



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**MICROPROPAGACIÓN A PARTIR DE TEJIDO
AÉREO DE VITROPLANTAS DE COCOTERO
(*Cocos nucifera* L.)**

Tesis que presenta

GRECIA SUMANO LÓPEZ

En opción al título de

MAESTRA EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: **Opción Biotecnología**)

Mérida, Yucatán, México

2022

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 **Grecia Sumano López** titulado “**Micropropagación a partir de tejido aéreo de vitroplantas de cocotero (*Cocos nucifera* L.)**”, fue realizado en la **Unidad de Biotecnología** en la línea de investigación de cocotero del **Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.** bajo la dirección del **Dr. Carlos Mariano Oropeza Salín** de tesis y la codirección del **Dr. Javier Orlando Mijangos Cortés**, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente



Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 31 de agosto de 2022

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación 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.



Ing. Grecia Sumano López

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección del **Dr. Carlos Mariano Oropeza Salín** y el **Dr. Javier Orlando Mijangos Cortés**.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor el Dr. Carlos M. Oropeza Salín por ser mi consejero principal dentro de este proyecto, por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y darme valiosos aportes de conocimiento, por su paciencia, dedicación constante y apoyo al formar lazos de amistad, gracias por todos los valiosos consejos que me permitieron la culminación de este trabajo.

Agradezco al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por haberme otorgado la beca No. 773896 la cual me permitió realizar mis estudios.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C. (CICY) por darme la oportunidad de trabajar en sus instalaciones y por el apoyo que me brindaron cada uno de sus servidores.

A mi comité tutorial y revisores de tesis: Doctores **Carlos M. Oropeza Salín, Javier Orlando Mijangos Cortés, Luis Sáenz Carbonell, Gabriela Sandoval Cancino y Nancy Santana Buzzy** por haberme apoyado y asesorado durante la realización de este proyecto.

A los técnicos del CICY que me brindaron su apoyo, asesoría y consejos en las diferentes etapas del proyecto: **Dra. María Narváez, M.C. Luis Mota, Ing. Gastón Herrera, IBQ. Guillermo Rodríguez, M.C. Iván Córdova, M.C. Adriana Quiroz Moreno, a la QFB. Matilde Margarita Ortiz García y Lic. Rangel Gamboa.**

A mis docentes universitarios que me brindaron su apoyo para poder ingresar a la maestría.

A mis amigos: Alberto Herrera, Alejandra Martínez, Ruth Santiago, por haberme apoyado incluso estando a distancia y por estar pendiente de mí en todo momento.

A mis amigos y compañeros del CICY: Diana Serralta, Evelyn Carrillo, Luis Herbert, Alberto Santana, Nelly Oviedo, Tiffany Cevallos, Carmen Silverio, Osmar Solís, Orlando Osorio, Jade Chi, Nataly Falcón, por los lazos de amistad que formaron conmigo y todo el apoyo que me brindaron al llegar a Mérida, por impulsarme en todo momento y por estar ahí para mí, de verdad muchas gracias.

A mis conocidos y compañeros: Aunque no conviví tanto y no los conocí mucho tiempo, me dieron consejos valiosos que me ayudaron en mi crecimiento académico y personal. Muchos son del CICY y otros son personas con las que estoy formando lazos de amistad fuertes pero todos formaron parte de esto. Se los agradezco. M.M., O.S., A.C., C.C., G.Z., C.C., L.M., U.P. M.A., E. A., P.P, L.V., Y.B., S.V., M.E.

DEDICATORIAS

A Dios

Dedico y agradezco por permitirme llegar a esta etapa de mi vida, por haberme bendecido con una gran y hermosa familia, con unos padres, hermanos y abuelos maravillosos, por brindarme buena salud, alegría, esperanza, paz, tranquilidad y brindarme la fuerza para seguir luchando día a día hasta alcanzar mis metas.

A mis amados padres

Ladislao Sumano García y Miguelina López Isidro por ser los mejores padres que Dios me pudo haber dado, por darme la vida, su amor, su cariño, su confianza y apoyo incondicional en cada momento de mi vida, por sus sabios consejos, enseñanzas, valores, por ser mis guías y modelos a seguir, por darme todo sin esperar nada a cambio, por tener siempre palabras de aliento para mí e impulsarme a que siempre siga adelante, a pesar de que no los tuve físicamente conmigo la mayor parte del tiempo pero siempre estuvieron presentes en mi día a día. ¡Los amo muchísimo!

A mis hermanos

Dante, Osmar y Briseida a cada uno de ustedes por cada momento de felicidad y alegría compartida, por las enseñanzas y cuidados, por hacerme sentir bien, por tenerme paciencia, por darme su apoyo, confianza, por formar parte de mi vida y darme consejos para seguir adelante.

A mis abuelos maternos

Saúl López Arena y Manuela Isidro Jiménez por darme todo su amor, cariño, apoyo y consejos a pesar de la distancia, por ser mis amigos y confidentes.

A mis abuelos paternos

Arnulfo Esteban Sumano Hernández (†) y Josefina García Galván (†) por los consejos y el amor que me transmitieron aún ya no estando con nosotros, a través de mis amados padres y hermanos.

A mis tíos

Celina Sumano, Reinaldo Arrazola, Victoria López, Javier Hernández, Saúl López, Abel Arrazola, y Martha Lara por haber estado al pendiente de mí y haberme brindado su apoyo en todo momento a pesar no verlos tan seguido.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I ANTECEDENTES.....	2
1.1. ORIGEN Y DISPERSIÓN.	2
1.2. CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS.	3
1.3. IMPORTANCIA Y USOS.....	3
1.4. MICROPROPAGACIÓN DEL COCOTERO.	5
1.6.1. Embriogénesis somática.....	9
1.6.1. Etapas de la micropropagación del cocotero.	10
1.4.2.1. Formación de callo embriogénico.....	10
1.4.2.2. Formación de embriones somáticos.....	10
1.4.2.3. Formación de plántulas.	10
1.5. MICROPROPAGACIÓN	10
1.6.1. Problemáticas del cultivo <i>in vitro</i>	11
1.6. VARIACIÓN SOMACLONAL.....	12
1.6.1. Factores que podrían inducir variación somaclonal.....	13
1.6.1.1. El método de cultivo <i>in vitro</i> y el patrón de desarrollo.....	13
1.6.1.2. Edad del cultivo y subcultivos.	13
1.6.1.3. El medio de cultivo y sus componentes.....	13
1.7. MARCADORES MOLECULARES.....	14
JUSTIFICACIÓN	20
HIPÓTESIS.....	21
OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	23
CAPÍTULO II FORMACIÓN DE CALLO A PARTIR DE TEJIDOS DE PARTES AÉREAS	24
2.1. INTRODUCCIÓN	24

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	25
2.2.1. Material vegetal.....	25
2.2.2. Condiciones y medio de cultivo	26
2.2.3. Experimentos realizados.....	26
2.2.3.1. Etapa de madurez de la planta y tejido adecuado (Experimento 1).	26
2.2.3.2. Réplica del experimento con plantas de 14 meses (Experimento 2).	27
2.2.3.3. Uso de solución de antioxidantes en la inducción de la embriogénesis.	27
2.2.4. Análisis estadístico.	27
2.3. RESULTADOS	28
2.3.1. Etapa de madurez de la planta y tipo de tejido adecuado.	28
2.3.1.1. Inducción	28
2.3.1.2. Multiplicación.....	29
2.3.1.2. Formación de embriones somáticos.	30
2.3.2. EXPERIMENTO REPLICA CON PLANTAS DE 14 MESES (EXPERIMENTO 2).....	33
CAPÍTULO III ESTABILIDAD GENÉTICA	34
3.1. INTRODUCCIÓN	34
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
3.2.2. Condiciones de cultivo.....	35
3.2.3. Extracción de ADN.....	35
3.2.4. Desarrollo de AFLP.....	35
3.2.4.4.3. Análisis de estabilidad genética con AFLP.....	39
3.3. RESULTADOS	40
3.3.1. Extracción de ADN.....	40
3.3.2. Desarrollo de AFLP.....	40
CAPÍTULO IV DISCUSIÓN	46
4.1. FORMACIÓN DE CALLO A PARTIR DE TEJIDOS DE PARTES AÉREAS.	46
4.2. ESTABILIDAD GENÉTICA.	47
CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	49
5.1. CONCLUSIONES GENERALES	49
5.2. PERSPECTIVAS	49

BIBLIOGRAFÍA	50
ANEXOS.....	62

Índice de Figuras

Figura 1. 1. Proceso de micropropagación del cocotero.....	6
Figura 1. 2.- Diagrama del proceso de multiplicación del cocotero. A) Proceso de explante a plántula, B) Proceso de multiplicación con embriones somáticos.....	6
Figura 1. 3.- Desarrollo de embriones cigóticos (A) Dicotiledóneas, (B) Monocotiledóneas (modificado y adaptado de Hartmann <i>et al.</i> , 1997).....	9
Figura 2. 1. Secciones de plántula de coco para producir explantes a) Plántula con hojas, b) plántula sin hojas, solo con la hoja bandera, c) áreas de cortes de los explantes de 2-5 mm. ...	25
Figura 2. 2. Explantes obtenidos y colocados en el medio de cultivo para inducir la embriogénesis somática de 2-5 mm. a) Explantes de zona superior, b) explantes de zona media, c) explantes de zona basal.....	26
Figura 2. 3. Resultados obtenidos del proceso de inducción. a) Callo no embriogénico (CNE) obtenido a los 20 días, b) explante fenolizado a los 20 días, c) Estructuras blancas aperladas (EBA) en tejido fenolizado obtenidas a los 45 días d) callo embriogénico (CE) obtenido a los 90 días.....	28
Figura 2. 4.- Resultados obtenidos del proceso de multiplicación. a) Callo embriogénico (CE). B) Estructuras embriogénicas globulares (GES) c) Estructuras embriogénicas (EES) ya separadas del callo embriogénico, d) Embriones somáticos separados de los callos embriogénicos.....	30
Figura 2. 5. Formación de embriones somáticos. a) Callos embriogénicos (CE) después de 2 ciclos de cultivo, b) callos con estructuras embriogénicas globulares (GES) a los 30 días en medio de generación de embriones.....	30
Figura 2. 6. Callos embriogénicos con embriones sin germinar a los 60 días en medio de germinación.	32
Figura 3. 1. Geles de agarosa AFLP. a) Extracción de ADN de plántulas APMx2 y Pild, M marcador molecular 1kb, b) Digestión-Ligación con las enzimas de restricción (*) EcoR1, (+)	

Mse1, (*+) EcoR1/Mse, c) Preamplificación con primers de pream Eco y pream Mse, en todas las muestras se observan las pequeñas bandas, d) Amplificación selectiva.41

Figura 3. 2. Resultados Gene Marker, a) Gel de electroforesis capilar, b) Electroferograma. ...42

Figura 3. 3. Geles de poliacrilamida. 12 juegos de primers con 5 muestras de alto del pacifico 2 (APMx2) (A1...5) y 5 de Enano verde de Pilipog (Pild) (P1...5), (M) marcador molecular 123 pb, las flechas negras indican las bandas encontradas, las flechas naranjas muestran las bandas polimórficas.....43

Figura 3. 4 Dendrograma de agrupamiento (UPGMA), de individuos de vitroplantas de cocotero de alto del pacifico (APMx2) y Enano verde de Pilipog (Pild) regenerados a partir de embriogénesis somática, utilizando marcadores AFLP (coeficiente DICE).....45

Índice de Tablas

Tabla 1. 1. Trabajos de cultivo *in vitro* en cocotero 7

Tabla 1. 2.-Trabajos de técnicas AFLP y/o microsatélites que han sido empleados para detectar variación somaclonal.....18

Tabla 2. 1. Análisis de porcentaje de formación de callo embriogénico realizado a los 90 días.29

Tabla 2. 2. Resultados del proceso de multiplicación después del primer ciclo de cultivo.....31

Tabla 2. 3. Tabla de formación de callo embriogénico después de 3 ciclos de cultivo.31

Tabla 2. 4. Porcentaje de oxidación después de 15 días de evaluación.32

Tabla 2. 5. Multiplicación del primer ciclo de cultivo a partir de explantes de plantas de 14 meses de edad.....33

Tabla 2. 6. Formación de callo embriogénico después de 2 ciclos de cultivo.....33

Tabla 3. 1. Primers utilizados.....	38
Tabla 3. 2.- Muestras de ADN obtenido.....	40
Tabla 3. 3 Resumen de análisis general de AFLP.	44
Tabla 4. 1. Porcentajes de similitud encontrados en cultivo <i>in vitro</i> mediante la técnica de AFLP en diferentes cultivos.	48

Índice anexos

Anexo. 1. Tabla de análisis estadístico de experimento de oxidación.	62
Anexo. 2. Tabla análisis general de polimorfismo en vitroplantas de cocotero.	63
Anexo. 3. Tabla análisis de polimorfismo en vitroplantas de alto del pacifico.	64
Anexo. 4. Tabla análisis de polimorfismo en vitroplantas de Enano verde de Pilipog.	65
Anexo. 5. Matriz de similitud de vitroplantas de cocotero.	66

ABREVIATURAS

Callo embriogénico	CE
Callo no embriogénico	CNE
Embrión somático	ES
Estructuras embriogénicas globulares (globular embryogenic structures)	GES
Estructuras embriogénicas	EES
Estructura blanca aperlada	EBA
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	2,4-D
Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos Amplificados	AFLP

RESUMEN

El cocotero (*Cocos nucifera* L.) es uno de los cultivos tropicales básicos en la economía agrícola de muchos países. Es considerado como una de las veinte especies cultivadas más importantes en el mundo, ya que en los últimos 10 años se han obtenido productos de valor agregado gracias a su amplia distribución y aprovechamiento de todas sus partes. Sin embargo, su producción en campo está bajando a nivel mundial, pues la mayor parte de las plantas sembradas son de avanzada edad y son susceptibles a plagas y enfermedades tales como el Amarillamiento Letal del Cocotero (ALC). Debido a esto, es necesario llevar a cabo una replantación masiva con plantas de genotipos altamente productivos y resistentes al ALC. Para ello es muy ventajoso el uso de la micropropagación a través de la embriogénesis somática, que permite la multiplicación a gran escala y en menor tiempo de las plantas seleccionadas. No obstante, los constantes subcultivos que involucra este proceso, pueden ocasionar alteraciones somaclonales. El presente trabajo está enfocado al establecimiento de un protocolo de para la generación de callos embriogénicos utilizando explantes aéreos de vitroplantas lo que favorecería la reducción de la variación somaclonal, así mismo se evaluó la presencia de variación somaclonal en clones con más de 10 años provenientes de la embriogénesis somática mediante el uso de la técnica de Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLP).

ABSTRACT

The coconut palm (*Cocos nucifera* L.) is one of the basic tropical crops in the agricultural economy of many countries. It is considered one of the twenty most important cultivated species in the world, since in the last 10 years value-added products have been obtained thanks to its wide distribution and use of all its parts. However, its production in the field is declining worldwide, since most of the plants planted are old and susceptible to pests and diseases such as Lethal Yellowing of Coconuts (LY). Due to this, it is necessary to carry out a massive replanting with plants that are highly productive and LY-resistant genotypes. For this, the use of micropropagation through somatic embryogenesis is very advantageous, which allows us to multiply the selected plants on a large scale and in less time. However, the constant subcultures that involve this process can cause somaclonal alterations. The present work is focused on the establishment of a protocol for the generation of embryogenic calluses using aerial explants of vitroplants that would favor the reduction of somaclonal variation, likewise the presence of somaclonal variation was evaluated in clones with more than 10 years coming from the somatic embryogenesis using the Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) technique.

INTRODUCCIÓN

El cocotero, *Cocos nucifera* (Linneaus, 1753), es uno de los cultivos tropicales básicos en la economía agrícola de muchos países, es considerada una de las veinte plantas cultivadas más importantes en el mundo, debido a que se encuentra ampliamente distribuida en todas las áreas tropicales, además de que se aprovechan todas sus partes para la obtención de sus productos y subproductos (FAO, 2019). Desde el punto de vista económico y social, el cocotero cubre todas las necesidades de las comunidades rurales, ya que se aprovecha el agua como única bebida potable, su aceite se utiliza para cocinar y la madera al igual que las hojas se utilizan para la construcción. De acuerdo con el FAOSTAT (2017) México ocupa el octavo lugar en cuanto a la producción de nuez a nivel mundial con el 1.92%, siendo el segundo productor de importancia en América Latina después de Brasil. Su producción en el país se ha desarrollado en 12 estados, los cuales pueden dividirse en dos zonas: el Golfo y el pacífico de México. La primera zona comprende los estados de Tabasco, Veracruz, Campeche, Yucatán y Quintan Roo, y la segunda, Guerrero, Colima, Oaxaca, Michoacán, Sinaloa, Jalisco y Chiapas (Ramos *et al.*, 2018). Sin embargo, muchas plantaciones han bajado su rendimiento debido a que las plantas sembradas son de avanzada edad y son susceptibles a plagas y enfermedades como el Amarillamiento Letal del Cocotero (ALC) (Oropeza *et al.*, 2016), la cual puede ser prevenida mediante el uso de estrategias como: utilización de material resistente, monitoreo plantas con síntomas, erradicación de plantas enfermas, manejo del vector y control de hospederos alternos de fitoplasma y con ayuda herramientas biotecnológicas como es la micropropagación mediante embriogénesis somática, para la multiplicación en gran escala y menor tiempo de plantas de genotipos resistentes al ALC.

Por otra parte la variación somaclonal es un aspecto importante dentro de la micropropagación debido a que se podrían inducir variaciones genéticas a causa de los constantes subcultivos que se realizan durante el proceso (Bairu *et al.*, 2011, Sánchez y Jiménez, 2009), es por ello que el presente trabajo está enfocado al establecimiento de un protocolo de embriogénesis somática que permita introducir el rejuvenecimiento de los cultivos *in vitro* utilizando explantes de tejido aéreo de vitroplantas para generar nuevos callos embriogénicos, pues esta estrategia podría ser útil para la reducción de la variación somaclonal, así mismo la evaluación somaclonal en clones mediante el uso de la técnica de AFLP

CAPÍTULO I ANTECEDENTES.

1.1. ORIGEN Y DISPERSIÓN.

La palabra coco proviene del portugués “cocu” con referencia al fruto, que sugiere una cara de mono (McCurrach, 1970). *Cocos nucífera* L. se distribuye en regiones tropicales y subtropicales de África, el Caribe y América del Sur. De esta especie no se conocen individuos silvestres. Su mayor variabilidad se presenta en el sureste asiático y en segundo lugar en el Caribe (Ramos *et al.*, 2018; Granados y López, 2002).

Se cree que el cocotero original fue de gran talla y con cocos de corteza gruesa; las plantas de este tipo crecen en forma natural en Filipinas y el noreste de Australia. Las variedades más productivas de porte enano, con frutos grandes y jugosos, son el resultado de la selección humana (Gibbons, 1996).

Debido a su presencia y largo historial en las regiones tropicales y subtropicales de todos los continentes, no hay certeza sobre su centro de origen. Se cree que, aunque el ancestro silvestre del coco proviene del sureste de Asia o de Sudamérica, el cual fue dispersado antes de su domesticación, hace millones de años. La gran dispersión de esta especie se atribuye a que los cocos flotantes son llevados por corrientes marinas o por acarreo del hombre en barcos como fuente de alimento y bebida, conservando su viabilidad por varias semanas. De esta manera es muy evidente su dispersión en un gran número de costas tropicales del mundo, donde el cocotero ha prosperado a pesar de las plagas, la arena, el viento, el agua salobre, etc., desarrollándose también tierra adentro (Ahuja, *et al.*, 2014; Granados y López, 2002).

