.
Plantas muy estresadas	Por haber estado mucho tiempo en las condiciones inadecuadas.	Realizar envíos en fechas de menor tráfico de la empresa transportadora. Usar envío tipo exprés.
Plantas con síntomas de albinismo	Por haber estado mucho tiempo en la oscuridad.	Igual que arriba.
Problema para encontrar materiales equivalentes para la preparación del sustrato	Los materiales estipulados en el protocolo no fueron disponibles en Guyana.	Tratar de buscar materiales presentes en ambos países para preparar sustrato.

4.3.4 Plántulas de cocotero sobrevivientes durante el proceso de aclimatación en Guyana

Al retirar las bolsas transparentes al final del período de dos semanas, las plántulas tenían un aspecto saludable (Figura 4.7).

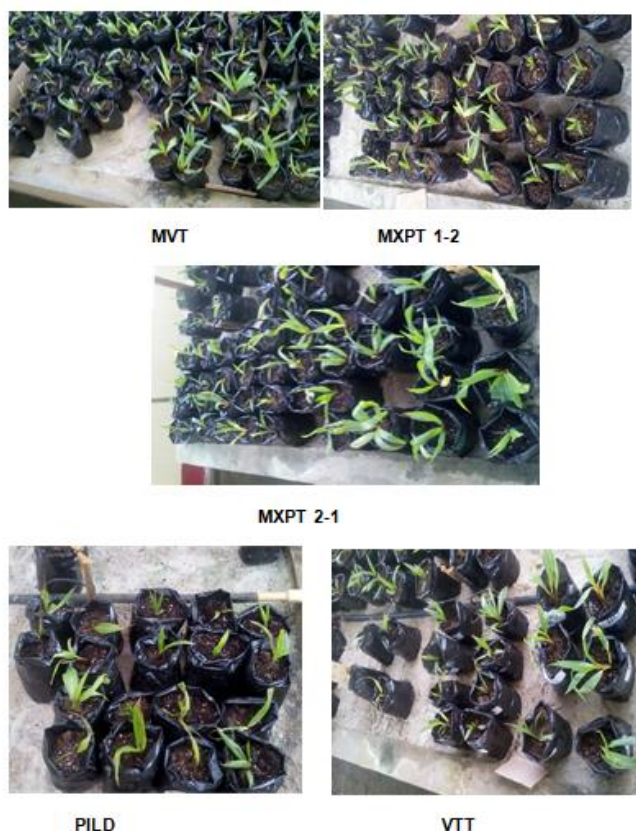


Figura 4.4. Plántulas de cocotero sobrevivientes al momento de remover las bolsas transparentes a los quince días con respecto a su diferente tiempo en el medio de transporte.

Sin embargo, a pesar de tener una apariencia saludable al momento de remover las bolsas transparentes se observó en el transcurso de los tres meses en el invernadero una mortalidad crucial de las plántulas principalmente las que llegaron en los recipientes en los cual su medio de transporte estaba contaminado. El cuadro 12. refleja la cantidad de plántulas de cocotero sobrevivientes con respecto a sus diferentes variedades hasta la fecha. Se puede observar un mayor porcentaje de plántulas de cocotero sobrevivientes en

la variedad Alto de Markham Valley (MVT) de 86% de las 60 plántulas recibido comparado con el porcentaje de plántulas sobrevivientes de las de más variedades recibidos.

Cuadro 4.4. Plántulas de cocotero sobrevivientes con respecto a las diferentes variedades recibido y aclimatado en Guyana.

Variedades	Número de Plantas recibido	Número de plantas sobrevividas	% de sobrevivencia	Observaciones
Alto Pacifico de México (MPT)	340	50	15%	La mayoría de sus recipientes fueron contaminadas y roto.
Alto de Vanuatu (VTT)	25	1	4%	No dañados
Alto de Markham Valley (MVT)	60	52	86%	No dañados
Enano verdad de Pilipog (PILD)	25	5	20%	No dañados

Basados en resultados obtenidos de diferentes países que han recibido plántulas de cocotero micropropagados se puede señalar que el tiempo en lo cual las plantas son enviadas juegan un papel vital con respecto a la supervivencia de las plantas. En el cuadro 13 podemos apreciar un porcentaje favorable de plántulas sobrevivientes obtenidos en otros países. Al realizar un envío a Granada y Santa Lucía y durante el mes de septiembre y junio ellos obtuvieron 50 y 46% de plántulas de cocotero sobrevivientes. Guyana obtuvo 24% porcentaje de sobrevivencia cuando se realizó un envío en diciembre

debido a factores externos como ataques de hongo consecuencia del mal manejo de las muestras. Si no hubiera ocurrido este fenómeno habría mayor probabilidad de una alta sobrevivencia de las plántulas de cocotero enviado a Guyana.

Cuadro 4.5. Porcentaje de plántulas de cocotero micropropagados sobrevivientes en diferentes países con respecto al época de envío.

País Enviado	Mes de envió	Plántulas de cocotero micropropagados sobrevivientes
Santa Lucia	Septiembre	46%
Granada	Junio	50
Guyana	Diciembre	24%

4.4 DISCUSION

Debido a la necesidad de replantar con materiales resistentes y altamente productivas es inevitable buscar medias de realizar el intercambio de germoplasma de cocotero de manera eficiente garantizando el máximo porcentaje de viabilidad y/o sobrevivencia de las plántulas micropropagadas, a enviarse con el mínimo riesgo de dispersar plagas y enfermedades.

En este trabajo se logró exitosamente crear un medio artificial semi sólido (no es el medio normal) para enviar las plántulas de cocotero sin afectar al estado de la plántula. Los resultados obtenidos muestran que las plántulas de cocotero micropropagadas pueden estar en esta media de transporte hasta veinte un día sin afectaciones grandes al estado de las plántulas ni con contaminación al medio de transporte, con excepción del envío a Guyana, cuyos donde se observó contaminación del medio de transporte de las plantas estaban. Además, que estos resultados pudieran ser influidos por las condiciones del envío y las condiciones de mantenimiento de las plántulas en el aeropuerto Miami. Debido al atraso del envío y el mal manejo del encargado. Este atraso afecto seriamente a la cantidad de plántulas sobrevivientes en el caso de Guyana.

Es importante recordar que la aclimatación es una etapa fundamental en un sistema de micropropagación porque dependen de ella la eficiencia del proceso y la calidad final de las plantas producidas *in vitro* (Agramonte *et al.*, 1998). Las plántulas de cero, siete, quince y veinte unos días tuvieron mayor comportamiento en cuanto al proceso de aclimatación hasta la fecha debido a que las plántulas pasaron su etapa crítica en un invernadero. Estos resultados coinciden con (Preece y Sutter, 1991) donde plantearon que plantas micropropagada en comparación con las cultivadas tradicionalmente presentan un comportamiento diferente en condiciones de invernadero o de campo. Es decir, sufren cambios morfológicos y fisiológicos que ocasionan una pérdida importante de plantas en el momento de trasplante y por esta razón, es necesaria la aplicación de técnicas de adaptación al pasar de las condiciones *in vitro* a *ex vitro*.

La condensación en las bolsas transparentes favorece la conservación suficiente de la humedad relativa en el ambiente creado y permite que las plántulas se adapten poco a poco a su nuevo ambiente y por lo tanto se justifica el uso de las bolsas transparentes, como cámaras húmedas, para incorporar las plántulas en su nuevo entorno y facilitar su

adaptación. Preece y Sutter, (1991) plantearon que la aclimatación permitirá que la planta alcance un crecimiento autotrófico en ambientes de menor humedad relativa, con más luz y sustratos sépticos. Estas son las condiciones reinantes en invernadero y campo donde crecerán las plantas provenientes de cultivo *in vitro*. Además, las plántulas de cocotero micropropagados cumplieron con los requisitos planteado por y Aké, (2004) donde menciono en su trabajo de investigación que es recomendable permitir que las plántulas de cocotero micropropagado alcancen a formar al menos dos hojas bífidas y dos raíces primarias antes de ser transferidas a condiciones *ex vitro*, para asegurar su sobrevivencia.

A pesar de que las plántulas de cocotero micropropagado enviado a Guyana no llegaron en buenas condiciones (Contaminación del medio de transporte y rupturas laterales de su contenedor de envió) hasta la fecha existe plántulas de cocotero sobrevivientes (Cuadro 10). También se considera que la época de realizar el envío (diciembre) resulto en el mal manejo de mercancía y el bajo porcentaje de las plántulas sobrevivientes. Por lo tanto, es necesario es importante realizar envíos en épocas de menos festejo.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS GENERALES

5.1 DISCUSIÓN GENERAL

El cocotero (*Cocoteros nucifera* L) es una planta perenne muy importante debido a su contribución sustancial a la seguridad alimentaria. Sin embargo, a pesar de su potencial económico existen factores que limitan su producción como el Amarillamiento Letal del Cocotero (ALC), una enfermedad devastadora que ha matado a millones de palmas de cocotero y otras especies en América Latina y el Caribe. A pesar de décadas de investigación, todavía no hay una cura para el ALC, pero se pueden tomar medidas para intentar a reducir su tasa de propagación. Los métodos actuales y potenciales incluyen la cuarentena, la quimioterapia (aplicación de antibióticos), el control de vectores, el saneamiento y el uso de variedades resistentes. La replantación con palmas resistentes ha demostrado ser la manera más eficiente de combatir la enfermedad (Oropeza *et al.*, 2005). Los ensayos que evalúan la resistencia ALC se han realizado en Jamaica (Been 1980) y México (Zizumbo *et al.*, 2008) donde se encontró resistencia en algunos ecotipos como los enanos malayos amarillos, altos de panamá y los altos pacíficos mexicanos que posteriormente fueron utilizados para la producción de híbridos. Solís Ramos *et al.*, (2012) planteo que, para mantener la producción requerida para la demanda actual y futura de productos de cocotero, los países productores necesitan renovar sus plantaciones y aumentar el área de cultivo y para lograr este objetivo. Este aumento en las capacidades de producción es difícil de lograr y solo depende de la propagación a través de la semilla. Por esta razón, se deben considerar medios alternativos de propagación, como la propagación *in vitro* o la micropropagación por embriogénesis somática. Además, Diekmann, (2005) planteo que es extremadamente importante que se reconozca el riesgo y que se elija una forma mínima de transferencia de riesgo de germoplasma, como las plántulas *in vitro* en lugar de las nueces.