En México existen dos tipos contrastantes de cocotero, en cuanto a características genotípicas. Estas corresponden, en términos generales, a las descritas por Harries (1971, 1977) como tipo silvestre “niu kafa” y tipo domesticado “niu vai”, distribuidos en América en las costas del Atlántico y del pacífico respectivamente, los cuales fueron introducidos independientemente por los españoles en el siglo XVI. Parece que la migración a América ocurrió hace al menos 500 años, por ambas costas desde el sureste de Asia debido a que las palmas de las costas de América Tropical en el Pacífico son distintas a las del Caribe, observándose claramente que las costas del Atlántico, tienen cocoteritos semejantes a los “Alto Jamaica”, mientras que en las costas del Pacífico está presente el coco “Alto Panamá” (Zizumbo-Villarreal, 1996).

La dispersión a través del Pacífico parece haber ocurrido desde Nueva Guinea a la Polinesia y de aquí a América Tropical (Ward y Brookfield (1992), no obstante que la distancia entre ellas es considerable. Específicamente se plantea que, las poblaciones de *Cocos nucífera* L., presentes en las costas del Pacífico llegaron directamente de las Islas Salomón e Islas Filipinas. Los

cocoteros de las islas caribeñas y de las costas del este de América Tropical, incluyendo los del Golfo de México, se parecen a los del oeste de África, por lo que parece razonable asumir que los progenitores procedían del sureste de Asia, vía África, o que los portugueses los introdujeron a Brasil y los españoles a otros países de América. Se conoce que los cocoteros presentes en las costas del Atlántico proceden de una introducción indirecta desde Puerto Rico, de una plantación de la región de Mozambique, de donde los portugueses obtuvieron algunas semillas que fueron transportadas y sembradas en Cabo Verde (Persley, 1992). Posteriormente fueron introducidas en América por los españoles hacia 1549 (Harries, 1977). Cabe hacer notar que, las variedades de coco enano malayo, probadas como resistentes en Jamaica, arribaron a México durante la última mitad del siglo XX, observándose en diferentes huertas de las costas del Pacífico (Guerrero y Colima), así como del Golfo y el Caribe (Tabasco, Yucatán y Quintana Roo) (Dollet *et al.*, 2009; Granados y López, 2002).

1.2. CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS.

La palma de coco (*Cocos nucifera* L.) pertenece al orden Arecales de la familia Arecaceae o Palmae (USDA, 2016), que comprende un solo género. Su número cromosómico es $2n = 32$. Es una planta monopódica que mide 12 a 25 m de alto. Su tallo esbelto y estipitoso crece más o menos torcido; a menudo es más ancho en la base, donde puede tener alrededor de 80 cm de diámetro; la porción superior del tronco raramente alcanza los 30 cm. Sus hojas se agrupan en el ápice formando un penacho. Los pecíolos de 90 a 150 cm de largo se disponen en forma envolvente dando la estructura fibrosa al tallo. Las frondas de las hojas tienen una longitud de 1.8 a 6 m; son pinnadas con folíolos de 60 a 90 cm de largo (Nampoothiri *et al.*, 2018; Lima *et al.*, 2015).

Es una planta monoica que tiene flores masculinas y femeninas reunidas en una inflorescencia que se observa envuelta por una bráctea o espádice. El fruto es una drupa de tres caras, de 20 a 30 cm de diámetro, que pesa alrededor de 1.5 kg, con epicarpio brillante, mesocarpio fibroso de color castaño a rojizo y endocarpio lignificado o “nuez” que encierra una sola semilla. El endospermo o reserva alimenticia de la semilla está formado por una porción carnosa o albuminosa y un jugo lechoso dulce, denominados respectivamente como carne y agua de coco. El endospermo carnoso seco se utiliza para producir la copra, de la cual se extrae el aceite de coco. Los frutos requieren de 9 a 10 meses para madurar (Quero, 1994).

1.3. IMPORTANCIA Y USOS.

Existen más de 100 productos que se elaboran a partir de la palma de coco, los cuales varían desde simples utensilios de uso local, hasta productos de alto valor agregado. Los productos

comerciales más importantes son la fibra del fruto, el carbón de la concha, la copra, el aceite de coco, el coco deshidratado y la leche de coco (SAGARPA, 2017; Granados y López, 2002).

El tallo por su resistencia y flexibilidad suelen utilizarse localmente como producto maderable en la construcción de casas y fabricación de muebles, las hojas se aprovechan para el techado de viviendas y en la fabricación de múltiples objetos artesanales. Las yemas terminales se comen en ensalada o en guisos, de los racimos jóvenes de flores de se obtiene un jugo dulce o ponche muy dulce que contiene un 16% de sacarosa. De ella se obtiene azúcar de palma o bien se hace fermentar para elaborar aguardiente, vino de palma (“tuba”), “arrak” o vinagre (Ahuja, *et al.*, 2014).

La parte fibrosa del fruto o cáscara conocida como estopa de coco tiene numerosos usos, por ejemplo, en la fabricación de ropa fina resistente al agua de mar y en general en la manufactura de cepillos, cordeles, sogas, alfombras, filtros, etc. Además, por su alto contenido de lignina es un buen combustible (Lizano *et al.*, 2018; Granados y López, 2002).

La concha o porción dura del fruto (endocarpio) es utilizada para fabricar diversos utensilios caseros y objetos artísticos, tiene una composición similar a las maderas duras, alto contenido de lignina y menor de celulosa, por lo que se utiliza directamente como combustible o para elaborar carbón combustible y carbón activado (Lizano *et al.*, 2018).

Semilla. En comunidades y pueblos, donde se desarrolla la palma de coco, de la semilla se extrae la parte blanca o “carne” y la “crema”, los cuales son la base de muchos platillos, antojos y postres, de la porción carnosa madura y seca en tiras delgadas y para la elaboración de dulce de coco, por otra parte, del coco fresco se obtiene una bebida refrescante muy apreciada, que puede mezclarse, por ejemplo, con bebidas alcohólicas. (Nampoothiri *et al.*, 2018). Recientemente ha sido usada por los fisiólogos vegetales como promotora del crecimiento (Trisnarningsih, and Wahyuni, 2020).

Coco seco. La carnosidad blanca se pulveriza, pasteuriza, seca y empaca, para ser procesado posteriormente en la industria de la confitería, en panadería, como saborizante y relleno de alimentos empacados, como ingrediente para cocinar. La leche de coco (crema) es el extracto blanco obtenido de la filtración de la carne molida del coco. Se comercializa envasado como líquido y en polvo. Es un ingrediente común en muchas recetas gastronómicas. En Filipinas se elabora miel de coco al mezclar leche de coco con azúcar morena. En Indonesia, se ha desarrollado un producto denominado “tempeh”, por medio de la fermentación de la leche de coco utilizando un cultivo especial de bacterias.

El principal objetivo industrial de la palma de coco es la producción de copra, la cual contiene aproximadamente 63% de aceite, el resto lo constituye la harina, la humedad y los desperdicios

de los usos que se le da al aceite de coco es la producción de detergente de ropa, jabón de tocador, shampoo y cosméticos gracias al alto contenido de ácido láurico que le proporciona al jabón buenas cualidades de solubilidad al enjuague y una sensación de sedosidad y tibieza en la piel, aunado a su carácter relativamente no aceitoso, como suavizador de combustibles y sustituto de aceite diesel, su consumo no se ve favorecido dado que son más baratos los derivados del petróleo (Ahuja, *et al.*, 2014).

1.4. MICROPROPAGACIÓN DEL COCOTERO.

El cocotero es propagado generalmente de forma sexual por semilla. La propagación asexual de cocotero se inició con los trabajos exitosos reportados por Eeuwens (1976, 1978) y Eeuwens y Blake (1977) quienes identificaron los requerimientos minerales, orgánicos reguladores del crecimiento para la producción de callo a partir de explantes de tallos, hojas e inflorescencias de cocotero maduro, a esta nueva formulación mineral se le denominó Y3.

Recientemente ha sido posible la inducción de la embriogénesis y regeneración a partir de inflorescencias inmaduras (Verdeil y Buffard-Morel, 1995) y de plúmula (Oropeza y Chan, 1995; Chan *et al.*, 1998). En la actualidad la investigación desarrollada para la micropropagación de cocotero se realiza por medio de la embriogénesis somática a partir de explantes de inflorescencias y de plúmula (Sandoval-Cancino *et al.*, 2018; Pérez-Nuñez *et al.*, 2006), ya que a la fecha solo se ha encontrado un reporte que indique la formación de brotes por organogénesis del cual se desconoce el nivel de eficiencia (Wilms *et al.*, 2021) mientras que a partir del explante de plúmula se ha tenido mayor eficiencia y se han regenerado plantas de manera más reproducible (Figura 1.1 y 1.2). En la tabla 1.1 se muestran los estudios de cultivo *in vitro* realizados en cocotero.

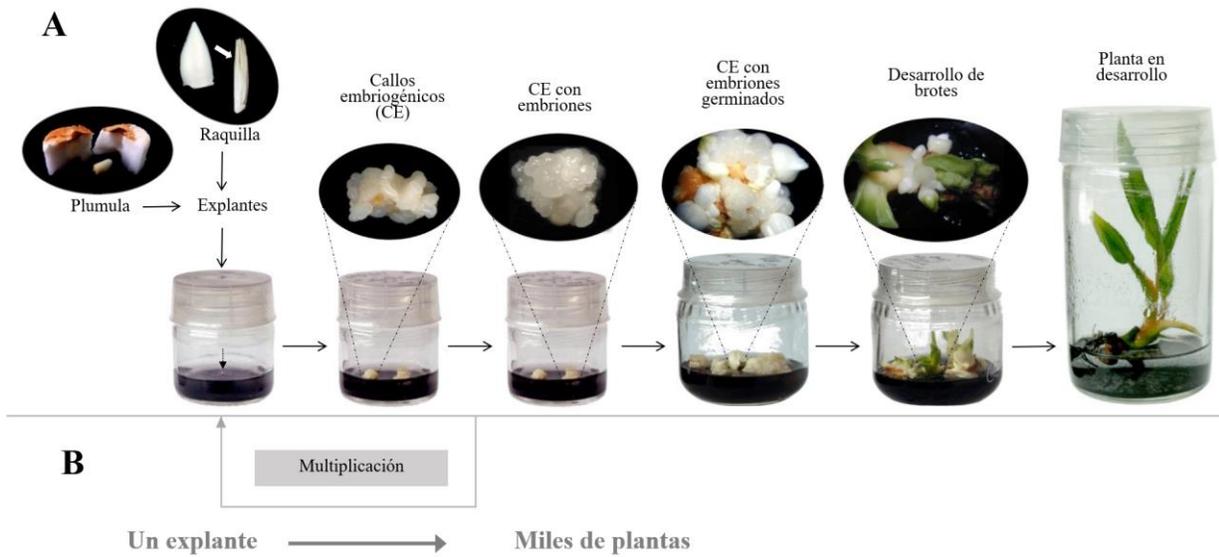


Figura 1. 1. Proceso de micropropagación del cocotero.

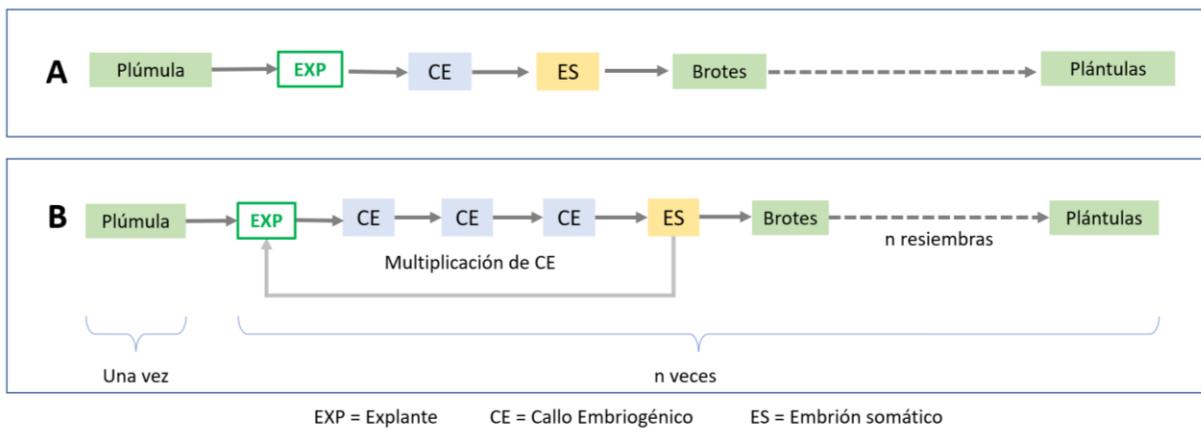


Figura 1. 2.- Diagrama del proceso de multiplicación del cocotero. A) Proceso de explante a plántula, B) Proceso de multiplicación con embriones somáticos.

Tabla 1. 1. Trabajos de cultivo *in vitro* en cocotero

Explante	Medio	Resultados	Referencia
Tallos, hojas e inflorescencias	White, Heller y Murashige y Skoog.	Formulación mineral denominada Y3.	Eeuwens (1976, 1978)
Explantos de tallo	Y3	Obtención de células meristemáticas en presencia de BAP.	Apavatrut y Blake (1977)
Hojas inmaduras	Eeuwens (1976) y vitaminas de Morel y Wetmore (1951).	Obtención de estructuras nodales.	Pannetier y Buffard-Morel (1982)
Explantos de tallo, hoja y raquis de árboles maduros de 20 años	Y3	Las hojas cultivadas en 2,4-D formaron estructuras globulares.	Gupta <i>et al.</i> (1984)
Embriones inmaduros de 6 a 8 meses después de la polinización	De Fossard	Formación de callos embriogénicos y germinación.	Karuanatne Periyapperuma (1989)
Inflorescencia inmadura	Macronutrientes del MS y micronutrientes del medio Y3.	Carbón activado causa cambio en la disponibilidad del 2,4-D.	Ebert y Taylor (1990)
Explantos foliares	Eeuwens (1976) y vitaminas de Morel y Wetmore (1951).	Los embriones primarios se originan de divisiones mitóticas en células perivasculares, donde se producen áreas meristemáticas.	Buffard-Morel <i>et al.</i> (1992)
Hoja e inflorescencias	Y3 y vitaminas de Morel y Wetmore (1951).	Se obtuvieron plántulas <i>in vitro</i> de cinco clones de genotipo diferente, pero con muy baja eficiencia.	Verdeil <i>et al.</i> (1992)
Inflorescencias	Y3 y vitaminas de Morel y Wetmore (1951).	Desarrollo de protocolo, pero con baja eficiencia.	Verdeil <i>et al.</i> (1994)

Plúmula	MS	Encontraron que la plúmula es un tejido más responsivo.	Oropeza y Chan (1995)
Plúmula	Y3	Desarrollo de un protocolo que permite la regeneración del cocotero en forma reproducible, pero con baja eficiencia.	Chan <i>et al.</i> (1998)
Embriones de nuez	Y3 (Eeuwens, 1976), modificado por Rillo y Paloma (1992) con la adición de carbón activado (2.5 gl 21).	Importancia del extremo del micropilo de los embriones cigóticos de coco expuestos al aire volumen del recipiente de cultivo <i>in vitro</i> para maximizar la eficiencia de germinación y posterior conversión a plántulas.	Pech <i>et al.</i> (2004)
Embriones de plumula	Y3 (Eeuwens 1976).	Mejoramamiento en la calidad de explantes utilizando la embriogenesis somática secundaria.	Perez-Nuñez <i>et al.</i> (2006)
Embriones de nuez	Y3 (Rillo y Paloma., 1992), con la adición de carbón activado (2,5 gl ⁻¹) y GA ₃ en germinación.	Mejoramamiento en el los porcentajes con el uso de GA ₃ en germinación, conversión y desarrollo de uniformidad.	Pech <i>et al.</i> (2007)
Embriones obtenidos por embriogenesis somatica secundaria	Y3, suplementado con gel-rite® sacarosa y carbón activado	La expresión del gen CnSERK está asociado con la inducción de embriogénesis somática en coco.	Perez-Núñez <i>et al.</i> (2009)
Plúmula	Y3	Entre mayor sea la variación de carbón activado, mayor será la variación de 2,4-D.	Saenz <i>et al.</i> (2010)
Estrucutras embriogénicas	Y3, suplementado con gel-rite® sacarosa y carbón activado	Los explantes de estructura embriogénica con el ionóforo A23187 promueven la embriogénesis somática.	Rivera-Solis <i>et al.</i> (2018)
Inflorescencias inmaduras	Y3 (Eeuwens 1976).	Con este protocolo es posible clonar palmas frutales de interés debido a su productividad, resistencia a enfermedades, etc.	Sandoval <i>et al.</i> (2016)
Embriones	Y3 Eeuwens (1976) adicionado con gelrite® y 2,4-D.	El proceso SE del coco se caracteriza por cambios significativos en la metilación del ADN, morfogénesis y expresión génica.	Osorio <i>et al.</i> (2020)

1.6.1. Embriogénesis somática

La embriogénesis somática es un proceso en el que una estructura bipolar, con un eje radical y uno apical, se asemeja a un embrión cigótico, y se desarrolla a partir de una célula somática, además no tiene conexión vascular con el tejido original (Von Arnold *et al.*, 2002).

Los embriones somáticos *in vitro* pueden provenir de células que pasaron por un proceso de dediferenciación, como en callos o suspensiones celulares, en lo que se conoce como ES indirecta o, sin pasar por ese proceso de dediferenciación, en lo que se denomina ES directa (Von Arnold, 2008). Por otra parte, los embriones obtenidos a través de la embriogénesis somática secundaria suelen ser más desarrollados que los obtenidos a través de la es primaria (Pérez-núñez *et al.*, 2006). La formación de embriones somáticos es similar a la formación de embriones cigóticos, en el caso de las monocotiledóneas, los embriones pasan por diferentes etapas de histodiferenciación, las cuales son globular, escutelar y coleptilar, a diferencia de las dicotiledóneas que pasan por globular, corazón y torpedo (Hartmann *et al.*, 1997; Montero, 2009).

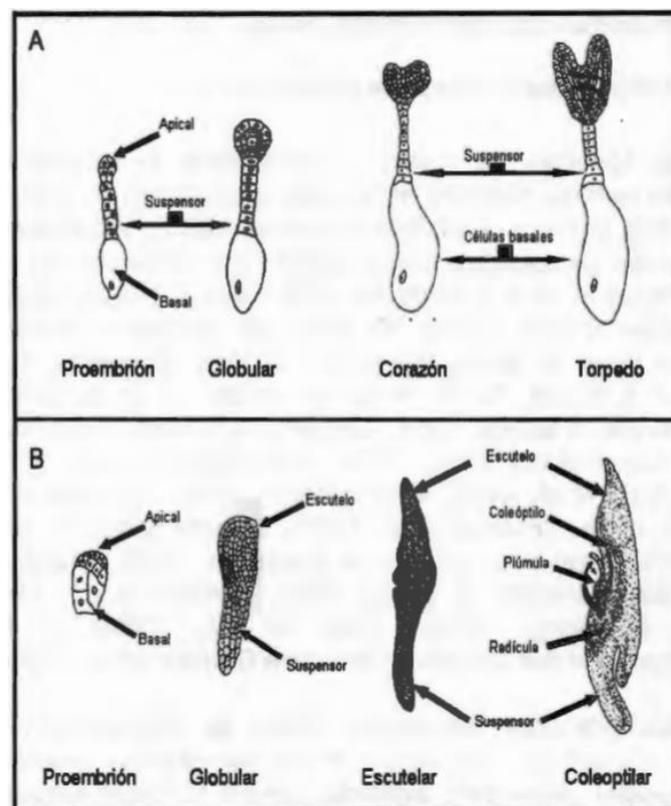


Figura 1. 3.- Desarrollo de embriones cigóticos (A) Dicotiledóneas, (B) Monocotiledóneas (modificado y adaptado de Hartmann *et al.*, 1997).