México es el país líder en la micropropagación de cocotero sin embargo existe algunas limitaciones para la realización del intercambio del germoplasma de cocotero como la duda del estado fitosanitario de materiales saliendo del país debido a que México fue uno de los países más afectada por la enfermedad de ALC y la duda del estado en lo cual las plantas llegaran a su destino final. No obstante, el establecimiento de protocolos para el

intercambio de germoplasma de cocotero en América latina y el caribe es sumamente importante debido a la necesidad del movimiento seguro de germoplasma de cocotero con mínimo riesgo de introducir a la enfermedad de ALC dentro y fuera de la región.

Este trabajo de investigación logro establecer dichos protocolos con la finalidad de facilitar el movimiento seguro de germoplasma de cocotero, cumpliendo con los requisitos fitosanitarios de otros países para la diseminación de materiales indexadas y altamente productivas satisfaciendo la demanda existente actualmente.

Resultados obtenidos muestra la importancia de la indexación mediante el uso de la técnica de PCR/Tiempo-real para la detección del fitoplasma de ALC en plántulas de cocotero micropropagados *in vitro* y campo (rancho “LA CURVA”) señalando la ausencia del fitoplasma de ALC en los tejidos analizados (callos embriogénicos, hojas de plántulas de cocotero micropropagados, tejidos de tronco y hojas de plantas en vivero). Estos resultados nos permitieron comprobar el estado fitosanitario de las plántulas de cocotero micropropagados y propagadas en la finca “LA CURVA” son ideales para su implementación en el proceso de intercambio de cocotero dentro y fuera del país cumpliendo con el planteamiento de Eden-Green y Mpunami, (2005) donde reportaron que el movimiento seguro significa el movimiento del germoplasma de cocotero sin introducir plagas y enfermedades, o al menos aquellas plagas para las cuales se perciben riesgos de efectos nocivos o indeseables después de la introducción a una región previamente no afectada. Además, se reporta la importancia de la indexación en la detección temprana del fitoplasma de ALC en explantes (inflorescencia) a ser utilizado en el proceso de micropropagación y que el fitoplasma de ALC no es transmisible en la cadena de micropropagación partiendo de un explante positivo a ALC hasta la producción de callos embriogénicos. No obstante, es importante seguir realizando la indexación en el proceso de micropropagación para determinar si la primera generación de plántulas de cocotero micropropagados obtenidos de explante enfermo a ALC es realmente libres del fitoplasma.

Presentemente existe protocolos de envío y aclimatación para plántulas de cocotero micropropagados. Por lo tanto, se realizó estudios para evaluar los protocolos de envío y aclimatación de plántulas de cocotero provenientes de cultivo *in vitro* donde los resultados obtenidos en este trabajo muestran 80-100% de sobrevivencia de las plántulas de cocotero en diferentes tiempos en el medio de transporte evaluado indicando que las

plántulas pueden estar en su medio de transporte hasta veinte unos días sin afectaciones fisiológicos a las plántulas de cocotero al momento do aclimatarlos. Según Agramonte *et al.*, (1998) la aclimatación es una etapa fundamental en un sistema de micropropagación porque dependen de ella la eficiencia del proceso y la calidad final de las plantas producidas *in vitro*.

La movilización del germoplasma, de cocotero dentro y fuera de una región o país es limitado debido a las leyes fitosanitarias que existen y la aprensión de introducir el fitoplasma de ALC en su región. Por lo tanto, la implementación de los protocolos establecidos en este trabajo sirva como una herramienta importante en la realización del intercambio de germoplasma de cocotero con países de América Latina y el Caribe. Se reporta por primera vez en este trabajo de investigación protocolos para el movimiento seguro de germoplasma de cocotero mediante el uso de plántulas de cocotero micropropagado.

5.2 CONCLUSIONES GENERALES

- 🔧 Se logró exitosamente establecer un método de indexación empleando la técnica de PCR en Tiempo-real para la detección de ALC en el proceso de micropropagación y propagación por semillas de cocotero.
- 🔧 Partiendo de explantes libres del fitoplasma de ALC los callos embriogénicos y las hojas de plántulas de cocotero micropropagadas analizado en este trabajo resultaron a ser negativas a la presencia del fitoplasma de ALC.
- 🔧 Utilizando explantes positivos al fitoplasma de ALC los callos embriogénicos obtenidos al final de los tres ciclos resultaron negativos a la presencia del fitoplasma de ALC.
- 🔧 En el ensayo de aclimatación de las plántulas de cocotero micropropagadas tuvieron una sobrevivencia de alrededor de 80-100% después de 0-21 días de en medio de cultivo semi-sólido, y cayó a 33 % a los 30 días. Estos resultados son aceptables, pero indican que tenemos que asegurarnos que el tiempo de traslado sea el más breve posible, una semana de viaje, para asegurar el máximo sobrevivencia de plántulas vigorosas a aclimatarse.

5.3 PERSPECTIVAS

- 🌈 La realización de otros estudios de transmisión de ALC usando otro tipo de explantes enfermas (embriones) ayudara al entendimiento de la enfermedad y complementara a los resultados obtenidos en este trabajo.
- 🌈 La realización de la indexación del fitoplasma de ALC en tiempos más corto (no esperar hasta que cumple el ciclo de 90 días para realizar de la detección del fitoplasma de ALC) podría ayudar al determinar el momento en lo cual el fitoplasma fue eliminado de los explantes.
- 🌈 La realización de los cortes histológicos en los explantes enfermo al momento de someterlo a cultivo *in vitro* y en tiempos cortes también apoyará los resultados obtenidos en este trabajo y además nos permitirá tener un entendimiento del fitoplasma de ALC y cómo funciona.
- 🌈 Repetir los protocolos de envío y aclimatación con unidades experimentales mayores 10 y al menos cuatro repeticiones, en condiciones controladas, para realizar una evaluación estadística robusta.

BIBLIOGRAFÍA

- Agramonte Peñalver, F., F. Jiménez Terry y M.A. Dita Rodríguez (1998). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Sta. Clara, Villa Clara. Cuba, pp.193-206.
- Aguilera, P., M.R. Tachiquín. M.G.R. Munive, B.P. Olvera y M.E. Cárdenas (2014). PCR en tiempo real. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. Ciudad de México: Laboratorio de Patología Vascular Cerebral, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.
- Al-Saady, N.A., A.J. Khan., A. Calari., A.M. Al-Subhi y A. Bertaccini (2008). 'Candidatus Phytoplasma omanense', associated with witches'broom of *Cassia italica* (Mill.) International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 58, 461-466.
- Arocha, Y., M. López., B. Piñol, M. Fernández, B. Picornell, R. Almeida, I. Palenzuela, M.R. Wilson y P. Jones (2005). 'Candidatus Phytoplasma graminis' and 'Candidatus Phytoplasma caricae', two novel phytoplasmas associated with diseases of sugarcane, weeds and papaya in Cuba. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 55, 2451-2463.
- Azpeitia Morales, A., J.L. Chan, L. Sáenz Carbonell y C. Oropeza Salin (2009). Influencia de la subdivisión del callo embriogénico en la formación de embriones somáticos de cocotero. Agricultura Técnica en México, 35, 39-48.
- Azpeitia Morales, A., L. Sáenz Carbonell, J.L. Chan y C. Oropeza Salin (2003). Inducción de embriones somáticos en explantes de plúmula de cocotero por ácido abscísico y polietilén glicol. Revista Fitotecnia Mexicana, 26, 309-317.
- Bai, X., J. Zhang, A. Ewing, S.A. Miller, A. Jancso Radek, D.V. Shevchenko, K. Tsukerman, T. Walunas y A. Lapidus (2006). Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. Journal of Bacteriology 188, 3682-3696.
- Balderas Palacios, F. G y I. J. González Acuña (2013). Cocotero híbrido intercalado con cultivos anuales y perennes, tecnología sustentable. Revista Mexicana de Ciencias Forestales 4, 58-71.