1.6.1. Etapas de la micropropagación del cocotero.

Básicamente en los protocolos desarrollados se identifican tres etapas: Formación de callo embriogénico, formación de embriones somáticos y formación de plántulas (Azpeitia, 2003).

1.4.2.1. Formación de callo embriogénico.

La formación de callo embriogénico en el caso de plúmula generalmente ocurre después de 3 meses y hasta 6 meses con explantes de inflorescencia. El medio de cultivo utilizado generalmente se basa en el reportado por Eeuwens (1976), el cual contiene 2,4-D en diferentes concentraciones dependiendo del tipo de carbón activado utilizado ya que este causa la adsorción de esta fitohormona.

1.4.2.2. Formación de embriones somáticos.

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

1.4.2.3. Formación de plántulas.

Las plántulas se subcultivan en 50 ml de medio, el cual es cambiado cada 6 semanas hasta que se desarrollen tres hojas bífidias y tres raíces primarias. Al final del cultivo *in vitro*, se colocan bolsas de isopropileno isotáctico en la parte superior de los recipientes de 500 ml, para que las plántulas tengan más espacio y puedan crecer mejor y se aclimaten poco a poco (Pech *et al.*, 2004).

1.5. MICROPROPAGACIÓN

La propagación *in vitro* o micropropagación de especies vegetales permite evaluar propiedades específicas a la hora de cultivar cada especie vegetal *in vitro*. Algunas características pueden ser controladas en el laboratorio para poder determinar su actividad biológica vegetal, por ejemplo, parte del proceso de aclimatización, la velocidad de crecimiento, la viabilidad, la regeneración, etc. El desarrollo de las diferentes vías del cultivo de tejidos se basa en la totipotencialidad de las células vegetales para regenerar una planta completa idéntica a la original a partir de algo más simple como un órgano (Alcántara *et al.*, 2017).

Los sistemas *in vitro* se agrupan básicamente en cinco etapas que consisten en:

1. Selección de la fuente del explante: Las plantas seleccionadas deben presentar características importantes durante el proceso como por ejemplo que sean plantas sanas, vigorosas, con estabilidad climática, etc.
2. Establecimiento del medio de cultivo: la adecuada selección de los medios de cultivo es fundamental para el éxito en el cultivo de los tejidos vegetales. El medio básico utilizado no puede suplir el desarrollo de todas las células; es necesario realizar cambios para obtener las respuestas requeridas en el crecimiento de un explante. Generalmente; los medios de cultivo contienen sales inorgánicas, reguladores de crecimiento vegetal, vitaminas, carbohidratos y un agente gelificante, aunque no siempre este último es indispensable. Se pueden agregar otros compuestos, como aminoácidos, antioxidantes, retardantes, complejos naturales, entre otros, dependiendo del tipo de explante y del propósito del trabajo.
3. Desarrollo del tejido: el empleo de los sistemas *in vitro* varía dependiendo de la composición del medio de cultivo y del explante seleccionado es importante tener en cuenta que la morfología y el tejido varían, así como las condiciones ambientales a las que se encuentran expuestos. En esta etapa se lleva a cabo la multiplicación y la formación de brotes. Es importante resaltar que cada uno de los procesos de propagación vegetal requiere un equilibrio hormonal para lograr los resultados deseados sin producir alteraciones fisiológicas que puedan afectar el óptimo desarrollo de los explantes.
4. Enraizamiento y acondicionamiento: dependiendo de la especie, en ocasiones los brotes generan la formación de raíces durante la etapa de multiplicación; sin embargo, resulta más exitoso el comportamiento *ex vitro* si se realiza un diseño exclusivo para la etapa de enraizamiento y acondicionamiento. Las condiciones en las que se encuentran las plántulas en el laboratorio son muy diferentes a las condiciones de exterior y se requiere de un proceso especial.
5. Adaptación de las plántulas: las plántulas desarrolladas *in vitro* son transferidas a condiciones de exterior; necesitan un proceso de adaptación con el fin de proporcionar estabilidad en campo. Las plántulas se trasplantan en sustratos estériles y son monitoreadas bajo invernadero, con estricta atención en los procesos fisiológicos que requieren.

1.6.1. Problemáticas del cultivo *in vitro*

Durante el establecimiento del cultivo *in vitro* pueden presentarse algunos problemas dependiendo del cultivo o de la variedad con la que se trabaje. Uno de los principales problemas

que se presentan son la contaminación por microorganismos fúngicos o bacterias presentes en el interior o en el exterior de los explantes, así como también puede ser la presencia de plagas artrópodas como los ácaros y las fallas en los procedimientos de cultivo en el laboratorio (Murillo y Aguilar, 2021). Estos contaminantes son los responsables de ocasionar la muerte del tejido debido a que pueden modificar el pH, competir por los nutrientes y modificar el medio de cultivo (Sharry *et al.*, 2015).

Otro problema común en los cultivos *in vitro* es la llamada oxidación o ennegrecimiento que se manifiesta como un oscurecimiento del tejido vegetal y se puede definir como la oxidación por radicales libres de diferentes componentes celulares, generando daño, inhibición del crecimiento y en los casos graves incluso la necrosis y muerte del tejido. Los estresores en los cultivos *in vitro* se relacionan principalmente con el efecto abrasivo causado por los agentes desinfectantes en la asepsia del explante, los cortes del explante, los cambios en el pH, la composición del medio de cultivo, como así también el volumen, la calidad del frasco de cultivo y las condiciones ambientales a las que se encuentra sometido en el laboratorio (Van Staden *et al.*, 2006). En la práctica existen varias estrategias para eludir los procesos de oxidación, cabe aclarar que un único método no siempre es suficiente, todo depende de la complejidad del problema. Entre las mismas podemos enumerar las siguientes: 1) usar explantes en estado juvenil o en crecimiento activo; 2) disminuir la intensidad de la luz de cultivo; 3) disminuir la temperatura de cultivo; 4) realizar subcultivos con frecuencia; 5) cultivar el explante en medio líquido; 6) agregar antioxidantes al medio de cultivo; 7) disminuir el pH del medio de cultivo; 8) agregar adsorbentes como carbón activado al medio de cultivo; 9) disminuir la duración de la esterilización del explante o cambiar el agente desinfectante; 10) incrementar las sales de calcio; 11) reducir los niveles de nitrato (Sharry *et al.*, 2015).

1.6. VARIACIÓN SOMACLONAL

Durante el cultivo *in vitro* de plantas, puede existir una variabilidad genética que surge como consecuencia de la dediferenciación celular (Medina *et al.*, 2007). Este proceso denominado variación somaclonal por Larkin y Scowcroft (1981), involucra cambios fenotípicos y genéticos en las plantas regeneradas. Esta variación depende del genotipo, de la fuente de explante, del tiempo en que el material ha estado sometido al cultivo *in vitro*, de las condiciones y composición del medio de cultivo y de la vía de regeneración (Cardone y Picca, 2000).

1.6.1. Factores que podrían inducir variación somaclonal

Además de la tasa normal de variación, propia de las células vegetales en condiciones normales, formando parte de un tejido, en un órgano y planta intactos, hay factores externos, propios del cultivo *in vitro*, que pueden inducir acumulación de variaciones genéticas y epigenéticas, que se manifiestan en el fenotipo. Algunos factores externos son: (1) método de cultivo *in vitro* y patrón de desarrollo, (2) edad del cultivo y subcultivos, y (3) algunos componentes del medio de cultivo (Sánchez y Jiménez, 2009). Por otra parte, de acuerdo con Martinelli y col. (2001) se pueden obtener cultivos de largos periodos mediante el uso de la embriogénesis somática secundaria, ya que esto permite tener una conservación indefinida de cultivos embriogénicos.

1.6.1.1. El método de cultivo *in vitro* y el patrón de desarrollo.

La variación somaclonal se puede generar en todos los métodos comúnmente empleados para el cultivo *in vitro* de plantas (cultivo de yemas, organogénesis y embriogénesis somática) (George, 1993). Sin embargo, el patrón de desarrollo que sigue un explante durante su morfogénesis *in vitro* es un elemento clave que se relaciona con la variación somaclonal. Por ejemplo, cuando un tejido altamente diferenciado pasa por una etapa de dediferenciación con una alta tasa de división celular, se puede generar mayor variación somaclonal que cuando ocurre un desarrollo directo hacia regeneración a partir de yemas apicales, axilares y embriones (Sahijram *et al.*, 2003; Cardone *et al.*, 2004).

1.6.1.2. Edad del cultivo y subcultivos.

La proporción de variantes somaclonales aumenta en cultivos envejecidos y en plantas con varios subcultivos (Cardone *et al.* 2004). Lo anterior probablemente se debe a la acumulación de alteraciones genéticas, cambios epigenéticos y mutaciones (Pierik, 1997; Sahijram *et al.*, 2003; Cardone *et al.*, 2004). En ese sentido, Sahijram *et al.* (2003) mencionan que la variación somaclonal puede aparecer después de tres a ocho subcultivos.

1.6.1.3. El medio de cultivo y sus componentes.

La composición del medio de cultivo es otro de los factores que puede inducir variación somaclonal. Se ha encontrado que los reguladores de crecimiento, principalmente aquellos con naturaleza auxínica, pueden promover la metilación del ADN, causando así cambios epigenéticos (George, 1993; Brar y Brar, 1998; Rakoczy-Trojanowska, 2002; Sahijram *et al.*, 2003). El estado físico del medio de cultivo (líquido o sólido) también puede influir en la aparición de variantes somaclonales, ya que un mismo tejido se comporta de diferente manera frente a los factores físicos asociados (oxigenación, tensión superficial y daños mecánicos). Por ejemplo, una

deficiencia en la oxigenación del callo causa la producción de etanol que puede actuar como mutágeno (Cardone *et al.* 2004). En otro ejemplo, se encontró que explantes de piña (*Ananas comosus* cv. *Amarelinho*) cultivados en un sistema de inmersión temporal (medio líquido) presentaron tasas mayores de variación somaclonal que en cultivos semisólidos (Feuser *et al.* 2003).

1.7. MARCADORES MOLECULARES

Los marcadores son caracteres que diferencian a un organismo de otro y tienen gran importancia en estudios evolutivos y de variabilidad, usándose principalmente en la diferenciación de individuos, discriminación entre clones, análisis filogenéticos, taxonómicos y mejora genética (Rico Cabanas, 2005). Proporcionan estimaciones directas de las frecuencias génicas y genotípicas, así mismo pueden detectar si las plantas son homocigotas o heterocigota, permiten analizar gran cantidad de caracteres de manera independiente, mientras que el análisis morfológico permite analizar un menor número, a menudo de dudosa homología. Son independientes del medio ambiente, por lo tanto, proporcionan un enfoque poderoso para comprender los patrones de distribución de la diversidad genética que se puede utilizar para ajustar la colecta, evaluación y estrategias de mejoramiento a fin de obtener la máxima variación de una población silvestre (Morikawa y Leggett, 1990). Existen tres tipos de marcadores: morfológicos, bioquímicos y moleculares.

Los avances en biología molecular han permitido el desarrollo de métodos de identificación basados en marcadores moleculares que superan casi todas las limitantes de los morfológicos, principalmente las influencias del medio ambiente. El uso de técnicas moleculares en el estudio de la diversidad genética ha contribuido a una mejor comprensión de la diversidad existente en algunas especies (Karp, 2002; Hodgkin *et al.*, 2001). El incremento en el uso de técnicas moleculares en los estudios de diversidad genética se basa en los siguientes hechos: La selección del tipo de marcador que se empleará constituye un aspecto importante ya que de él dependerá del objetivo del estudio que se pretende abordar y de la biología de la especie, sin olvidar que todas las técnicas moleculares presentan ventajas, limitaciones y su aplicación dependerá, en última instancia, de la disponibilidad de recursos para ejecutar un sistema de marcadores moleculares dado (Coto, 2005).

Adams y colaboradores (1992), argumentaron que los métodos moleculares usados en muestras de tejido colectado en campo proporcionan una manera eficaz de optimizar la diversidad colectada y minimiza el número de muestras que debían ser mantenidas en bancos de

germoplasma. Por esta razón, durante los últimos años, la Red Internacional de Recursos Genéticos en Coco (en inglés The International Coconut Genetic Resources Network y su sigla COGENT) y una serie de otros donantes han apoyado el desarrollo de marcadores moleculares para el coco.

Los marcadores más usados son los análisis de patrones de isoenzimas, microsatélites o Secuencias Simples Repetidas (SSR), Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP por sus siglas en inglés), Amplificación Aleatoria del ADN Polimórfico (RAPD por sus siglas en inglés), Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLP por sus siglas en inglés), etc. (Azofeifa–Delgado, 2006; Rico–Cabanas, 2005; Ude *et al.*, 2002). Estos marcadores moleculares son fenotípicamente neutros, presentan mayor segregación o polimorfismo que los morfológicos, pueden ser evaluados desde los primeros estados de desarrollo de las plántulas, son aplicables a cualquier tipo de material vegetal, son independientes de la época del año en que se realiza el análisis, permiten la identificación correcta de la variedad sin necesidad de muchos caracteres y están libres de los efectos epistáticos (Azofeifa–Delgado, 2006).

El análisis por RFLPs es una técnica que procesa la digestión del ADN extraído con enzimas de restricción y los fragmentos resultantes son separados por electroforesis en un gel de acuerdo con su tamaño (Karp *et al.*, 1996)

El método de RAPD fue descrito en detalle por Williams *et al.* (1990). Generan un número grande de banda polimórfica y, al contrario de los RFLPs, no requieren de sondas específicas para cada especie y la cantidad de ADN necesaria para el análisis es mucho menor (Phillips *et al.*, 1995). Técnicamente, RAPD ha sido descrito como una versión de PCR utilizando primers arbitrarios para detectar la variación de ADN (Weising *et al.*, 2005).

El análisis por AFLP (Vos *et al.*, 1995), es esencialmente la combinación de una digestión con enzimas de restricción, adición de adaptadores y de amplificación por PCR, presenta un grado de reproducibilidad mucho mayor. Los AFLP representan una combinación del poder de RFLP y la flexibilidad de la técnica basada en PCR (Agarwal *et al.*, 2008). Este marcador dominante es una herramienta mucho más poderosa que los RAPDs porque permite amplificar secuencias más largas de oligonucleótidos (lo que incrementa significativamente la especificidad), además de que no requiere información previa de la secuencia del ADN (Picca *et al.*, 2004). Son utilizados para estudiar la variación somaclonal inducida durante el cultivo de tejidos tales como café (Sánchez–Teyer *et al.*, 2003), *Echinacea purpurea* (Chuang *et al.*, 2009), alcornoque (Hornero *et*

al., 2001) y plátano (James *et al.*, 2004). Sin embargo, esta técnica requiere mayor trabajo de optimización y es relativamente más cara que RAPD (Weising *et al.*, 2005). Esta técnica es utilizada en estudios de variación genética debido a que se basa en el polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados (del inglés Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP). Este tipo de marcador molecular se usó para estudiar 42 palmas de cocotero, permitiendo detectar mayor variación en las formas altas con respecto a las intermedias y las enanas. Otros resultados interesantes se relacionan con la demostración a nivel molecular, es la mayor similitud que se presenta entre diferentes grupos de variedades de cocotero, lo que facilita el manejo el germoplasma y optimiza la selección de progenitores genéticamente divergentes para la realización de cruzamientos (Perera *et al.*, 1998).

Actualmente, uno de los marcadores más usados debido a su alto polimorfismo, herencia codominante y reproducibilidad son los microsatélites, conocidos también como secuencias simples repetidas (Simple Sequences Repeats, SSR), los cuales se han utilizado con éxito para detectar y cuantificar la variabilidad genética en la especie *Cocos nucifera* L. (Baudouin y Lebrun, 2002).

Barker y colaboradores (2000), reportaron que la Oficina para el Desarrollo de la Investigación sobre Cultivos Oleaginosos tropicales perennes (en inglés The Bureau for the Development of Research on Tropical Perennial Oil Crops y su sigla BUROTROP) apoyó la investigación hecha por el Centro de cooperación internacional en investigación agronómica para el desarrollo (en francés Centre de cooperation internationale en recherche agronomique pour le developpement y su sigla CIRAD) de Francia, en donde se desarrolló un juego de marcadores moleculares microsatélites y un software específico. El juego, que consta de 14 loci microsatélites, fue desarrollado y probado en 681 cocoteros que representan una amplia diversidad. El método permite al usuario comparar la muestra con un conjunto de poblaciones de referencia y clasificar estas poblaciones en orden decreciente de probabilidades para identificar el origen de la muestra. Es una herramienta muy eficiente para estudios de diversidad y la identificación de accesiones de germoplasma. La transferencia de esta tecnología a los países en los que las colecciones de germoplasma de coco se encuentran, mejorará la eficiencia y reducirá costos en la conservación, caracterización, gestión y utilización de muestras de germoplasma para la obtención de variedades mejoradas (Lebrun *et al.*, 2001).

Con el empleo de los microsatélites, se detectó también polimorfismo en una muestra de 20 poblaciones de cocotero, que contenía ecotipos altos y enanos procedentes del Banco de

Germoplasma de Filipinas. Los 38 marcadores SSR utilizados detectaron un total de 198 alelos en dicha muestra (Teulat *et al.*, 2000).

Además, un grupo de ocho combinaciones de primers de microsatélites fue utilizado para estudiar los niveles y la distribución de la variabilidad genética en 33 poblaciones de cocotero en Sri Lanka, con el objetivo de formular estrategias futuras de colecta y selección de progenitores de interés para el mejoramiento (Perera *et al.*, 2001). Entre los resultados obtenidos por estos autores se destacan los altos niveles de variación intrapoblacional para la población de cocoteros nativa, lo que sugiere un origen común y la existencia de una base genética estrecha para los cocoteros altos de Sri Lanka, donde solo cuatro poblaciones introducidas se separaron claramente en el dendrograma. La importancia de este resultado se acentúa al conocerse que esta variedad de cocotero es la de mayor explotación comercial.

Otra utilidad que han tenido los microsatélites en cocotero está relacionada con el análisis de paternidad. En este sentido, estos marcadores resultaron útiles en un estudio realizado con 30 progenies de 'Enano de Fiji', propagadas de cinco progenitores y rodeadas por otros cultivares, y fue posible estimar que solamente el 20% de las progenies fueron el resultado de cruzamientos, mientras el 40-46% fueron identificados como posibles autofecundaciones (Meerow *et al.*, 2003).

Asimismo, las herramientas moleculares han sido utilizadas para la construcción de mapas de ligamiento, así como, en la identificación de marcadores de locus de caracteres cuantitativos (del inglés Quantitative Trait Locus, QTL). El primer mapa de ligamiento del cocotero fue presentado por Rohde *et al.* (1999). Mientras que Herrán *et al.* (2000) construyeron un mapa de ligamiento a partir de cruces entre genotipos altos y enanos e identificaron QTL para la precocidad de la germinación. Por otra parte, el primer mapa de ligamiento que involucra poblaciones adultas fue presentado por Lebrun *et al.* (2001), el cual permitió la investigación de QTLs para los componentes del rendimiento. A su vez, Baudouin *et al.* (2006) investigaron los factores genéticos que controlan los componentes del fruto en cocotero mediante este análisis en una progenie del genotipo alto de las Islas de Rennell. Por lo tanto, actualmente existe un conjunto de herramientas disponible para estimar la diversidad genética antes de la colecta para facilitar la localización de germoplasma y tomar las decisiones adecuadas de conservación.

Tabla 1. 2.-Trabajos de técnicas AFLP y/o microsatélites que han sido empleados para detectar variación somaclonal.