- Batugal, P. A. (1999). The role of international cooperation in the development of biotechnology in coconut. In *Current Advances in Coconut Biotechnology*, 19-30. Springer Netherlands.
- Been, B. O. (1980). Assessing field resistance to lethal yellowing in coconut varieties. *Oleagineux*, 35, 302.
- Been, B. O. (1991). Observations on field-resistance to lethal yellowing in coconut varieties and hybrids in jamaica. *Oléagineux*, vol. 36, 9-11.
- Bertaccini, A. (2007). Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. *Frontiers in Bioscience* 12, 673-689
- Bertaccini, A., B. Duduk., S. Paltrinieri., N. Contaldo (2014). Phytoplasmas and Phytoplasma Diseases: A Severe Threat to Agriculture. *American Journal of Plant Sciences* 5, 1763-1788. <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2014.512191>.
- Biosystems, A. (2004). Guide to performing relative quantitation of gene expression using real-time quantitative PCR. Applied Biosystems.
- Blaha G., G. Hall, J.S. Worokka, E. Concibido, C.F. Ortiz (1994). Phytophthora isolates from coconut plantations in Indonesia and Ivory Coast: characterization and identification by morphology and isozyme analysis. *Mycological Research*. 98: 1379-1389.
- Chan JL., L. Saénz y C. Talavera (1998). Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports* 17,515-521.
- Chan, J. L., L. Sáenz., C. Talavera, R. Hornung, M. Robert y C. Oropeza (1998). Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*, 17, 515-521.
- Conci, V. C., C. E Luciani, M. Merino, M.G. Celli, M.C. Perotto, A.K. Torrico. y L.R.Conci (2016). Advances in characterization and epidemiology of strawberry viruses and phytoplasmas in Argentina. In *VIII International Strawberry Symposium* 1156, 801-810.

- Córdova, I., C. Oropeza, C. Puch-Hau, N. Harrison, A. Collí-Rodríguez, M. Narvaez y L. Sáenz (2014). A real-time PCR assay for detection of coconut lethal yellowing phytoplasmas of group 16SrIV subgroups A, D and E found in the Americas. *Journal of Plant Pathology*, 96, 343-352.
- Davies, D. L. y M. F. Clark (1994). Maintenance of mycoplasma-like organisms occurring in *Pyrus* species by micropropagation and their elimination by tetracycline therapy. *Plant pathology*, 43, 819-823.
- De Taffin, (1998). Coconut. The Tropical Agriculturist Series. CTA, Macmillan Education Ltd., London.
- Diekmann, M (2005). Strategies for safe movement of coconut germplasm, en: Coconut Genetic Resources, pp.390-394.
- Dollet, M., R. Quaicoe y Pilet, F (2009). Review of coconut “lethal yellowing” type diseases. Diversity, variability and diagnosis. *Oilseed Fats Crops Lipids* 16, 97-101.
- Dollet. M (1993). Recherches sur les trypanosomes associées au hartrot du cocotier: UN nouveau domaine dans la protection des végétaux. *Memor du Colloques la recherche européenne au service du cocotier- Montpellier*, 2, 127-136.
- Domínguez C., E.J. López, R. G. Castillo y P. B. Ruíz (1999). El Cocotero (*Cocos nucifera* L.). Manual para la Producción en México. INIFAP. CIRGOC. Campo Experimental Huimanguillo. Tabasco, México. Libro Técnico Num. 6. p. 132
- Doyle, J., and Doyle. (1990). Isolation of plant of DNA from fresh tissues. *Focus Life technol.* 12,13-15.
- Eden-Green y A.A.S.J Mpunami (2005). Indexing and pathogen characterization, en: Coconut Genetic Resources, pp 371-389
- Eden-Green, SJ (1997). History, distribution and present status of lethal yellowing-like disease of palms. En: Eden-Green SJ, Ofori F (eds) *Proceedings of the international workshop on lethal yellowing-like diseases of coconut*, Elmina, Ghana. Natural Resources Institute, Chatham, pp. 9-25

- Eeuwens, C (1976). Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum* 36:23-28.
- Eziashi, E. y I. Omamor (2010). Lethal yellowing disease of the coconut palms (*Cocos nucifera* L.): an overview of the crises. *African Journal of Biotechnology* 9, 9122-9127.
- FAOSTAT, F. (2016). FAOSTAT statistical database.
- Fehér, A. (2015). Somatic embryogenesis stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1849, 385-402.
- Ghose, S. y R. Gopalakrishnan (2013). Coconut guide. Coconut development board. Kochi, Ministry of Agriculture, Government of India.
- Gribaudo, I., P. Ruffa., D. Cuzzo., G. Gambino & C. Marzachi, C. (2007). Attempts to eliminate phytoplasmas from grapevine clones by tissue culture techniques. *Bulletin of Insectology*, 60, 315.
- Guyana Marketing Corporation (2014). Coconut production and Post-harvest handling. Guyana Marketing Corporation. www.newgmc.com
- Hanold, D y J.W, Randles (1991). Detection of coconut cadang-cadang viroid-like sequences in oil and coconut palm and other monocotyledons in the south-west Pacific. *Annals of Applied Biology* 118,139-151
- Harries, H. C. (1978). The evolution, dissemination and classification of *Cocos nucifera* L. *The botanical review* 44, 265-319.
- Harrison NA y C. Oropeza (2008). Coconut lethal yellowing Characterization, diagnosis and management of phytoplasmas, en: Harrison NA, Rao GP, Marcone C (eds) Studium Press LLC, Houston, pp.219-248

- Harrison, N. A., P.A. Richardson y J.H. Tsai (1995). Detection and diagnosis of lethal yellowing: conventional methods and molecular techniques, en: Lethal Yellowing: Research and Practical Aspects Springer Netherlands pp. 79-91.
- Harrison, N. A., R.E. Davis, C. Oropeza, E.E. Helmick, M. Narvaez., S. Eden-Green y M. Dickinson (2014). '*Candidatus Phytoplasma palmicola*', associated with a lethal yellowing-type disease of coconut (*Cocos nucifera* L.) in Mozambique. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 64, 1890-1899.
- Higuchi. R., C. Fockler., G. Dollinger y R. Watson (1993). Kinetic PCR analysis. Real-Time monitoring of DNA amplification reactions. Nature Biotechnology., 11, 1026-1030.
- Hornung R y J. Verdeil (1999). Somatic embryogenesis in coconut from immature inflorescence explants, en: Current Advances in Coconut Biotechnology. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp 309-319
- Howard, F. W., R.C. Norris y D.L Thomas (1983). Evidence of transmission of palm lethal yellowing agent by a planthopper, *Myndus crudus* (Homoptera, Cixiidae). Tropical Agriculture, 60, 168-171.
- Howard, F.W. y R.E McCoy. (1980) Reduction in spread of mycoplasma-like organism-associated lethal decline of the palm, *Veitchia merrillii*, by the use of insecticides. Journal of Economic Entomology 73, 268-270.
- Hussey, G. (1983). *In vitro* propagation of horticultural and agricultural crops in "Plant Biotechnology". Ed. Mantell, S. H. Cambridge University Press: Cambridge. Pp. 111-38
- Janse, J. D y M. Wenneker (2002). Possibilities of avoidance and control of bacterial plant diseases when using pathogen-tested (certified) or-treated planting material. Plant Pathology, 51, 523-536.
- Janse, J. D., y M. Wenneker, (2002). Possibilities of avoidance and control of bacterial plant diseases when using pathogen-tested (certified) or-treated planting material. Plant Pathology, 51, 523-536

- Kumar, N., y S. Kapoor (2010). Value Chain Analysis of Coconut in Orissa. *Agricultural Economics Research Review*, 23.
- Lebrun, P., L. Baudouin, W. Myrie, A. Berger y M. Dollet (2008). Recent lethal yellowing outbreak: why is the Malayan Yellow Dwarf Coconut no longer resistant in Jamaica?. *Tree genetics & genomes*, 4, 125-131.
- Lee, I.-M., D.E Gundersen-Rindal, R.E. Davis, K.D. Bottner, C. Marcone y E. Seemüller (2004). '*Candidatus Phytoplasma asteris*', a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and related diseases. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 1037-1048.
- Lee, I.-M., R.E. Davis y D.E. Gundersen-Rindal (2000). Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annual Review Microbiology* 54, 221–255.
- Lizano, M. (2005). Guía técnica del cultivo de coco. IICA, San Salvador (El Salvador) Ministerio de Agricultura y Ganadería, San Salvador.
- Loyola-Vargas, V. M. (2016). The history of somatic embryogenesis, en: *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications* Springer, Cham pp. 11-22.
- Mahdavi-Darvari, F., N.M. Noor y I. Ismanizan (2015). Epigenetic regulation and gene markers as signals of early somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 120, 407-422.
- Manimekalai, R., V.P. Soumya, S. Nair, G.V. Thomas y V.K Baranwal (2014). Molecular characterization identifies 16SrXI-B group phytoplasma '*Candidatus Phytoplasma oryzae*'-related strain) associated with root wilt disease of coconut in India. *Scientia Horticulturae*, 165, 288-294.
- McCoy R.E., F.W Howard, J.H. Tsai, H.M. Donselman, D.L. Thomas, H.G. Basham, R.A. Atilano, F.M. Eskafi, L. Britt y M.E. Collins (1983). Lethal yellowing of palms. University of Florida Agricultural Experiment Stations Bulletin 834. Gainesville, USA.