TÉCNICA MOLECULAR	CULTIVO	OBJETIVO	RESULTADO	REFERENCIA
AFLP	<i>Actinidia deliciosa</i> (kiwi)	Evaluar la variación genética en plantas regeneradas de callos	Callos provenientes de hojas o tallos presentaron cierta variación entre clones (similitud del 73-90%).	Prado <i>et al.</i> (2007)
AFLP	<i>Coffea arabica</i> y <i>C. canephora</i> (café)	Evaluar la variación somaclonal en embriones somáticos de híbridos mejorados	Dependiendo del genotipo, se encontró entre 3% y 10% de variación somaclonal	Etienne <i>et al.</i> (2002)
AFLP / Southern Blot	<i>Elaeis guinensis</i> (palma aceitera)	Evaluar variación en plantas regeneradas y la sensibilidad a la metilación enzimática	Durante el cultivo de tejidos se redujo la metilación	Matthes <i>et al.</i> (2001)
AFLP / SSR	<i>Glycine max</i> (soya)	Evaluar variación somaclonal en líneas comerciales cultivadas <i>in vitro</i> a partir de cotiledones	En el proceso de regeneración se produjeron mutaciones. Las variantes somaclonales no presentaron diferencias fenotípicas con respecto a las plantas silvestres al ser evaluados en campo	Jung <i>et al.</i> (2004)
AFLP	<i>Hordeum vulgare</i> (cebada)	Evaluar la estabilidad genética en plantas derivadas de androgénesis y embriogénesis somática	Se encontró un promedio del 6% de variación somaclonal	Bednarek <i>et al.</i> (2007)

AFLP/ SSR / RFLP /RAPD/STS	<i>Humulus lupulus</i> (lúpulo)	Evaluar la variabilidad somaclonal en meristemos de plantas <i>in vitro</i> antes y después de termoterapia	Termoterapia incrementó frecuencia en cambios moleculares de 54 a 70 %. Se detectaron diferencias moleculares al emplear SSR y RAPD.	Patzak (2003)
AFLP	<i>Papaver bracteatum</i> (adormidera de Siberia)	Evaluar la estabilidad genética en plantas regeneradas de callos	No se detectó variación somaclonal y se determinó que las plantas eran híbridas	Carolan <i>et al.</i> (2002)
SSR	<i>Quercus suber</i> (roble, alcornoque)	Determinar la estabilidad genética de callos embriogénicos provenientes de plantas adultas y jóvenes	Se observó los mismos patrones en todas las muestras analizadas, excepto en un genotipo que presentó 2,5% de mutación	Lopes <i>et al.</i> (2006)
AFLP	<i>Secale cereale</i> L. (centeno)	Evaluar factores inductores de la variación somaclonal, así como frecuencia, distribución y mecanismos	En dos plantas se concentró el 49% de los cambios. La mitad de las plantas regeneradas presentaron seis o menos cambios por planta	Puente <i>et al.</i> (2004)
AFLP / microsatélites/ RAPD	<i>Saccharum</i> sp. (caña de azúcar)	Evaluación de la variación somaclonal en plantas transgénicas	Plantas provenientes de cultivos celulares transgénicos presentaron mayor variación somaclonal que cultivos no transgénicos.	Arencibia <i>et al.</i> ,(1999)
AFLP	<i>Syngonium odophyllum</i>	Analizar las diferencias genéticas entre cultivares obtenidos de variantes somaclonales.	Variantes somaclonales presentaron diferencias genéticas de 0,4%-1,2%	Chen <i>et al.</i> (2006)
Microsatélites SSR	<i>Cocotero (Cocos nucifera)</i>		Se han utilizado con éxito para detectar y cuantificar la variabilidad genética en <i>Cocos nucifera</i> L.	Baudouin y Lebrun, (2002)

JUSTIFICACIÓN

La micropropagación de cocotero tiene un gran potencial como herramienta biotecnológica para la producción masiva de plantas seleccionadas por su resistencia al amarillamiento letal del cocotero y alta productividad. Sin embargo, los frecuentes subcultivos que involucra el protocolo y el tiempo que tienen los cultivos del Centro de Investigación Científica de Yucatán podrían ocasionar variación somaclonal. El presente trabajo está enfocado al establecimiento de un protocolo de embriogénesis somática del cocotero (*Cocos nucifera* L.) utilizando explantes aéreos (pseudotallo) de vitroplantas jóvenes, lo que favorecerían la reducción del riesgo de esta variación en el proceso de multiplicación de callos embriogénicos y así mismo se propone estandarizar una técnica mediante marcadores moleculares que permita la evaluación de vitroplantas regeneradas con más de 10 años de subcultivos.

HIPÓTESIS

- I. Si se usan explantes de partes aéreas de plántulas de cocotero obtenidas *in vitro* se podrán generar callos embriogénicos.

- II. Por medio de la técnica de AFLP se podrá determinar que la variación somaclonal en las plántulas obtenidas por micropropagación presentan un nivel muy bajo.

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un protocolo para la formación de callo embriogénico a partir de explantes de partes aéreas de plántulas de cultivo *in vitro* para reducir el riesgo de variación somaclonal en el proceso de micropropagación de cocotero.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar las características necesarias del tejido para la formación de callo embriogénico a partir de partes aéreas de plántulas de cultivo *in vitro*.

Evaluar la capacidad de formación de callos embriogénicos generados a partir de partes aéreas de plántulas de cultivo *in vitro*.

Estandarizar la técnica de AFLP para identificar la presencia de variación somaclonal en plantas obtenidas a través del cultivo *in vitro* de cocotero.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

A continuación se muestra la estrategia experimental a seguir (Figura 1.1).

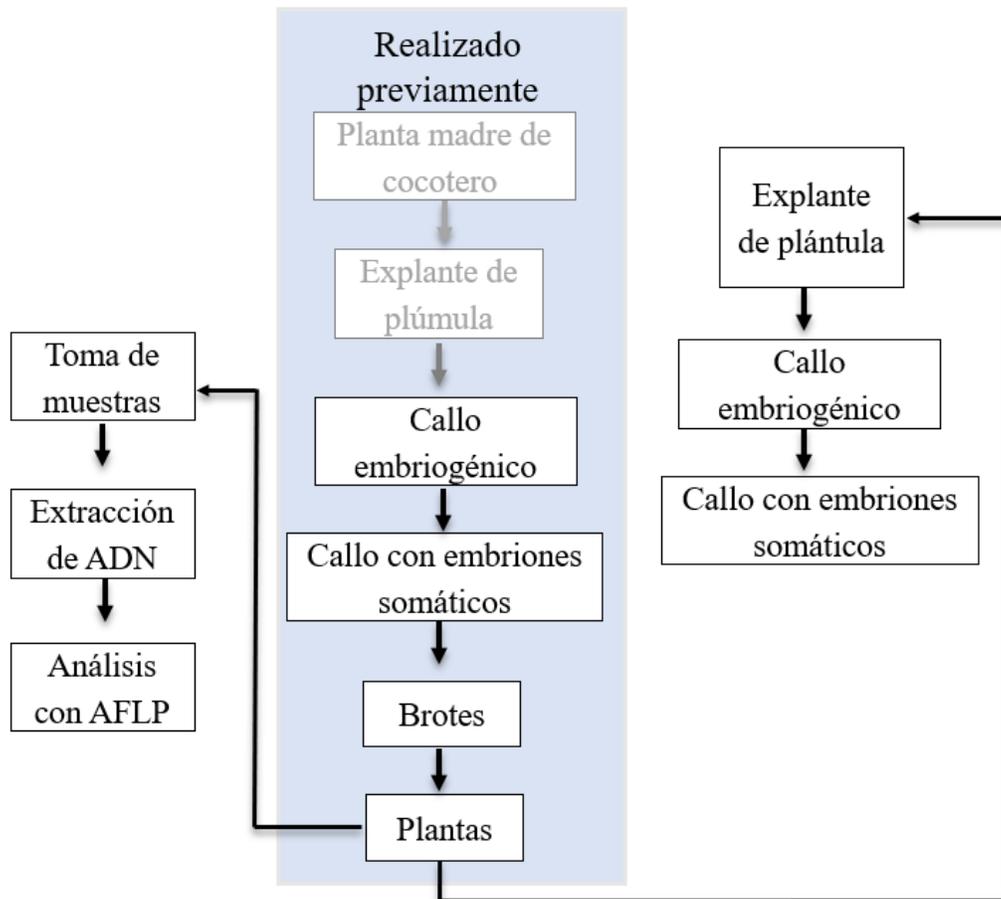


Figura 1.4. Diseño experimental.

CAPÍTULO II FORMACIÓN DE CALLO A PARTIR DE TEJIDOS DE PARTES AÉREAS**2.1. INTRODUCCIÓN**

El cocotero (*Cocos nucifera* L.) es uno de los cultivos tropicales básicos en la economía agrícola de muchos países, considerado como una de las veinte especies cultivadas más importantes en el mundo, ya que en los últimos 10 años se han obtenido productos de valor agregado gracias a su amplia distribución y aprovechamiento de todas sus partes, además de ser comúnmente conocido como el árbol de la vida (Alrifai y Marcone, 2019). No obstante, en las últimas décadas su producción ha sido afectada por la senescencia de las plantas, por problemas fitosanitarios como son las plagas y enfermedades tales como el amarillamiento letal del cocotero (ALC) y el picudo del cocotero, además de los daños causados por los ciclones, tormentas y tsunamis (Sisunandar *et al.* 2010; Samosir y Adkins, 2014; Lédo y Vendrame, 2021). Es por ello, que la micropropagación ofrece ventajas, como altas tasas de multiplicación, la utilización de pequeños explantes y el potencial para la producción de material vegetal limpio, libre de enfermedades, así como una rápida multiplicación de variedades resistentes a enfermedades y altamente productivas a gran escala (Lédo y Vendrame, 2021). En la actualidad la investigación desarrollada en el Centro de Investigación Científica de Yucatán para la micropropagación de cocotero se realiza por medio de la embriogénesis somática a partir de explantes de inflorescencias y de plúmula, ya que a la fecha solo se ha encontrado un reporte que indique la formación de brotes por organogénesis del cual se desconoce el nivel de eficiencia (Wilms *et al.*, 2021) mientras que a partir del explante de plúmula se ha tenido mayor eficiencia y se han regenerado plantas de manera más reproducible. Además a través de estos explantes se han generado plantas de manera reproducible y con mayor eficiencia en comparación con lo reportado por Verdeil y colaboradores (1994). Por otra parte, la micropropagación a partir de tejido de hoja que se ha reportado presenta una baja eficiencia (Verdeil *et al.* 1994). Por lo anterior, hace necesaria la generación de nuevos métodos de micropropagación o la modificación de los ya existentes para obtener un protocolo altamente eficiente que permita la producción masiva de materiales con características élite y así contribuir con la alta demanda nacional e internacional de este cultivo.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Material vegetal

Se utilizaron plántulas provenientes de cultivo *in vitro* del Centro de Investigación Científica de Yucatán de la variedad alto por alto del pacífico (MxPT1 x MxPT2) a las cuales se les eliminaron las hojas y raíces de cada planta hasta obtener un cilindro central que incluía la hoja bandera y el meristemo, posteriormente las plántulas fueron divididas y seccionadas en tres principales tejidos: zona superior (hoja), zona media (pseudotallo) y zona basal (meristemo) como se muestra a continuación (Figura 2.1). Seguidamente se separaron las 3 secciones y se cortaron explantes de 2 mm a 5 mm dependiendo del tamaño de la plántula posteriormente se colocaron en un medio de cultivo (Figura 2.2).

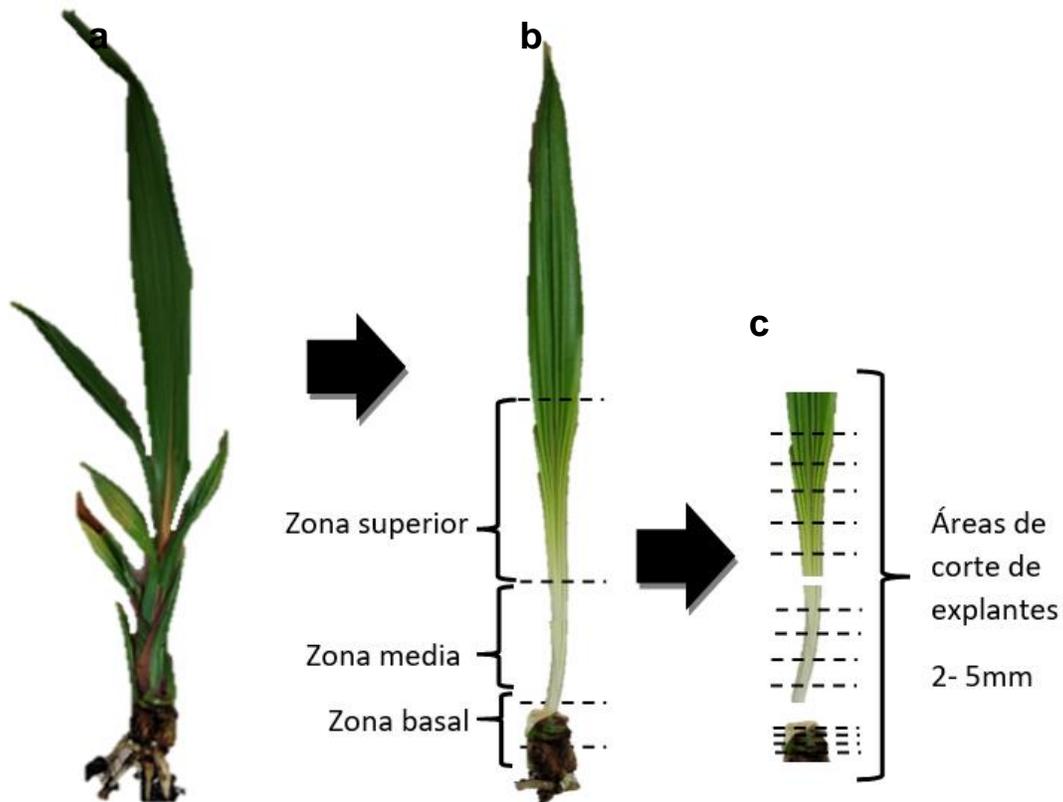


Figura 2. 1. Secciones de plántula de coco para producir explantes a) Plántula con hojas, b) plántula sin hojas, solo con la hoja bandera, c) áreas de cortes de los explantes de 2-5 mm.

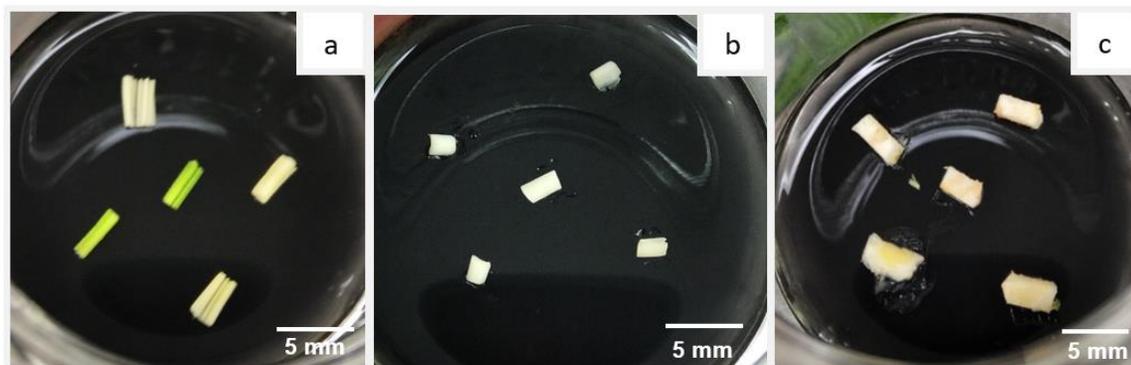


Figura 2. 2. Explantes obtenidos y colocados en el medio de cultivo para inducir la embriogénesis somática de 2-5 mm. a) Explantes de zona superior, b) explantes de zona media, c) explantes de zona basal.

2.2.2. Condiciones y medio de cultivo

Se utilizó el medio Y3 adicionado con sacarosa (5%), gel rite (0.3%), carbón activado (0.25%) y 2, 4-D en 0.65 mM para la formación de callos y callos embriogénicos de acuerdo con Eeuwens (1976); Saézn y colaboradores (2018) con un pH ajustado a 5.75. Los explantes fueron cultivados en frascos de vidrio con capacidad de 100 ml conteniendo 20 ml de medio de cultivo I y se establecieron en un período de oscuridad de 90 días a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Al finalizar los 90 días en medio de inducción de callo los explantes que formaron estructuras blancas aperladas y callos embriogénicos se establecieron en el medio II (formación de embriones somáticos) en frascos el cual contenía sacarosa (5%), gel rite (0.3%), carbón activado (0.25%) y los fitoreguladores: bencilaminopurina (BAP) en 300 μM y 2,4-D μM , para generar los embriones somáticos sobre los callos embriogénicos en un periodo de 30 días a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Una vez que los callos generaron los embriones somáticos, estos se pasaron al medio III (germinación de callos embriogénicos (GES)) y se mantuvieron en fotoperiodo de 16 h de iluminación y 8 h de oscuridad con una intensidad luminosa de 1300 luxes a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y con subcultivos cada dos meses de acuerdo con Sáenz y colaboradores (2018).

2.2.3. Experimentos realizados.

2.2.3.1. Etapa de madurez de la planta y tejido adecuado (Experimento 1).

Se utilizaron plántulas que se encontraban en dos etapas diferentes de desarrollo: 20 plántulas de 6 meses de edad en medio de crecimiento de brotes y 10 plántulas de 14 meses en medio de crecimiento de plántulas a punto de salir a la etapa de aclimatización, para identificar la etapa en el que las plántulas obtuvieron mayor respuesta.

2.2.3.2. Réplica del experimento con plantas de 14 meses (Experimento 2).

Se utilizaron 10 plántulas de 14 meses en medio de crecimiento de plántulas a punto de salir a la etapa de aclimatización, para identificar el tejido con mayor respuesta.

2.2.3.3. Uso de solución de antioxidantes en la inducción de la embriogénesis.

Debido a que la oxidación es uno de los factores que más afectaron el cultivo *in vitro* durante la etapa de inducción de callo, se realizó un experimento de 4 tratamientos con 3 repeticiones utilizando plantas de cultivo *in vitro* de 6 meses de edad y una solución estéril de ácido ascórbico (0.1 g/L), ácido cítrico (0.15 g/L) y sacarosa (30 g/L) por cada tratamiento. Los tratamientos fueron los siguientes:

T0: Testigo. Tratamiento sin antioxidantes.

T1: Toda la noche. Las plantas se colocaron en un frasco de vidrio estéril con 100 ml de la solución antioxidante y se dejaron remojar durante toda la noche (aproximadamente 14 horas).

T2: 24 horas. Las plantas se dejaron en remojo con la solución antioxidante durante 24 horas.

T3: Durante los cortes. Las plantas se colocaron en una caja Petri a la cual se añadió la solución antioxidante para que estas se mantuvieran sumergidas mientras se realizaban los cortes de los diferentes tejidos.

Seguidamente los explantes se colocaron en el medio I de inducción de callo y se incubaron en oscuridad a 25 ± 2 °C , estos se observaron cada tercer día por un periodo de 15 días.

2.2.4. Análisis estadístico.

Se realizó un diseño experimental completamente al azar en el cual se evaluó el porcentaje de oxidación de los diferentes tejidos y porcentaje de formación de callo.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Etapa de madurez de la planta y tipo de tejido adecuado.

2.3.1.1. Inducción

A lo largo de los primeros 90 días se observaron estructuras blancas aperladas (EBA) de aproximadamente 2 mm en los tejidos de 5 mm, incluyendo aquellos que presentaron oxidación, estas estructuras fueron separadas y subcultivadas hasta llegar a la generación de un callo embriogénico parcial con un tamaño de 8 a 10 mm. El callo embriogénico parcial fue subdividido y subcultivado hasta dar lugar a los callos embriogénicos completos como se muestra a continuación en la Figura 2. 3.1.