- Myrie, W. A., L. Douglas., N.A. Harrison, W. McLaughlin y M. James (2012). First report of lethal yellowing disease associated with subgroup 16SrIV, a phytoplasma on St. Kitts in the Lesser Antilles. *New Disease Reports*, 26, 25-25.
- Myrie, W. A., L. Douglas., N.A. Harrison, W. McLaughlin y M. James (2012). First report of lethal yellowing disease associated with subgroup 16SrIV, a phytoplasma on St. Kitts in the Lesser Antilles. *New Disease Reports*, 26, 25-25.
- Ntushelo, K., N.A Harrison y M.L. Elliott (2013). Palm Phytoplasmas in the Caribbean Basin. *Palms*, 57, 93-100
- Olmos, S., G. Luciani., y E. Galdeano (2004). Métodos de propagación y conservación de germoplasma. *Biotecnología y mejoramiento vegetal*.
- Oropeza, C., D. Zizumbo, L. Sáenz, M. Narváez, y I. Córdova (2010). Interacciones planta-patógeno-vector-ambiente en el amarillamiento letal del cocotero. *Revista Palmas*, 31, 388-402.
- Oropeza, C., I. Cordova, A. Chumba, M. Narváez, L. Sáenz, R. Ashburner y N. Harrison (2011). Phytoplasma distribution in coconut palms affected by lethal yellowing disease. *Annals of Applied Biology*, 159, 109-117.
- Oyoo, M.E., M. Najya, S.M Githiri, P.O. Ojwang, F.K. Muniu, E. Masha y J.O. Owuoche (2015). In-situ morphological characterization of coconut in the coastal lowlands of Kenya. *African Journal of Plant Science*, 9, 65-74.
- Pardey, A. E. B y Arango, C. M. (2016). Las mejores prácticas para detener el avance de la Marchitez letal (ML) en plantaciones de palma de aceite en Colombia. *Palmas*, 37, 75-90.
- Parmessur, Y., S. Aljanabi, S. Saumtally y A. Dookun-Saumtally (2002). Sugarcane yellow leaf virus and sugarcane yellows phytoplasma: elimination by tissue culture. *Plant Pathology*, 51, 561-566.
- Parthasarathy, M. V. (1974). Mycoplasma-like organisms associated with lethal yellowing disease of palms. *Phytopathology*, 64, 667-74.

- Perera P.I.P., V. Hocher., J-L. Verdeil., S. Doulbeau, D.M.D Yakandawala y L.K. Weerakoon (2007). Unfertilized ovary: a novel explant for coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports* 26,21-28.
- Perera, P. I., V. Hocher, L.K. Weerakoon, D.M.D Yakandawala, S.C. Fernando y J.L Verdeil (2010). Early inflorescence and floral development in *Cocos nucifera* L. (Arecaceae: Arecoideae). *South African Journal of Botany*, 76, 482-492.
- Pérez-Núñez MT, J.L. Chan., L. Sáenz., T. González., J.L. Verdeil & C. Oropeza (2006). Improved somatic embryogenesis from (*Cocos nucifera* L.) plumule explants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 42,37-43
- Plavsic-Banjac B., P. Hunt y M.K Maramorosch (1972). Mycoplasma-like bodies associated with lethal yellowing disease of coconut palms. *Phytopathology*, 58, 298-299
- Preece J.E. y E.G. Sutter (1991). Acclimatization of micropropagated plants to greenhouse and field, en: Debergh, P.C.; Zimmerman, R.H.(Eds.) *Micropropagation: Technology and Application*. Kluwer Academic. Dordrecht, pp. 71-93.
- Ramkhelawan, E. y C. Paul (2016). Coconut Production Technology. International Trade Centre, Geneva, Switzerland.
- Reinert, J. (1959). Über die Kontrolle der Morphogenese und die Induktion von Adventivembryonen an Gewebekulturen aus Karotten. *Planta*, 53, 318-333.
- Ríos, MC. (2011). Paquete Tecnológico Palma de Cocotero Híbrido (*Cocos nucifera* L.). INIFAP Centro de Investigación Regional Sureste Campo Experimental Chetumal Quintana Roo.
- Ríos, MC. (2013). Paquete Tecnológico para el Establecimiento y Manejo de Plantaciones Comerciales con Híbridos de Cocotero (*Cocos nucifera* L.). INIFAP Campo Experimental Chetumal Centro de Investigación Regional Sureste pp 1-15
- Sáenz, L., C. Oropeza, I. Cordova, C. Puch-Hau, R. Castillo y J.L Chan (2017). Detection of lethal yellowing phytoplasma in coconut plantlets obtained through *in vitro*

germination of zygotic embryos from the seeds of infected palms. *Annals of Applied Biology*, 171, 28-36.

Sáenz-Carbonell L., M. Montero-Córtes, T. Pérez-Nuñez., A. Azpeitia Morales, A. Andrade-Torres, I. Córdova-Lara, J.L. Chan-Rodríguez y C. Oropeza-Salín (2013). Coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryogenesis and related gene expression, en: Aslam J, Srivastava PS, Sharma MP (eds) *Somatic embryogenesis and gene expression*. Narosa Publishing House, New Delhi, pp. 172–187

Saiki RK., D.H Gelfand, S. Stoffel, S. Scharf, G. Higuchi, T. Hom, K.B Mullis y H.A. Erlich (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.

Sánchez, D. G., y G.L. Ríos (2002). Manejo de la palma de cocotero (*Cocos nucifera* L.) en México. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 8, 39-48.

Sandoval-Cancino, G., L. Sáenz, J.L. Chan y C. Oropeza (2016). Improved formation of embryogenic callus from coconut immature inflorescence explants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 52, 367-378.

Santos, G. A., P.A. Batugal, A. Othman, L. Baudouin y J.P. Labouisse (1996). *Manual on standardized research techniques in coconut breeding*.

Schaad, N.W y Frederic (2002). Real-Time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 24, 250-258

Schuiling, M. (1976) A survey of insect populations on *Cocos nucifera* [Abstract]. *Principes* 20, 67.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SENASICA) y Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) (2013). Problemas fitosanitarios del cocotero en México. Comisión Especial para el Impulso de la Palma de coco y sus derivados. [Online] Disponible en: <https://docplayer.es/54065871-Problemas-fitosanitarios-del-cocotero-en-mexico-comision-especial-para-el-impulso-de-la-palma-de-coco-y-sus-derivados.html>. [Acceso Noviembre 20 2017]

- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) (2016). Palma de coco Mexicana [online] Disponible en: <https://www.gob.mx/sagarpa>, [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257082/Potencial-Palma de Coco.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257082/Potencial-Palma_de_Coco.pdf) . [Aceso Marzo 13 2017]
- Seemüller, E., C. Marcone., U. Lauer, A. Ragozzino y M. Göschl (1998). Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *Journal of Plant Pathology* 80, 3-26.
- Shashikumar, S., y H.M. Chandrashekar (2014). An Analysis of Production and Marketing of Coconut in Tumkur District, India. *International Journal of Current Research and Academic Review*, 2, 167-175.
- Singh, R.H., G. Seepersad y L.B. Rankine (2007). CARICOM Regional Transformation Programme for Agriculture: The Regional Coconut Industry: Global Market Intelligence, pp 77
- Smith, M. K. y R.A. Drew (1990). Current Applications of Tissue Culture in Plant Propagation and Improvement. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 23,135-142
- Solís-Ramos LY., A. Andrade-Torres, L. Sáenz Carbonell, C. Oropeza Salín y E.S Castañodela (2012). Somatic embryogenesis in recalcitrant plants, en: Sato K (ed) *Embryogenesis*. InTech, Rijeka, pp. 597-618.
- Stead, D. E., D.L. Ebbels y A.W. Pemberton (1996). The value of indexing for disease control strategies. *Advances in Botanical Research*, 23, 1-26.
- Steward, F. C., M.O. Mapes y K. Mears (1958). Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *American Journal of Botany*, 45, 705-708.
- Tamay, L.; C. Ibarra y C. Velaquillo (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación a discapacidad*, 2,70-78

- TNAU (2012). Expert System for coconut. Tamil Nadu Agricultural University. Agritech Portal - Expert System. http://agritech.tnau.ac.in/expert_system/cocoteronut
- Tupinambá, E. A., J.F. da Silva y W.M. Aragão (2005). Status of coconut genetic resources research in Brazil. *Coconut Genetic Resources*, 695.
- van Duzee, E.P. (1907) Notes on Jamaican Hemiptera: a report on a collection of Hemiptera made on the island of Jamaica in the spring of 1906. *Bulletin of the Buffalo Society of Natural Science* 8, 3-79.
- Verdeil J-L., C. Huet C, F. Grosdemange y J. Buffard-Morel (1994) Plant regeneration from cultured immature inflorescences of coconut (*Cocos nucifera* L.): evidence for somatic embryogenesis. *Plant Cell Report* 13,218-221.
- Verdeil, J. L., V. Hoher, C. Huet, F. Grosdemange, J. Escoute, N. Ferrière y M. Nicole (2001). Ultrastructural changes in coconut calli associated with the acquisition of embryogenic competence. *Annals of Botany*, 88(1), 9-18.
- von Arnold, S., I. Sabala, P. Bozhkov, J. Dyachok y L. Filonova (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69, 233-249.
- Wei W., R.E. Davis., I.M. Lee y Y. Zhao (2007). "Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57 , 1855-1867.
- Woodiel, N.L. y J.H Tsai (1978) A rotary flight trap used for sampling *Haplaxius crudus* (Homoptera: Cixiidae) in coconut groves. *New York Entomological Society* 86, 37-44.
- y Aké, A. P., r. Souza., B. Maust., J.M. Santamaria y C. Oropeza (2004). Enhanced aerobic respiration improves *in vitro* coconut embryo germination and culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 40, 90-94.
- Zizumbo, D. (1996). History of coconut (*Cocos nucifera* L.) in Mexico: 1539–1810. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 43, 505-515.

Zizumbo, D., M. Fernandez, N. Torres y R. Cardeña (1999). Lethal yellowing resistance in coconut germplasm from México, en: Current Advances in Coconut Biotechnology Springer, Dordrecht. pp. 131-144.

Zizumbo, D., M.P Colunga-García, M. Fernández-Barrera, N. Torres-Hernández y C. Oropeza (2008). Mortality of Mexican coconut germplasm due to lethal yellowing. Plant Genetics. Resource. Newsletter. 156, 23-33.