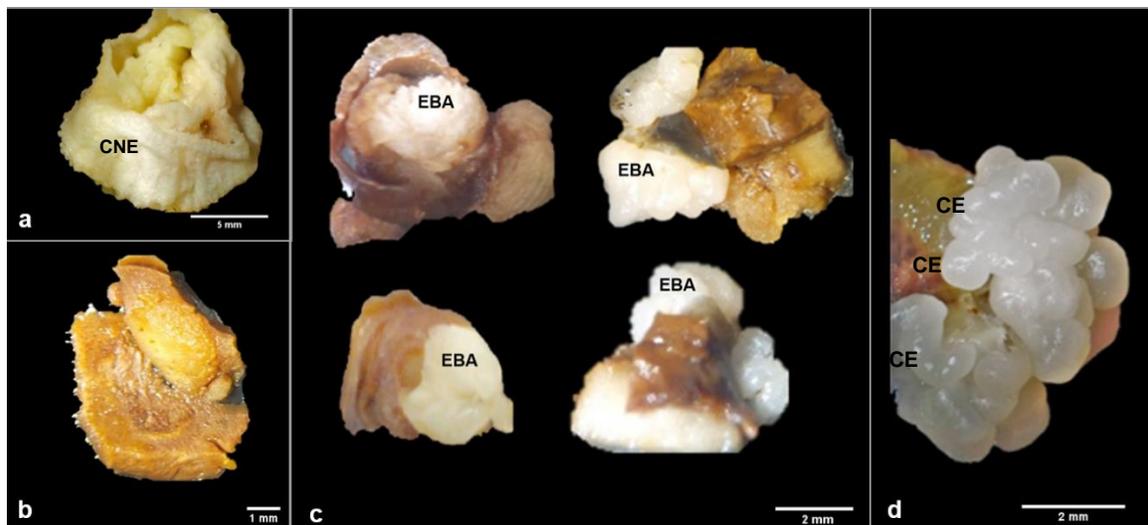


Figura 2. 3. Resultados obtenidos del proceso de inducción. a) Callo no embriogénico (CNE) obtenido a los 20 días, b) explante fenolizado a los 20 días, c) Estructuras blancas aperladas (EBA) en tejido fenolizado obtenidas a los 45 días d) callo embriogénico (CE) obtenido a los 90 días.

En la Figura 2.3. se puede observar el desarrollo de los explantes iniciales y el comportamiento que tuvieron hasta llegar a la formación de callo embriogénico (CE) completo. Durante los primeros 20 días se observó oxidación en algunos tejidos, principalmente en los pertenecientes a la zona basal y la zona superior a partir de los 20 días, en lo que respecta principalmente a la zona media se formó una masa celular similar a una esponja que se denominó como callo no embriogénico (CNE) (Figura 2.3.a), cabe mencionar que en algunos casos se formaron estructuras blancas aperladas sobre los tejidos fenolizados y dentro de la masa celular esponjosa (Figura 2.3.c).

En la Tabla 2.1 se muestra el número de explantes inducidos totales y el porcentaje de estructuras blancas aperladas denominadas como callos embriogénicos y los callos no embriogénicos que se tomaron en consideración debido a que en algunos casos se formaron callos embriogénicos durante la multiplicación. Cabe mencionar que algunos de los explantes se contaminaron debido a la presencia de ácaros en laboratorio lo cual disminuyó el porcentaje de respuesta obtenido.

Tabla 2. 1. Análisis de porcentaje de formación de callo embriogénico realizado a los 90 días.

INDUCCIÓN				
Edad de las plántulas a partir de la germinación	Tejido	No. Explantes totales	CNE	% CE
6 meses	Zona superior	100	7	0
	Zona media	100	16	4
	Zona basal	60	5	6.66
	TOTAL	260	28	3.07
14 meses	Zona superior	100	8	3
	Zona media	100	40	10
	Zona basal	60	3	5
	TOTAL	260	51	6.15

CE= Callo embriogénico, CNE= Callo no embriogénico

Como se puede observar en la Tabla 2.1 los explantes de zona media de las plántulas de 14 meses presentaron mayor porcentaje de callos embriogénicos formados (6.15%), mientras que en los explantes de las plántulas de 6 meses fue menor (3.07%).

2.3.1.2. Multiplicación.

Para el proceso de multiplicación se tomaron los callos embriogénicos (CE) obtenidos y se subdividieron para dar lugar a la formación de nuevos callos, así mismo los embriones formados fueron separados del CE y se utilizaron como explante para la generación de embriogénesis somática secundaria, al igual que las estructuras que se encontraban debajo de los embriones (estructuras embriogénicas (EES)). En cuanto a los callos obtenidos del proceso de multiplicación, como se puede observar se obtuvieron CE de 9 mm (Figura 2.4) los cuales al ser separados de los embriones quedaron con un tamaño menor.

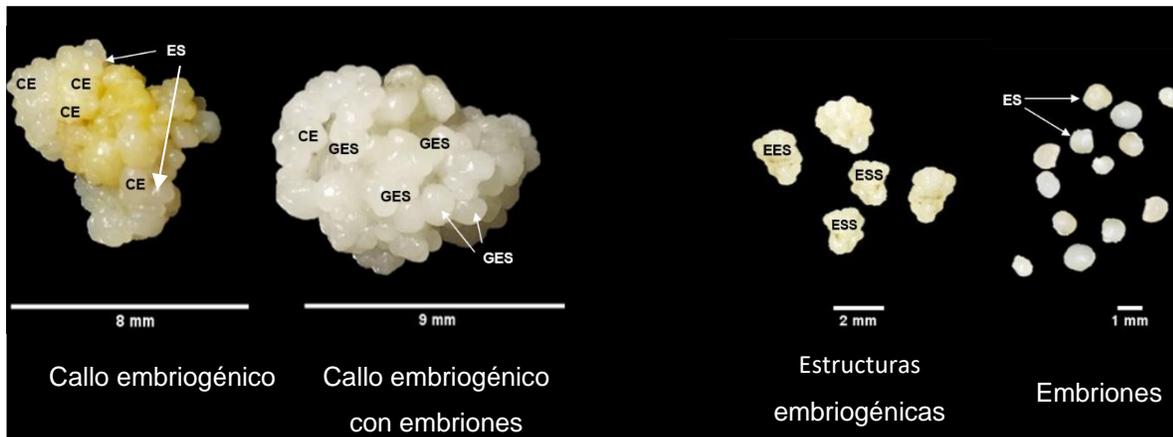


Figura 2. 4.- Resultados obtenidos del proceso de multiplicación. a) Callo embriogénico (CE). B) Estructuras embriogénicas globulares (GES) c) Estructuras embriogénicas (EES) ya separadas del callo embriogénico, d) Embriones somáticos separados de los callos embriogénicos.

La cantidad de callos obtenidos se puede incrementar de maneras distintas: Utilizando los callos embriogénicos y dividirlos, utilizar las estructuras formadas o los embriones (Figura 2.4).

2.3.1.2. Formación de embriones somáticos.

Los callos embriogénicos formados se pasaron al medio de formación de embriones en el cual se mantuvieron durante 30 días y formaron los embriones somáticos (GES: estructuras embriogénicas globulares, Sáenz *et al.* 2006) (Figura 2.5).

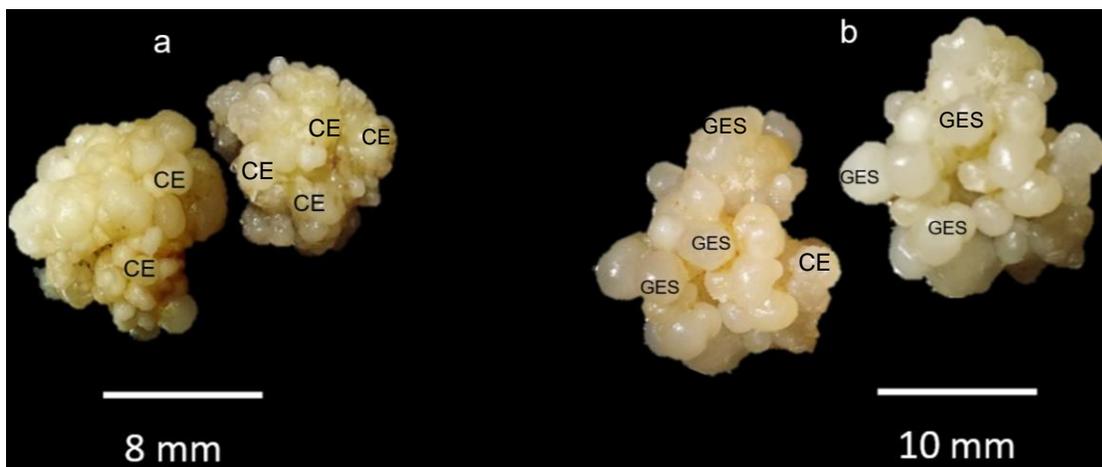


Figura 2. 5. Formación de embriones somáticos. a) Callos embriogénicos (CE) después de 2 ciclos de cultivo, b) callos con estructuras embriogénicas globulares (GES) a los 30 días en medio de generación de embriones.

La Tabla 2.2 muestra los resultados obtenidos después de 3 subcultivos para la formación de callos embriogénicos y embriones somáticos. Como se puede observar las plantas de 14 meses de edad formaron el 37.41% de callos embriogénicos en los tejidos de la zona media y basal, mientras que las plantas de 6 meses formaron el 25%. En ambos casos en el tejido de la zona superior no formó embriones somáticos.

Tabla 2. 2. Resultados del proceso de multiplicación después del primer ciclo de cultivo.

Edad de las plantas a partir de la germinación	Multiplicación			Formación de embrión somático
	Tejido	No. Explantes totales	CE%	No. Embriones/callos
6 meses	Zona superior	14	42.86	-
	Zona media	20	10	-
	Zona basal	2	50	-
	TOTAL	36	25	-
14 meses	Zona superior	-	-	-
	Zona media	132	50.75	7.61
	Zona basal	23	-	-
	TOTAL	155	37.41	7.5

CE= Callo embriogénico

En la Tabla 2.2 se puede observar que el tejido de la zona media de las plantas de 14 meses fue el único que formó embriones, con un promedio de 7.5 embriones por callo. Los demás tejidos no formaron embriones en ambas edades.

Continuando con la multiplicación se utilizaron los embriones y los callos embriogénicos obtenidos para incrementar la cantidad de material y poder determinar si el tejido formado era realmente callo embriogénico, sin embargo, solamente la zona media de los explantes de 14 meses lograron generar CE y embriones durante los subcultivos siguientes.

Tabla 2. 3. Tabla de formación de callo embriogénico después de 3 ciclos de cultivo.

Tejido	CNE	CE	SR	ES	CE con ES	No. Total explantes	%CE	%CE con ES	%CE total
Zona media	81	331	5	988	454	871	38	52.13	90.13

CNE=Callo no embriogénico, CE=Callo embriogénico, SR=Sin respuesta, ES=Embriones somáticos.

En la tabla 2.3 se muestran los resultados de la formación de callo embriogénico y embriones después de 3 ciclos de cultivo. Como se puede observar se formó en total el 90.13% de callo embriogénico del cual, el 52.12% generó embriones somáticos (ES) y el 38% de CE no generó los embriones ya que el tejido aún era pequeño y necesitaba más tiempo para llegar a generar los embriones.

2.3.1.4. Germinación de embriones somáticos.

Los callos embriogénicos que se mantuvieron en proceso de germinación generaron tejido esponjoso, se tornaron verdosos y no llegaron a geminar como se muestra en la Figura 2.6.

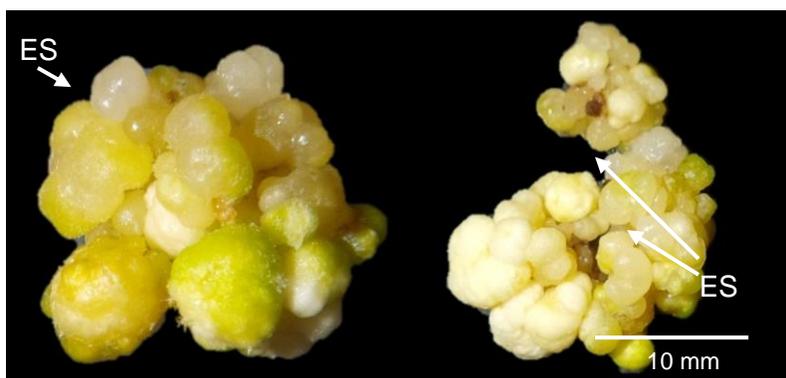


Figura 2. 6. Callos embriogénicos con embriones sin germinar a los 60 días en medio de germinación.

2.2.3. Uso de solución de antioxidantes en la inducción de la embriogénesis

Todos los tejidos utilizados para este experimento presentaron oxidación a partir de los primeros 5 días, siendo el tejido de la zona basal el que tiende a oxidarse más (tabla 2.4). No se encontró diferencia significativa entre ellos, ya que se obtuvo un valor de F de 0.0692 y un coeficiente de variación de 4.05, (Véase anexo 1).

Tabla 2. 4. Porcentaje de oxidación después de 15 días de evaluación.

Tratamiento	Zona superior (%)	Zona media (%)	Zona basal (%)
T0	50	43.33	50
T1	43.33	43.33	46.66
T2	46.66	46.66	50
T3	50	50	50

2.3.2. EXPERIMENTO REPLICA CON PLANTAS DE 14 MESES (EXPERIMENTO 2).

Con base en los resultados anteriores se realizó una repetición del experimento utilizando plántulas de 14 de meses a partir de la germinación. Los resultados se muestran a continuación.

Tabla 2. 5. Multiplicación del primer ciclo de cultivo a partir de explantes de plantas de 14 meses de edad.

Tejido	Formación de callo embriogénico (CE)				Formación de embrión somático
	Inducción		Multiplicación		
	No. Explantes	%CE	No. Explantes	% CE	No. Embriones/callos
Zona superior	100	1	3	0	0
Zona media	100	8	45	44.44	0.3
Zona basal	60	5	11	54.54	1.3
TOTAL	260	4.61	59	44.06	0.57

Como se puede observar en la Tabla 2.3 los tejidos de la zona basal y la zona media formaron un mayor número de callos embriogénicos. Los tejidos de la zona basal y la zona media formaron embriones somáticos después del primer ciclo de cultivo. En total se obtuvo el 0.57% de embriones.

Los embriones recuperados y las estructuras permitieron incrementar el número de explantes. Después de 2 ciclos de cultivo más con 3 subcultivos se obtuvieron los siguientes resultados.

Tabla 2. 6. Formación de callo embriogénico después de 2 ciclos de cultivo.

Tejido	CNE	CE	SR	ES	CE con ES	No. Total explantes	%CE	%CE con ES	%CE total
Zona media	1	34	4	49	28	67	50.75	41.79	92.54
Zona basal	1	45	2	71	31	79	56.96	39.42	96.20
Total	2	79	6	120	59	146	54.11	40.41	94.52

CNE=Callo no embriogénico, CE=Callo embriogénico, SR=Sin respuesta, ES=Embriones somáticos.

En la tabla 2.6 se puede observar que tanto la zona media como la zona basal formaron más del 90% de callo embriogénico (92.54 y 96.20% respectivamente) y que el porcentaje de embrión somático fue del 41.79% de la zona media y 39.42% de la zona basa, siendo la zona media quien formo un porcentaje más alto de embriones somáticos.

CAPÍTULO III ESTABILIDAD GENÉTICA

3.1. INTRODUCCIÓN

El cultivo *in vitro* puede llegar a ser muy estresante para las células vegetales e involucrar procesos mutagénicos durante el establecimiento del explante, la inducción de callo, la formación de embriones o durante la formación de órganos, las cuales puede llegar a ocasionar variación somaclonal (Larkin, 2004). Esto generalmente se encuentra asociado a varios problemas de fisiológica, epigenética y genética, como la recalcitrancia, la hiperhidricidad (Cassells y Curry 2001).

De acuerdo con Larkin y Scowcroft (1981) la variación somaclonal es la variación genética y/o epigenética que se genera durante el cultivo *in vitro* de plantas que provenga de células somáticas, así como en plantas regeneradas de los mismos. Existen factores propios del cultivo *in vitro* que se manifiestan en el fenotipo, como lo son el método de cultivo y patrón de desarrollo, edad del cultivo y subcultivos, algunos componentes del medio de cultivo como los reguladores de crecimiento, el tipo de explante y el estrés (Sánchez y Jiménez, 2009; Bairu *et al.*, 2011).

Hoy en día existen una variedad herramientas basadas en etiquetas de precios y eficacia, para caracterizar el genoma del coco. La entidad básica en este enfoque se denomina "marcador molecular", que se define como "un rasgo químico heredado que se puede utilizar para distinguir entre individuos, grupos de individuos o posiciones en el cromosoma" (Ashburner, 1999). El uso de técnicas moleculares como la técnica de AFLP permite comprender la diversidad existente en las especies debido a que esta técnica combina la especificidad, la resolución y el poder de muestreo de la digestión con enzimas de restricción, con la velocidad y la facilidad para detectar polimorfismos vía PCR (Vos *et al.*, 1995). Es por ello que el presente estudio pretende estandarizarla técnica de AFLP para el análisis de la variación somaclonal en cultivos *in vitro* de cocotero.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.2.1. Material vegetal.

Se utilizaron las hojas de 5 plantas de la variedad Alto del Pacífico (APMx2) y 5 de Enano verde de Pilipog (Pild) provenientes de cultivo *in vitro* del Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C. Las plantas utilizadas en este estudio fueron regeneradas a partir de callos embriogénicos, por lo cual pasaron por varios ciclos de multiplicación por más de 10 años.

3.2.2. Condiciones de cultivo.

Las plántulas se encontraban en medio de cultivo de crecimiento de plántulas, compuesto por el medio Y3, 2.5 g/L carbón activado, 5% sacarosa y pH a 5.75, a una temperatura de 25 ± 2 °C y 6 meses de fotoperiodo (16 horas luz, 8 de oscuridad).

3.2.3. Extracción de ADN.

Este proceso se realizó de acuerdo al protocolo de CTAB de Doyle y Doyle (1990) con algunas modificaciones.

Se pesó 1gr de tejido de palma (hoja), se le agregó nitrógeno líquido y se maceró, seguidamente se le agregaron 5 ml de una mezcla buffer CTAB/Monotiolglicerol, se incubaron las muestras en baño maría durante 15 min a 65 °C, posteriormente se dejaron enfriar las muestras a temperatura ambiente y se le agregaron 4µl RNasa para incubarla durante 5 min, luego se le agregó 1ml cloroformo-alcohol isoamílico se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min, se recuperó el sobrenadante y se le agregaron 0.6 volúmenes de isopropanol, se incubaron durante 1 hora a -20 °C, se centrifugaron nuevamente a 13,000 rpm, se desechó el sobrenadante, se agregaron 300 µL de etanol al 70%, se centrifugaron nuevamente, se desechó el etanol, se le dio un segundo lavado con etanol al 70% y se dejaron secar a temperatura ambiente por 30 min seguidamente se disolvieron en 100 µl de buffer TE. Finalmente se cuantificó y evaluó la calidad del ADN en el NanoDrop™ one Thermo Scientific™ y se verificó mediante un gel de agarosa al 1%, para poder llevarlo a las condiciones adecuadas para el procedimiento de AFLP.

3.2.4. Desarrollo de AFLP.

3.2.4.1. Digestión con enzimas de restricción y ligación de adaptadores

3.2.4.1.1. Digestión con enzimas de restricción.

El ADN obtenido fue digerido bajo las siguientes condiciones: 500 ng de ADNg en 10 µL de cada muestra, 4 unidades de enzima EcoRI, 1 U de enzima MseI, 2 µL de amortiguador 10x Buffer tango (500 mM acetato de potasio, 200 mM Tris-acetato, 100 mM acetato de magnesio, 10 mM

ditiotreitolo), 0.2 µL de BSA 10x en un volumen final de 20 µL. Esta reacción fue incubada a 37 °C por 3 h y posteriormente a 65 °C durante 20 min en un termociclador BioRad T100®

3.2.4.1.2. Alineación de adaptadores

Antes de hacer la ligación de los adaptadores se requiere realizar la alineación de los mismos, para esto se tomaron 40 µL del adaptador 1 de EcoR1 que tiene una concentración de 0.5 nmol/ µL y se le agregaron 20 µL del adaptador 2 de EcoR1 que tiene 1 nmol/ µL, se adicionaron 20 µL del buffer 10x (1M Tris HCl pH 7.5, 5 M NaCl, 0.5 M EDTA) y 120 µL de agua, volumen final de la reacción 200 µL, se incubaron a 65 °C por 10 min.

3.2.4.1.3. Ligación de adaptadores

Para la ligación se toma el adaptador de Mse1 alineado se toman 100 µL y se agregan 100 µL de agua, de este stock se usan 1 µL para la ligación. Del adaptador de EcoR1 alineado se toman 5 µL y se le agregan 100 µL de agua, de este se toma 1 µL para la ligación.

Se tomaron los 20 µL del producto de digestión y se le adicionaron 6 µL de amortiguador 5x Ligasa, (250 mM Tris-HCl pH 7.6, 50 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 5 mM DTT, 25% (p/v) polietilenglicol-8000), 1 µL de adaptadores MseI 50 pMol, 1 µL de adaptadores EcoRI 5 pMol, 1 unidad de enzima T4 Ligasa Invitrogen en 1 µL y 1 µL de agua ultrapura para obtener un volumen final de 30 µL y se llevó a cabo la reacción a temperatura ambiente (22 °C) durante la noche.

Para verificar la digestión de ADNg y la ligación de adaptadores, se fragmentaron 10 µL del producto de esta reacción (ADN templete) por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Se realizaron diluciones 1:10 del ADN templete de acuerdo con la intensidad de los barridos en el gel.

3.2.4.2. Preamplificación de fragmentos de restricción

La reacción de preamplificación se llevó a cabo tomando 5 µL de la mezcla de digestión-ligación diluida en un tubo para PCR a los cuales se agregaron 2 µL de amortiguador 10x PCR Taq Reaction Buffer (200 mM Tris pH 8.4, 500 mM KCl), 0.6 µL de MgCl₂ 50 mM, 0.2 µL de dNTP's 10 mM, 1.0 µL de primers EcoRI y MseI con un nucleótido selectivo a una concentración de 20 pmol cada uno, 0.5 U de Taq Polymerasa en 0.1 µL y 9.9 µL de agua ultrapura para un volumen final de 20 µL.

Las mezclas de reacción se sometieron al siguiente programa de PCR en termociclador: desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min, 20 ciclos a una temperatura de 94 °C por 30 s para desnaturalización, 1 min a 56 °C para alineación de iniciadores y una polimerización a 72

°C durante 1 min. Finalmente, tras 20 ciclos, se aplicó una extensión a 72 °C durante 5 min para terminar cualquier polimerización hasta entonces inconclusa

Posteriormente se resolvieron 5 µL del ADN preamplificado por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para verificar la obtención de un barrido típico, y se procedió a realizar diluciones 1:50 y 1:25 de la preamplificación dependiendo de la intensidad del barrido.

3.2.4.3. Amplificación selectiva

Se realizó preparando una mezcla de reacción que contenía 5 µL del ADN preamplificado diluido, 1 µL de amortiguador 10x PCR Taq Reaction Buffer (200 mM Tris pH 8.4, 500 mM KCl), 0.3 µL de MgCl₂ 50 mM, 0.2 µl de dNTP's 10 mM, 1.0 µL de cebador específico EcoRI con tres nucleótidos selectivos, 2.25 µL de cebador específico MseI con tres nucleótidos selectivos a una concentración de 10 pmol cada uno, 0.5 unidades de Taq Polimerasa en 0.1 µL y 0.15 µL de agua ultra pura, el volumen final de reacción final fue de 10 µL.

Las muestras se sometieron a las siguientes condiciones de PCR tipo touch down: desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min, 12 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 min, alineamiento a 65 °C durante 30 s, extensión a 72 °C durante 1 min. A continuación 23 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 min, alineamiento durante 30 s con gradiente de temperatura de -0.5 °C por ciclo yendo de 65 °C en el ciclo 1 a 56 °C en el ciclo 23, y alargamiento a 72 °C durante 1 min. Posteriormente un periodo final de alargamiento a 72 °C durante 7 min.

A continuación se muestran los primers utilizados en la amplificación selectiva, como se puede observar en la tabla 2.5, se muestran los juegos de primers marcados y no marcados que se utilizaron para leerlos por electroforesis capilar y cabe mencionar que se utilizaron las mismas secuencias para los geles de poliacrilamida.

Tabla 3. 1. Primers utilizados.

Agrupación	Primers	Canal de fluorescencia
A: *E73 / M140	GGG/GTC	HEX™
B: *E52 / M307	CCC/CAG	FAM™
C: *E73 / M56	GGG/CGC	HEX™
D: *E181 / M140	CCC/CAG	FAM™
E: *E43 / M238	ATA/ATC	FAM™
F: *E34 / M140	AAT/GTC	HEX™
G: E35/M3	ACA/AAG	
H: E35/ M13	ACA/AAG	
I: E36/ M16	ACC/ACC	
J: E36/M13	ACC/AAG	
K: E38/ M13	ACT/AAG	
L: E38/M12	ACT/AAC	

*Primers marcados utilizados para mandar a secuenciar. Se utilizó la misma combinación de primers sin marcar para la electroforesis en geles de poliacrilamida.

3.2.4.4. Lectura de fragmentos

3.2.4.4.1. Secuenciación

En la primera prueba se intentó separar y leer los fragmentos por electroforesis capilar, para lo cual fue necesario marcar un primer de cada juego de primers con un fluoroforo (HEX y FAM), la reacción de PCR se llevó a cabo como se describe en la amplificación selectiva, utilizando 6 juegos de primers marcados (tabla 2.5. primers marcados*) Del producto de las reacciones se cargaron 2 µl y 2 µl de agua en la placa de 96 pozos, se selló con una cubierta adhesiva ThermalSeal® y se envió a la empresa DAVIS Sequencing. Posteriormente los cromatogramas fueron leídos en el programa gene marker.

3.2.4.4.2. Electroforesis y tinción

En la segunda prueba los fragmentos amplificados fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes al 5%. Se utilizaron 12 juegos de primers para aumentar la probabilidad de encontrar polimorfismo (tabla 2.5). Las muestras se corrieron a 60 watts durante 3 horas 10 min en una cámara de electroforesis vertical. Posteriormente se colocaron una solución de ácido acético al 10% durante 20 min, se enjuagaron con agua destilada, se tiñeron

con una solución de nitrato de plata y formaldehído al 37% durante 30 min, se enjugaron con agua destilada y se revelaron con una solución de carbonato de calcio adicionado con 3 ml de formaldehído al 37% + 60 µl de tiosulfato de sodio al 2% con una agitación suave, una vez que los fragmentos fueron revelados, el gel se coloca en la solución de ácido acético al 10 % durante 5 s para detener la reacción del revelado con el carbonato de sodio, después se realizó un lavado final de 20 minutos y se dejaron secar a temperatura ambiente (± 22 °C).

3.2.4.4.3. Análisis de estabilidad genética con AFLP

Se realizó el análisis de la técnica AFLP de acuerdo con el protocolo descrito por Vos *et al.* (1995) y Agarwal *et al.* (2008), con ligeras modificaciones en los volúmenes de reacción. Los fragmentos fueron analizados mediante los programas Gene Marker, NTSYS y freetree.

3.2.4.4.3.1. Índice de similitud y agrupamiento

El dendrograma que refleja la similitud genética entre los individuos se construyó a partir de la matriz de similitud generada, empleando el coeficiente DICE y agrupando los datos con el método de agrupación de pares no ponderados con medias aritméticas UPGMA por sus siglas en inglés (Unweighted Pair-GroupMethod Arithmetic Average) del programa NTSYS versión 2.10. Adicionalmente, el dendrograma se sometió a una prueba tipo “bootstrap” (Efron, 1982) por medio del programa TreeView 1.6.6, esta prueba brinda como resultado un valor relativo de “soporte” para cada agrupación obtenida en el dendrograma original. Para este estudio, se ejecutó una prueba “bootstrap” de 10 000 remuestreos.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Extracción de ADN

El ADN obtenido por el método de CTAB se verificó mediante un gel de agarosa al 1% (Figura 3.1 a) y se cuantificó en el NanoDrop™ one Thermo Scientific™, para poder llevarlos a las condiciones adecuadas para el procedimiento de AFLP. Los resultados fueron se muestran a continuación (Tabla 3.1).

Tabla 3. 2.- Muestras de ADN obtenido.

Nombre	Clave	Ng/ μ l
APMx2 - 1	A1	841.2
APMx2 - 2	A2	112.7
APMx2 - 3	A3	332.5
APMx2 - 4	A4	382.4
APMx2 - 5	A5	499.1
PILD - 1	P1	161.3
PILD - 2	P2	283.4
PILD - 3	P3	337.9
PILD - 4	P4	141.8
PILD - 5	P5	351.7

3.3.2. Desarrollo de AFLP.

3.3.2.1. Digestión con enzimas de restricción y ligación de adaptadores.

En un gel de agarosa al 1.5% se visualizaron los resultados de la digestión-ligación. Se corrieron las enzimas de manera individual, en combinación y con el ADN, para corroborar que se llevó a cabo correctamente el proceso. Se observaron los barridos esperados. Véase en la Figura (3.1 b).

3.3.2.2. Preamplificación de fragmentos de restricción.

Se obtuvieron barridos con pequeñas bandas definidas, las cuales indican que se llevó a cabo correctamente la preamplificación (Figura 3.1 c).

3.3.2.3. Amplificación selectiva

En geles de agarosa al 1.5% se verificó el proceso de amplificación selectiva con 6 juegos de primers (Figura 3.1 d).

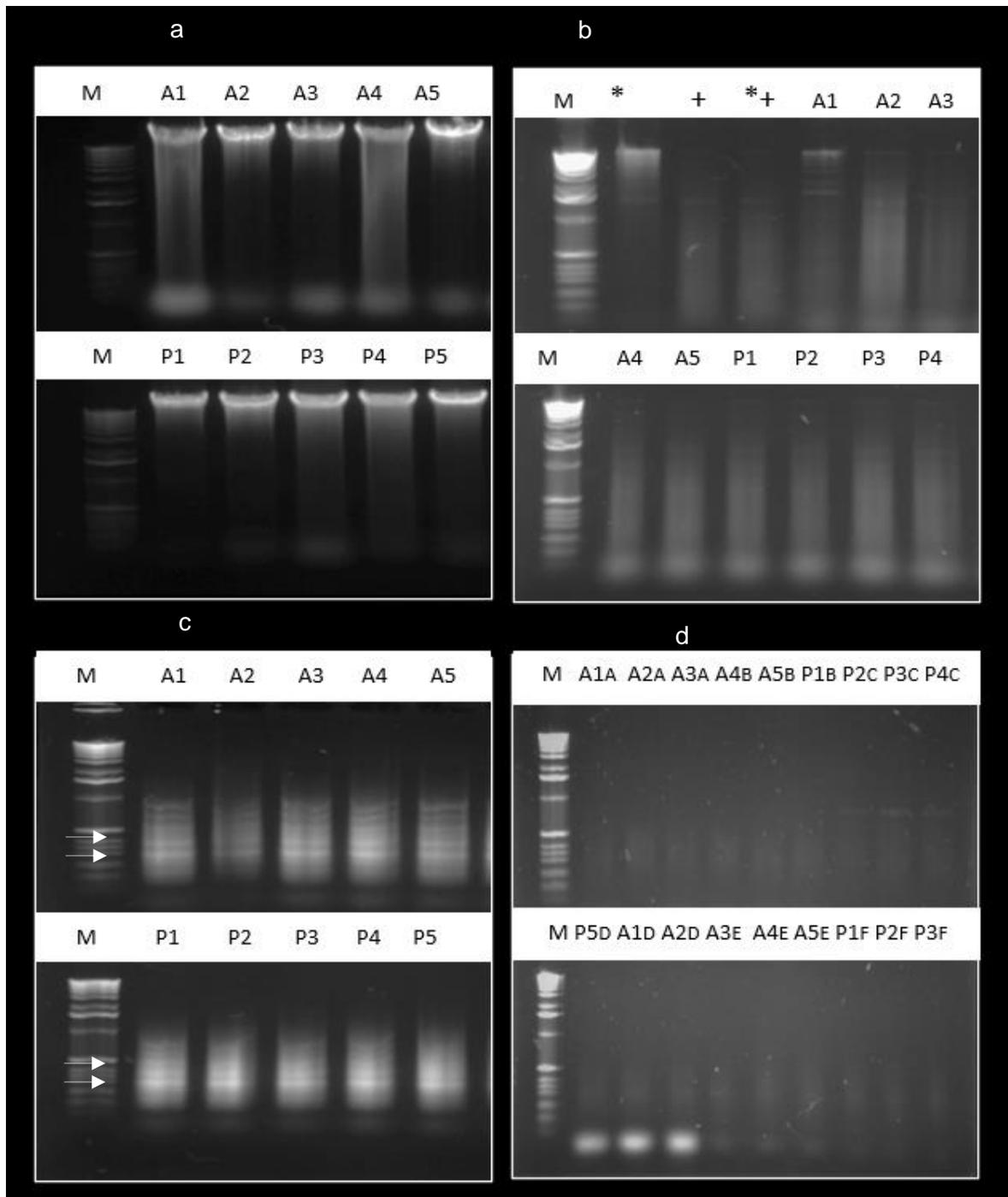


Figura 3. 1. Geles de agarosa AFLP. a) Extracción de ADN de plántulas APMx2 y Pild, M marcador molecular 1kb, b) Digestión-Ligación con las enzimas de restricción (*) EcoR1, (+) Mse1, (*+) EcoR1/Mse, c) Preamplificación con primers de pream Eco y pream Mse, en todas las muestras se observan las pequeñas bandas, d) Amplificación selectiva.

3.3.2.4. Análisis de secuencias (Electroforesis capilar)

Las muestras secuenciadas se analizaron mediante el programa de Gene Marker, sin embargo, todas las muestras presentaron una señal poco intensa, lo que ocasionó que no se pudieran obtener picos claramente definidos y por ende, los resultados obtenidos serían erróneos, es por ello, que se repitió todo el proceso de AFLP pero con geles de poliacrilamida. En la Figura 3.2 se muestra los resultados obtenidos con el programa antes mencionado.

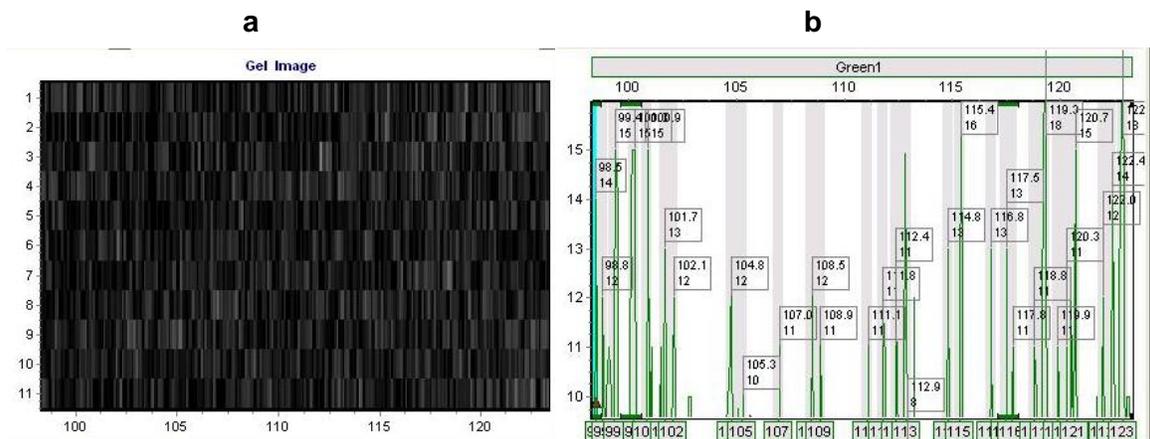


Figura 3. 2. Resultados Gene Marker, a) Gel de electroforesis capilar, b) Electroferograma.

Como se puede observar en la Figura 3.2, el gel que arroja el programa muestra demasiadas bandas y por lo tanto demasiados picos, mismos que se pueden apreciar en el electroferograma (b).

3.3.2.5. Análisis de electroforesis en geles de poliacrilamida.

Para la estandarización de la técnica se corrieron los 12 juegos de primers en geles de poliacrilamida, mediante los geles se lograron observar varios fragmentos tanto polimórficos como no polimórficos, se analizaron e identificaron de manera visual para la obtención de la matriz binaria. A continuación se muestran los resultados obtenidos (Figura 3.3).

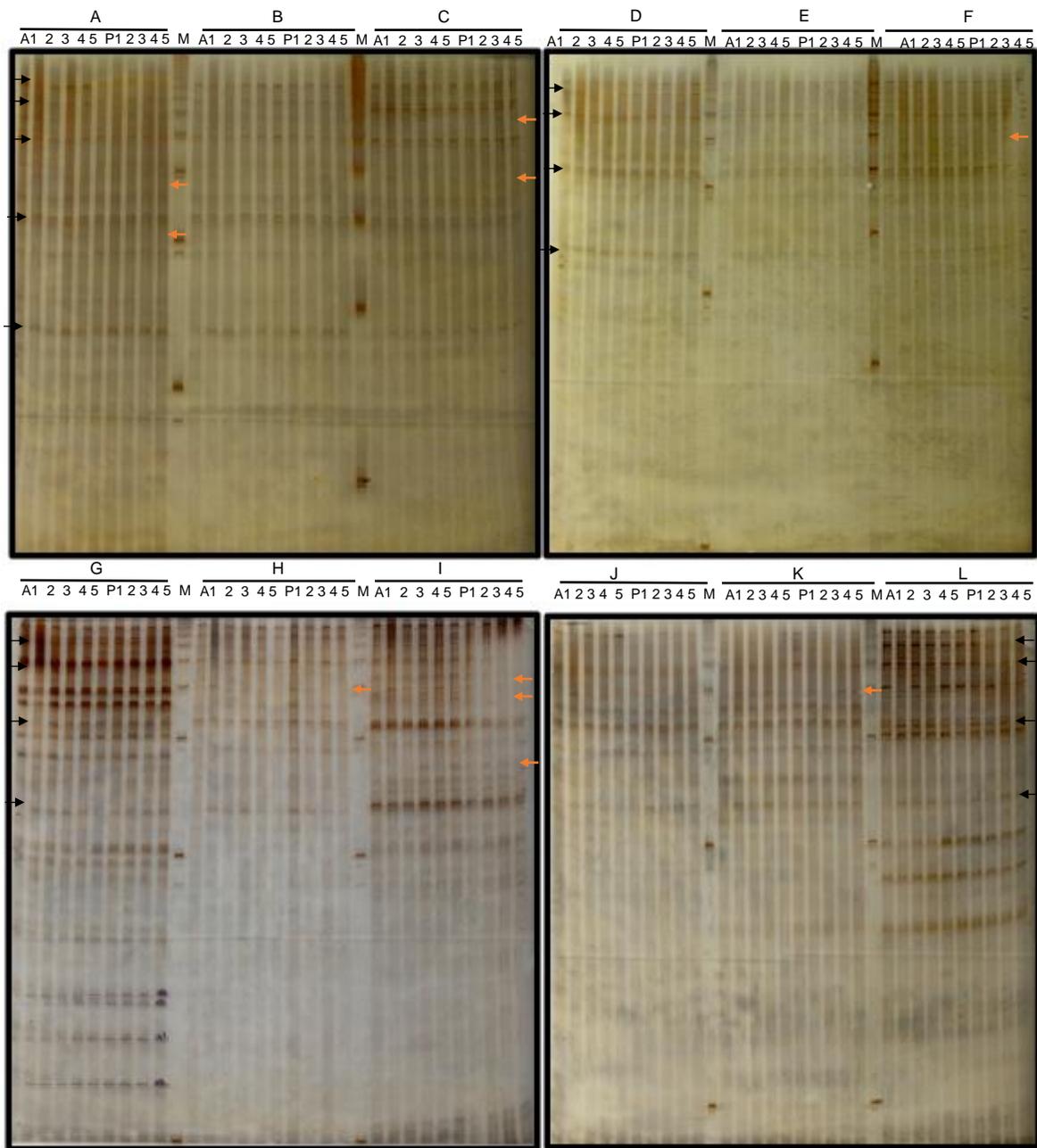


Figura 3. 3. Geles de poliacrilamida. 12 juegos de primers con 5 muestras de alto del pacífico 2 (APMx2) (A1...5) y 5 de Enano verde de Pilipog (Pild) (P1...5), (M) marcador molecular 123 pb, las flechas negras indican las bandas encontradas, las fechas naranjas muestran las bandas polimórficas.

3.3.2.6. Análisis de estabilidad genética con AFLP

De los 12 pares de primers probados (Ver anexo 2, 3 y 4), 6 pares mostraron un total de loci arriba de 20 pero solamente 4 de ellos mostraron mayor polimorfismo, los nombrados en la tabla 3.3 como A, B, C y D donde se observaron 5 loci polimórficos en promedio con cada primer.

Tabla 3. 3 Resumen de análisis general de AFLP.

Análisis general de polimorfismo					
Agrupación	Primers	No. Loci totales	No. Loci polimórficos	% polimórfico	Índice de similitud
A: E73 / M140	GGG/GTC	22	5	22.73	0.94
B: E52 / M307	CCC/CAG	23	5	21.74	0.94
C: E73 / M56	GGG/CGC	21	5	23.81	0.95
D: 181 / M140	CCC/CAG	20	5	25	0.94
G: E35/M3	ACA/AAG	25	2	8	0.98
I: E36/ M16	ACC/ACC	23	3	13.04	0.96
TOTAL APMx2		229	15	6.55	0.98
TOTAL Pild			14	6.11	0.98
TOTAL		229	34	14.85	0.96

La tabla anterior muestra un resumen de los datos obtenidos de las combinaciones de primers (Anexo 1). Como se puede observar se detectaron 229 bandas de las cuales 34 fueron polimórficas, dando como resultado el 14.85% de polimorfismo entre especies. Así mismo se muestra el porcentaje de polimorfismo obtenido de las variedades en cada variedad: Alto del Pacifico y Enano verde de Pilipog las cuales fueron 6.55% y 6.11% respectivamente.

3.3.2.7. Índice de similitud y agrupamiento

Los resultados de la prueba muestran que se obtuvieron dos clados, cada uno corresponde a una diferente variedad y poseen un soporte de Bootstrap de 98 y100%, mientras que los grupos subsecuentes no fueron menores a 59%. Por otra parte, el índice de similitud encontrado de intrapoblación por variedad fue del 98% mientras que entre poblaciones fue del 96%. La matriz de similitud utilizada para generar el dendrograma se encuentra en el Anexo 4

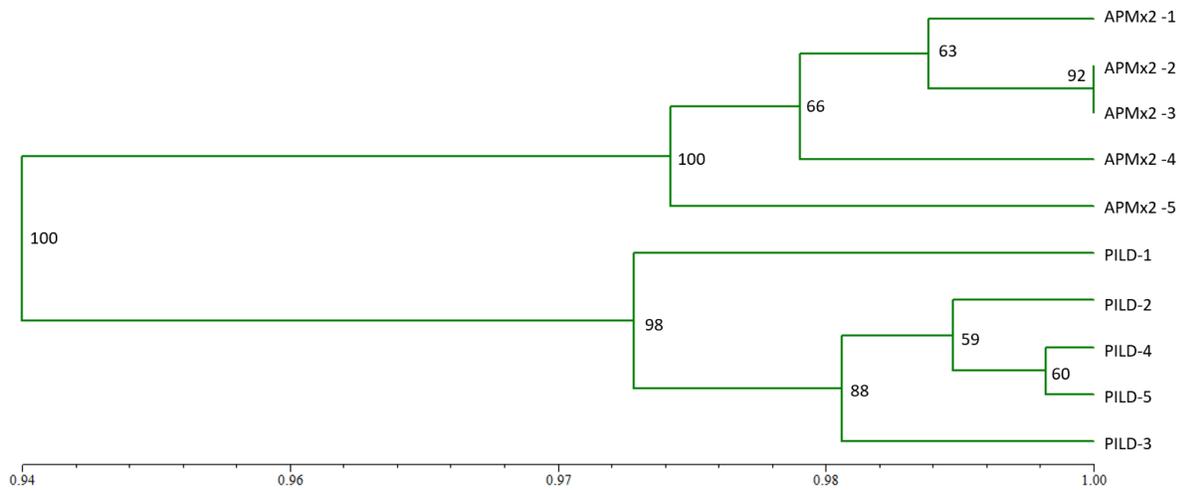


Figura 3. 4 Dendrograma de agrupamiento (UPGMA), de individuos de vitroplantas de cocotero de alto del pacifico (APMx2) y Enano verde de Pilipog (Pild) regenerados a partir de embriogénesis somática, utilizando marcadores AFLP (coeficiente DICE)

CAPÍTULO IV DISCUSIÓN

4.1. FORMACIÓN DE CALLO A PARTIR DE TEJIDOS DE PARTES AÉREAS.

El cocotero es considerado como el árbol de la vida y es uno de los cultivos básicos de la economía agrícola debido al aprovechamiento de todas sus partes (Alrifai y Marcone, 2019), sin embargo, la mayoría de las huertas requieren de replantación debido a la reducción de la productividad y la producción así como también la senescencia de las plantas y a las enfermedades tales como el amarillamiento letal del cocotero (Oropeza *et al.*, 2016).

La embriogénesis somática (SE) es un proceso de desarrollo en el que una célula somática de una planta puede desdiferenciarse a una célula madre embriogénica totipotente que tiene la capacidad de volver a diferenciarse y dar lugar a un embrión en condiciones apropiadas (Kalaipandian *et al.*, 2021; Verdeil *et al.*, 2007). Así mismo para que se pueda llevar a cabo la embriogénesis debe existir una combinación adecuada entre el explante y el entorno del cultivo (Boutilier *et al.*, 2016).

Por otra parte, la presencia de la oxidación es considerado como un problema en el cultivo *in vitro* ya que se manifiesta como un oscurecimiento del tejido vegetal y se puede definir como la oxidación por radicales libres de diferentes componentes celulares, generando daño, inhibición del crecimiento y en los casos graves incluso la necrosis y muerte del tejido (Van Staden *et al.*, 2006). En la actualidad existen varias estrategias para eludir los procesos de oxidación pero no siempre son éxitos tal como sucedió en este estudio, cabe aclarar que un único método no siempre es suficiente (Sharry *et al.*, 2015).

De acuerdo con los resultados presentados en esta tesis, el tipo explante que se use es un factor determinante para la formación de callos embriogénicos, ya que no todos los explantes probados respondieron formando CE y embriones somáticos. Esto dependió de la edad de la planta de la que se tomaron los explantes de hoja, así como la parte de la hoja usada (Viñas y Jiménez, 2011; Gaj, 2004; Freire-Seijo, 2003).

De acuerdo con Chan *et al.* (1998) y Sáenz *et al.* (2006), la formación de embriones somáticos a partir de explantes de hoja se puede obtener a partir de los 7 meses y estos pueden ser utilizados para la generación de más CE.

Por otra parte, los CE desarrollados a partir de partes aéreas de vitroplantas tuvieron una respuesta similar a los callos obtenidos por inflorescencia (Sandoval, 2016), tanto en el proceso

de formación como en la eficiencia que radica ente el 30-40% de los explantes que forman callo, de 5-7 embriones somáticos formados por (Montero, 2009), aunque en el presente estudio no se logró obtener la germinación los embriones formados. Los ES probablemente no germinaron porque aún estaban inmaduros, y/o que la cantidad de hormonas que se utilizaron no fueron las adecuadas ya que esto es uno de los factores determinantes durante el cualquier proceso de cultivo *in vitro*. Además, se podría incrementar la eficiencia de la formación de ES si se realiza un proceso de embriogénesis secundaria utilizando los embriones formados como nuevos explantes (Pérez, 2006). Con la embriogénesis somática secundaria se puede reducir el riesgo de variación somaclonal (Sylvie *et al.*, 2021).

Tomando en cuenta lo antes mencionado, se aprueba la hipótesis formulada debido a que se formaron CE y ES a partir de explantes de partes aéreas de vitroplantas.

4.2. ESTABILIDAD GENÉTICA.

La variación somaclonal es la variación genética o epigenética que se genera durante el cultivo *in vitro* de plantas que provengan de células somáticas, así como en plantas regeneradas de los mismos (Larkin y Scowcroft, 1981). Esta variación se puede presentar debido a diversos factores tales como: el genotipo, tipo de explante, vía de regeneración, reguladores de crecimiento, número y duración de los subcultivos, efecto del estrés, largo periodo de cultivo (Bairu *et al.*, 2011).

La técnica de AFLP representa un sistema de marcadores dominantes que permite el análisis simultáneo de un gran número de locus en el genoma, es altamente reproducible, tiene un costo moderado, y ha sido ampliamente usada para analizar la diversidad y la huella genética en varias especies de plantas (Agarwal *et al.*, 2008).

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, se pudo estandarizar la técnica de AFLP para el estudio de variación somaclonal en cultivos *in vitro* de *C. nucifera* L, ya que se identificaron 6 juegos de primers que mostraron el polimorfismo suficiente para identificar la variación presentada entre los clones de cada variedad analizada, así como también permitieron determinar la huella genética de las mismas, ya que claramente se observaron dos clados. Se encontraron 229 bandas polimórficas y los resultados de los geles fueron similares a los que reportó Perera (1998), sin embargo, con base en los artículos citados en la Tabla 4.1 podemos determinar que a pesar de los años que tienen los cultivos de donde se generaron las plántulas utilizadas para este estudio (de más de 10 años), no representa un riesgo mayor debido a que

se encontró un porcentaje de similitud del 96% entre plantas, porcentaje similar al de los estudios que se muestran la Tabla 4.1. Por lo tanto se aprueba la hipótesis formulada debido a la variación encontrada presentó un nivel muy bajo.

Tabla 4. 1. Porcentajes de similitud encontrados en cultivo *in vitro* mediante la técnica de AFLP en diferentes cultivos.

Similitud en cultivo <i>in vitro</i> AFLP			
Técnica	% Similitud	Cultivo	Autor
Embriogénesis	98.8	<i>Bambusa nutans</i>	Śliwińska <i>et al.</i> (2021)
Organogénesis.	100	<i>Musa spp.</i>	Ermini <i>et al.</i> (2021)
Embriogénesis	95	<i>Carica papaya</i>	Wei (2012)
Organogénesis.	96-98	<i>Stevia rebaudiana</i>	Martínez <i>et al.</i> (2007)

CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1. CONCLUSIONES GENERALES

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo, se puede concluir lo siguiente:

- Con los resultados preliminares se determinó que las plántulas de 14 meses edad son las más adecuadas para la formación de callo embriogénico ya que se obtuvo un mayor porcentaje de formación de CE (37.41%) de utilizando estas, en comparación con las plántulas de 6 meses (25%). Así mismo se logró identificar que la zona media y la zona basal de las plántulas, es decir, parte del pseudo tallo y del meristemo se pueden obtener callos embriogénicos ya que formaron el 92.54 y 96.20% respectivamente.
- Se estandarizó la técnica de AFLP con geles de poliacrilamida, así como también se identificaron los primers más adecuados para la realización de la técnica. .
- El uso de callos embriogénicos (con más de diez años de subcultivarse) para la generación de vitroplantas mediante embriogénesis somática, posee un gran potencial con bajo riesgo de variación somaclonal, ya que se determinó que la presencia de variación somaclonal en las plántulas de cultivo *in vitro* del cocotero, es mínima a pesar de los años del cultivo.

5.2. PERSPECTIVAS

La similitud encontrada en la respuesta de los explantes aéreos de vitroplantas con los explantes de raquilla y plúmula previamente reportados permiten inferir que realizando unos ajustes al protocolo establecido se puede incrementar la eficiencia de la formación de callo embriogénico y por ende producir de manera masiva plántulas de cocotero, así mismo mediante estos explantes se puede reducir el riesgo de variación somaclonal, ya que este proceso permitiría rejuvenecer los ciclos de cultivo.

Por otra parte, el estudio de estabilidad genética presentado a través de los ALFP puede ser utilizado como base para otros estudios, tales como: el comprobar que el uso de los explantes para refrescar el ciclo de cultivo, reduce la variación somaclonal que se presenta el cultivo de tejidos en cocotero, así como evaluar el uso de la criopreservación para la conservación de callos embriogénicos, etc.

BIBLIOGRAFÍA

- Alcántara, C. J. S., Castilla, P. M. G., Sánchez, M. R. M. (2017). Importancia de los cultivos vegetales *in vitro* para establecer bancos de germoplasma y su uso en investigación. *Biociencias*, 1(1). Recuperado a partir de <https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/Biociencias/article/view/2222>
- Ahuja, S. Ahuja, S. and Ahuja, U. (2014). Coconut - History, uses, and folklore. *Asian Agri-History*. 18. 221-248.
- Alrifai, Oday and Marcone, Massimo. (2019). Coconut., The Tree of Life. Improvement by Biotechnology. 10.1016/B978-0-444-64046-8.00464-X.
- Apavatjirut, P. and J. Blake (1977). Tissue culture of stem explants of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Oléagineux*, 32: 267-271.
- Arencibia, AD; Carmona, ER; Cornide, MT; Castiglione, S; O'Relly, J; China, A; Oramas, P; Sala, F. (1999). Somaclonal variation in insect-resistant transgenic sugarcane (*Saccharum hybrid*) plants produced by cell electroporation. *Transgenic Research*, 8: 349–360.
- Agarwal M., Shrivastava N., Padh H. (2008). Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep*, 27:617–631. DOI 10.1007/s00299-008-0507-z.
- Ashburner GR (1999). La aplicación de marcadores moleculares al mejoramiento genético del coco. En: Oropeza C, Verdeil JL, Ashburner GR, Cardega R, Santamaria JM (eds) *Avances actuales en biotecnología del coco*. Editores Académicos Kluwer, Boston.
- Azofeifa–Delgado A. (2006). Uso de Marcadores Moleculares en Plantas; Aplicaciones en Frutales del Trópico *Agronomía Mesoamérica*, 17: 221 – 242.
- Azpeitia M., A., (2003). Tesis Estudio de diferentes estrategias para promover la embriogénesis somática en cocotero (*Cocos nucifera* L.) a partir de explantes de plúmula. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.
- Bairu M. W., Aremu A. O., Van Staden J. (2011). Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Reg.*, 63:147–173. DOI 10.1007/s10725-010-9554-x.

- Bairu M., Fennell C., van Staden J. (2006). The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in Cavendish banana (*Musa* AAA cv. 'Zelig'). *Scientia Horticulturae*, 108: 347-351. 10.1016/j.scienta.2006.01.039.
- Barraza M. A., Sánchez T. F. L., Robert M., Esqueda M., Gardea A. (2006). Variabilidad genética en *Agave angustifolia* Haw. de la Sierra Sonorense, México, Determinada con marcadores AFLP. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 29(1): 1-8.
- Baudouin, L. and Lebrun, P. (2002). The development of a microsatellite kit and dedicated software for use with coconuts. *Burotop*, 17: 16-20.
- Bednarek, PT; Orłowska, R; Koebner, RMD; Zimny, J. (2007). Quantification of the tissue-culture induced variation in barley (*Hordeum vulgare* L.). *BMC Plant Biology*, 7: 10.
- Boutilier K., Angenent G.C., Castan M.S., Hui L. (2016). Haploid Embryogenesis. US20160212956A1. Patent. Jul 28.
- Buffar-Morel, J., J. L. Verdeil and C. Pannetier. (1992). Embryogenése somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L) á partir d'explants foliaires: étude histologique. *Canadian Journal of Botany*, 70: 735-741.
- Branton, R. L. and J. Blake. (1986). *In vitro* plantlet development from calloid derived from immature inflorescence of *Cocos nucifera* L. In: Somers D.A., Gengenbach B.G, Biesboer D.O., Hacket W. P. and Green C.E. (Eds) Abstract of VI International Congress of Plant Tissue and Cell Culture.
- Brar, SM; Brar, DS. (1998). Somaclonal variation: mechanism and applications in crop improvement. In Jain, SM; Brar, DS. eds. Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement. Dordrecht, Kluwer. p. 15-37.
- Cabrita L.F., Aksoy U., Hepaksoy S., Leitao J.M. (2001). Suitability of isozyme, RAPD and AFLP markers to assess genetic differences and relatedness among fig (*ficus carica* L.) clones. *Sci Hort*, 87(4): 261 – 273.
- Cardone, S; Olmos, S; Echenique, V. (2004). Variación somaclonal. In Echenique, V; Rubinstein, C; Mroginski, L. eds. Biotecnología y mejoramiento vegetal. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. Ediciones INTA, Argentina. p. 81-96.
- Cardone, S., S. Picca. (2000). Biotecnología y mejoramiento vegetal. INTA, Argentina. 445 p.

- Carolan, JC; Hook, ILI; Walsh, JJ; Hodkinson, TR. (2002). Using AFLP markers for species differentiation and assessment of genetic variability of *in vitro* cultured *Papaver bracteatum* (Section *Oxytona*). *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 38: 300–307.
- Cassells, A.C. y Curry, R.F. (2001). Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 64: 145-157.
- Cervera M.T., Remington D., Frigerio J.- M., Storme V., Ivens B., Boerjan W., Plomion C. (2000). Improved AFLP analysis of tree species. *Can J For Res*, 30: 1608 – 1616.
- Chan, J.L., L. Sáenz, C. Talavera, R. Hornung, M. Robert and C. Oropeza. (1998). Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*, 17: 515-521.
- Chen, J; Henny, RJ; Devanand, PS; Chao, CT. (2006). AFLP analysis of nephthytis (*Syngonium podophyllum* Schott) selected from somaclonal variants. *Plant Cell Reports*, 24: 743–749.
- Coto, O. (2005). Tendencias actuales del mejoramiento genético de la uva (*Vitis spp.*). *CitriFrut*, 22 (1): 31-37.
- Dollet, Michel & Quaiçoe, Robert & Pilet, Fabian. (2009). Review of Coconut “Lethal Yellowing” type diseases Diversity, variability and diagnosis. *OCL - Oleagineux Corps Gras Lipides*. 16. 97-101. 10.1684/ocl.2009.0246.
- Doyle J. J., Doyle J.L., (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12:13–15.
- Domínguez, E.; A R. González Castillo, J. I. López y P. Ruíz. (1999). El cocotero *Cocos nucifera* L. Manual para la producción en México. INIFAP.CIRGOC. Campo Experimental Huimanguillo. Libro Técnico Núm. 6. Tabasco, México. 132 p.
- Ebert, A and H. F. Taylor. (1990). Assessment of the changes of 2,4- dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 20: 165- 172.

- Euwens, C. J. (1976). Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera* L.) and cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum*, 36: 23-28.
- Euwens, C. J. and Blake J. (1977). Culture of coconuts and date palm tissue with a view to vegetative propagation. *Acta Horticulturae*, 78: 277-288.
- Euwens, C. J. (1978). Effects of organic nutrients and hormones on growth and development of tissue explants from coconut (*Cocos nucifera* L.) and date (*Phoenix dactylifera*) palms cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum*, 42: 173-178.
- Ermini, J. L., Tenaglia, G. C., Parisod, C. and Pratta, G. R (2021). Banana somaclonal variation assessed by Amplified Fragment Length Polymorphism profiles at early cycles of *in vitro* culture. *Agriscientia*, 38(2): 143-148. DOI: 10.31047/1668.298x.v38.n2.33260.
- Etienne, H; Anthonny, F; Dussert, S; Fernandez, D; Lashermes, P; Bertrand, B. (2002). Biotechnological applications for the improvement of coffee (*Coffea arabica* L.). *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 38: 129-138.
- FAOSTAT. (2017). Cultivos. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>. (Consultado 29/10/2021).
- FAO, (2019). Recuperado de: <http://www.fao.org:80/3/y3557s/y3557s08.htm> (Consultado 16/05/2022).
- Fernando, S. C. and C. K. A Gamage. (2000). Abscisic acid induced somatic embryogenesis in immature embryo explants of (*Cocos nucifera* L.). *Plant Science*, 151: 193- 98.
- Feuser, S; Meler, K; Daquinta, M; Guerra, MP; Nodari, RO. (2003). Genotypic fidelity of micropropagated pineapple (*Ananas comosus*) plantlets assessed by isozyme and RAPD markers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 72: 221–227.
- Freire-Seijo, M. (2003). Aspectos básicos de la embriogénesis somática. *Biotecnología Vegetal*, 3(4). Recuperado de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/263> Consultado 03-05-2022
- Gaj, M. (2004). Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regul.*, 43, 27–47.

- Galeano, H. C. (2005). Estandarización de la técnica molecular de AFLP en palma de aceite tipo Dura (*Elaeis guineensis* Jacq.) y estudio preliminar de caracterización. *Agronomía Colombiana*, 23(1),42-49. [fecha de Consulta 03 de marzo de 2021]. ISSN: 0120-9965. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=180316951006>
- George, E.F. (1993). Variation in cultures and regenerated plants. In George, E.F. ed. *Plant propagation by tissue culture*. 2 ed. Edington, R.U., Exegetics. p. 3-36.
- Gibbons, M. (1996). *Palmeras. Guía de estudio e identificación*. Ediciones Omega. Barcelona, España. 80 p.
- Granados Sánchez, D. y López Ríos, G. F. (2002). Manejo de la palma de coco (*Cocos nucifera* L.) en México. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 8(1): 39 - 48. [fecha de Consulta 19 de noviembre de 2020]. ISSN: 2007-3828. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=629/62980105>
- Gupta, P. K., S.V. Kendurkar, V. M. Kukarni, M.V. Shirgurkar, and A. F. Mascarenhas. (1984). Somatic embryogenesis and plants from zygotic embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.) *in vitro*. *Plant Cell Reports*, 3: 322-325.
- Harries, H. C. (1971). Coconut varieties in America. *Oleagineux*, 26: 235-242.
- Harries, H. C. (1977). The Cape Verde region (1499 to 1549): the key to coconut culture in the western hemisphere. *Turrialba* 27(3): 227-231.
- Hartmann HT, Kester DE, Davies FT, Geneve RL (1997). *Plant propagation principles and practices*. Sixth edition. New Jersey: Prentice Hall, pp 125-146.
- Jain, S. (2001). Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica*, 118: 153-166.
- James, A., Peraza-Echeverria, S., Peraza-Echeverría, L., y Herrera-Valencia, V. (2007). Variation in Micropropagated Plants. *Proceedings of the Second International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants* (pp. 55-63). Cancún: International Society of Horticultural Sciences.
- Jung, HS; Van, K; Kim, MY; Lee, SH. (2004). Identification of DNA variations using AFLP and SSR markers in soybean somaclonal variants. *Korean Journal of Crop Science*, 49: 1-4.

- Kalaipandian, S.; Mu, Z., Kong, E.Y.Y., Biddle, J., Cave, R., Bazrafshan, A., Wijayabandara, K., Beveridge, F.C., Nguyen, Q., Adkins, S.W. (2021). Cloning Coconut via Somatic Embryogenesis: A Review of the Current Status and Future Prospects. *Plants* 2021, 10, 2050. <https://doi.org/10.3390/plants10102050>
- Karp A., Seberg O.L.E., Buiatti M. (1996). Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. *Ann Bot.*, 78: 143–149.
- Karunaratne, S. and K. Periyapperuma. (1989). Culture of immature embryos of coconut, *Cocos nucifera* L: callus proliferation and somatic embryogenesis. *Plant Science*, 62: 247-253.
- Larkin, P. (2004). Somaclonal Variation: Origins and Causes. *Encyclopedia of Plant and Crop Science* by Marcel Dekker, Inc. All rights reserved. pp. 1158-1161.
- Larkin, P. y Scowcroft. W. (1981). Somaclonal variation a novel source of variability from cells cultures from plant improvement. *Theor. Appl. Genet.*, 60: 197-214.
- Lédo A. y Vendrame, W., (2021). Coconut Micropropagation and Cryopreservation. Editorial Board (pp.307-337). DOI:10.1002/9781119750802.ch6
- Lima, E. B., Sousa, C. N., Meneses, L. N., Ximenes, N. C., Santos Júnior, M. A., Vasconcelos, G. S., Lima, N. B., Patrocínio, M. C., Macedo, D., & Vasconcelos, S. M. (2015). *Cocos nucifera* (L.) (Arecaceae): A phytochemical and pharmacological review. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 48(11), 953–964. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20154773>
- Lizano, M., Salazar, R., Moreira, Z., Brenes, G. (2018). Guía técnica del cultivo del coco. Ministerio de Agricultura y Ganadería de El Salvador. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, pp. 14-15.
- Lopes, T; Pinto, G; Loureiro, J; Costa, A; Santos, C. (2006). Determination of genetic stability in long-term somatic embryogenic cultures and derived plantlets of cork oak using microsatellite markers. *Tree Physiology*, 26: 1145–1152.
- Martinelli, L. Candioli, E. Costa, D. Poletti, V. Rascio, N. (2001). Morphogenic competence of *Vitis rupestris* S. secondary somatic embryos with a long culture history. *Plant Cell Reports*, 20: 279-284. 10.1007/s002990100339.

- Martínez, D., Rojas, L., Urreal, A., Jiménez, E., & Monsalve F, Z. (2007). Caracterización genómica mediante AFLP de *Stevia rebaudiana* Bertoni cultivada en el departamento de Antioquia (Colombia). *Biología Vegetal*, 7(2). Recuperado de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/364/992>
- Matthes, M; Singh, R; Cheah, S.-C; Karp, A. (2001). Variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue culture derived regenerants revealed by AFLP with methylation sensitive enzymes. *Theoretical and Applied Genetics*, 102: 971–979.
- McCurrach, C. J. (1970). *Palms of the world*. Harper y Brothers. New York, USA. 290 pp.
- Medina, C., I. García, M. Caro, F. Aristizabal. (2007). Análisis AFLP de variación somaclonal en embriones somáticos de *Hevea brasiliensis*. *Rev. Col. Cienc. Quim. Farm.*, 36(1): 70-80.
- Montero Cortés Mayra Itzcalotzin. (2009). Estudios moleculares durante la formación y germinación de embriones de cocotero. Tesis de doctorado, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1003/589/1/PCBP_D_Tesis_2009_Mayra_Montero_Cortes.pdf
- Murillo R. P., Aguilar P. H. (2021). Principales ácaros encontrados en laboratorios comerciales de cultivo de tejidos vegetales y su asociación con hongos en el Valle Central de Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 45(1): 41-52. ISSN:0377-9424
- Nair KP (2021). La palma de coco (*Cocos nucifera* L.). En: *Cultivos de árboles*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-62140-7_3
- Nampoothiri, K.U.K. & Krishnakumar, V. & Thampan, P. & Nair, Achuthan. (2018). The Coconut Palm (*Cocos nucifera* L.) - Research and Development Perspectives. 10.1007/978-981-13-2754-4.
- Nguyen, QT, Bandupriya, HDD, López-Villalobos, A. (2015). Cultivo de tejidos e intervenciones biotecnológicas asociadas para la mejora del coco (*Cocos nucifera* L.): una revisión. *Planta*, 242: 1059–1076. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2362-9>
- Oropeza, C. and J. L. Chan. (1995). Protocol for the formation of somatic embryos from coconut plumule explants. In: J.L. Verdeil (Ed.) *Compendium of protocols*. STD3 (ERTBTS3*CT940298). ORSTOM-CIRAD, Montpellier, Francia.

- Oropeza, C., R. Cardeña, D. Zizumbo, J.L. Chan y G. R. Ashburner. (1996). Biotecnología aplicada en la producción de plantas de cocotero. Novena reunión científica-tecnológica. Villahermosa, Tabasco, 5 y 6 de diciembre, pp. 163-168.
- Oropeza, C. (1998). Amarillamiento letal del cocotero. *Investigación y Ciencia*, 256: 30-33.
- Oropeza C, Sáenz L, Chan JL, Sandoval G, Pérez-Núñez T, Narvaez M, Rodríguez G, Borroto C (2016). Coconut micropropagation in Mexico using plumule and floral explants. *CORD* 32: 21-26.
- Osorio M. P., De la peña C., Oropeza C., Nic-Can G., Córdova L. I., Castillo C. E., Sáenz C. L. (2020). A peak in global DNA methylation is a key step to initiate theomatic embryogenesis of coconut palm (*Cocos nucifera* L). *Plant Cell Reports*. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02568-2>
- Pannatier, C. and J. Buffard-Morel. (1982). First results of somatic embryo production from leaf tissue of coconut, *Cocos nucifera* L. *Oléagineux*, 37: 349-354.
- Patzak, J. (2003). Assessment of somaclonal variability in hop (*Humulus lupulus* L.) *in vitro* meristem cultures *Molecular methods*. *Euphytica* 131:343–350.
- Pech y Ake AE., Souza R., Maust B., Santamaría JM., Oropeza C. (2004). Enhanced aerobic respiration improves *in vitro* coconut embryo germination and culture., *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 40:90–94. DOI: 10.1079/IVP2003480., Society for *In vitro* Biology 1054-5476/04
- Pech y Aké A., Maust B., Orozco-Segovia A., Oropeza C. (2007). The effect of gibberellic acid on the *in vitro* germination of coconut zygotic embryos and their conversion into plantlets. *In vitro Cell.Dev.Biol.—Plant.*, 43:247–253. DOI 10.1007/s11627-006-9018-1
- Perera, L, J.R. Russell, J. Provan y W. Powell. (2001). Levels and distribution of genetic diversity of coconut (*Cocos nucifera* L., var. *Typica form typica*) from Sri Lanka assessed by microsatellite markers. *Euphytica*, 122(2): 381–389.
- Pérez-Núñez, M. T., Chan J. L., Sáenz L., Gonzáles T., Verdeil J. L., and Oropeza C. (2006). Improved somatic embryogenesis from *Cocos nucifera* (L) plumule explants. *In vitro Cell Dev Biol-Plant*, 42:37-43.

- Pérez-Núñez MT, Souza R, Sáenz L, Chan JL, Zúñiga-Aguilar JJ, Oropeza C. Detection of a SERK-like gene in coconut and analysis of its expression during the formation of embryogenic callus and somatic embryos. *Plant Cell Rep.* 2009 Jan;28(1):11-9. doi: 10.1007/s00299-008-0616-8. Epub 2008 Sep 26. PMID: 18818928.
- Persley, G. J. (1992). *Replanting the tree of life. Towards an International agenda for coconut palm research.* C.A.B. International. 156 p.
- Pierik, RLM. (1997). *In vitro culture of higher plants.* Dordrecht, Kluwer. 364 p.
- Prado, MJ; Gonzalez, MV; Romo, S; Herrera, MT. (2007). Adventitious plant regeneration on leaf explants from adult male kiwifruit and AFLP analysis of genetic variation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 88: 1–10.
- Puente, R. de la; González, AI; Polanco, C; Ruiz, ML. (2004). Análisis a nivel de la secuencia de marcadores AFLP indicadores de variación somaclonal en el centeno. In Congreso de Mejora Genética de Plantas (21–24 setiembre, 2004, España). León, España. Universidad de León. *Actas de Horticultura* 41: 29-32.
- Quero, H. J. (1994). *Flora de Veracruz., Fascículo No. 81 Palmae., Instituto de Ecología, A.C., Xalapa, Veracruz.* 118 pp.
- Quintanilla S, Ortiz P, Gomez A, Bernal J. (2011). Phylogenetic relationships among genera of the subtribe Oncidiinae (Epidendroideae: Orchidaceae) and a new genus: *Santanderella*. *Phytologia*, 93(3): 388-406.
- Ramos H. E., Torres C. M., Oropeza S. C., Ortiz G. C. F., Leshner G. J., Magaña A. M.A. (2018). Manejo del agroecosistema cocotero, con énfasis en el amarillamiento letal del cocotero (*Cocos nucifera* L.)/ MANAGEMENT OF THE COCONUT AGROECOSYSTEM WITH AN EMPHASIS ON LETHAL YELLOWING OF COCONUT PALM (*Cocos nucifera* L.). 11. 80-87.
- Rakoczy-Trojanowska, M. (2002). The effects of growth regulators on somaclonal variation in rye (*Secale cereale* L.) and selection of somaclonal variants with increased agronomic traits. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 7: 1111–1120.
- Rico–Cabanás L. (2005). Nuevos retrotransposones de naranjo. Desarrollo de marcadores basados en retrotransposones para la evaluación de la biodiversidad de los cítricos.

- Tesis doctoral. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Barcelona. España. 222 p.
- Rivera-Solís, G., Sáenz C., L., Narváez, M., Rodríguez, G., and Oropeza, C. (2018). Addition of ionophore A23187 increases the efficiency of *Cocos nucifera* somatic embryogenesis. 3 Biotech, 8(8), 366. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1392-y>
- Rocha S. P. J. (2002). Teoría y práctica para la extracción y purificación del ADN en palma de aceite / Theory and practice for the extraction and purification of the oil palm DNA. Palmas 0121-2923. 23. 9.
- Sáenz L., Chan J. L., Narvaez M., y Oropeza C. (2018). Protocolo de Micropropagación de Coco de Plumule Explants. Protocol for the Micropropagation of Coconut from Plumule Explants. Crossref DOI link: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4_9
- Sáenz L, Herrera G, Uicab F, Chan JL and Oropeza C (2010). Influence of form of activated charcoal on embryogenic callus formation in coconut (*Cocos nucifera*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 100: 301-308.
- SAGARPA. (2017). Planeación agrícola nacional 2017-2030.
- Sahijram, L; Soneyi, JR; Bollamma, KT. (2003). Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa* spp.). *In vitro* Cellular and Developmental Biology – Plant, 39: 551–556.
- Samosir YMS, Adkins SW (2014). Mejora de la aclimatación a través del cultivo fotoautotrófico de plántulas de coco (*Cocos nucifera*): un sistema *in vitro* para el intercambio eficiente de germoplasma. *In vitro* Cell Dev Plant, 50: 493–501. doi: 10.1007 / s11627-014-9599-z
- Sánchez C. N., Jiménez V. M. (2009). Técnicas moleculares para la detección de variantes somaclonales. *Agronomía Mesoamericana*, 20(1): 135-151. [fecha de Consulta 27 de noviembre de 2020]. ISSN: : 1021-7444., Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=437/43711514015>
- Sandoval-Cancino G., Oropeza C., Sáenz L., Narváez M., Rodríguez G., Chan J. L., (2018). Chapter 8: Coconut (*Cocos nucifera* L.) Somatic Embryogenesis Using Immature Inflorescence Explants., Springer International Publishing AG, part of Springer Nature.,

- S. M. Jain and P. Gupta (eds.), Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants, Forestry Sciences 85.
- Sandoval-Cancino G.(2016). Incremento de la capacidad de multiplicación del callo embriogénico a partir de explantes obtenidos de tejido floral del cocotero. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., México. pp. 121
- Sandoval-Cancino, G., Sáenz, L., Chan, J.L., & Oropeza, C. (2016). Improved formation of embryogenic callus from coconut immature inflorescence explants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 52, 367-378.
- Sisunandar S, Rival A, Turquay P, Samosir Y, Adkins SW (2010a). La criopreservación de embriones cigóticos de coco (*Cocos nucifera* L.) no induce cambios morfológicos, citológicos o moleculares en las plántulas recuperadas. *Planta*, 232: 435–447. doi: 10.1007 / s00425-010-1186-x
- Śliwińska, A.A.; Białek, A. Orłowska, R., Mańkowski, D., Sykłowska-Baranek, K., Pietrosiuk, A. (2021). Comparative Study of the Genetic and Biochemical Variability of *Polyscias filicifolia* (Araliaceae) Regenerants Obtained by Indirect and Direct Somatic Embryogenesis as a Source of Triterpenes. *Int. J. Mol. Sci.*, 5752. <https://doi.org/10.3390/ijms22115752>.
- Trisaningsih, U. and Wahyuni, S. (2020). The Effect of Coconut Water and Planting Media to the Growth of Christmas Palm (*Veitchia merilli*). 10.2991/assehr.k.200402.018.
- USDA (2016). United States Department of Agriculture. <https://plants.usda.gov> (consultado 29 de mayo 2021).
- Vendrame W.A., Kochert G., Wetzstein H.Y. (1999). AFLP analysis of variation in pecan somatic embryos. *Plant Cell Rep.*, 18: 853–857.
- Verdeil, J., Alemanno, L., Niemenak, N., & Tranbarger, T. (2007). Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? *Trends in Plant Science*, 12(6):245–252. doi:10.1016/j.tplants.2007.04.002
- Verdeil, J.L., C. Huet, F. Grosdemanges, A. Rival and J. Buffard-Morel. (1992). Coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryogenesis: Obtention of several clone ramets. *Oléagineux*, 47: 465-469.

- Verdeil, J-L., C. Huet, F. Grosdemange, and J. Buffar- Morel. (1994). Plan regeneration from cultured immature inflorescence of coconut (*Cocos nucifera* L.): evidence for somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*, 3. 218-221.
- Verdeil, J-L., and J. Buffar- Morel. (1995). Somatic embryogenesis in coconut (*Cocos nucifera* L.): In: YPS Bajaj (Ed) *Biotechnology in agriculture and forestry*, Vol. 30, Somatic embryogenesis and synthetic seed I. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Alemania pp. 299-317.
- Verdeil, J-L. (1998). Studies of growth regulators adsorption by activated charcoal. In: J-L Verdeil (Ed). *Reporte Final, 1995-1998: STD (ERBTS3* CT940298) ORTOMCIRAD*, Montpellier, Francia. pp. 14-15.
- Viñas, M., Jiménez, V. M. (2011). Factores que influyen en la embriogénesis somática in vitro de palmas (Arecaceae). *Revista Colombiana de Biotecnología*, XIII(2),229-242. ISSN: 0123-3475. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77621587023>
- Von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J. and Filonova, L. (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69: 233-249.
- Von Arnold, S. (2008). Somatic embryogenesis. In: George, E. F. and de Klerk, G-J (eds). *Plant propagation by tissue culture*. Capítulo 9. 3 ed. The Netherlands: Springer. pp. 335-354.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., and Zabeau M. (1995). AFLP: a new technique for DNA finger printing. *Nucleic Acids Res.*, 23: 4407–4414.
- Ward, R. G., & Brookfield, M. (1992). *Special Paper: The Dispersal of the Coconut: Did It Float or Was It Carried to Panama? Journal of Biogeography*, 19(5), 467. doi:10.2307/2845766
- Wei L. L. (2012). Tesis Determinación de la variación genética en plantas regeneradas a través de embriogénesis somática utilizando diferentes explantes de papaya. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C.
- Zizumbo-Villarreal, D. (1996). History of coconut (*Cocos nucifera* L.) in Mexico: 1539–1810. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 43. 505-515. 10.1007/BF00138827.

ANEXOS

Anexo. 1. Tabla de análisis estadístico de experimento de oxidación.

% OXIDACIÓN					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	69.51856298	13.9037126	3.75	0.0692
Error	6	22.2370889	3.70618148		
Corrected total	11	91.7556188			
R-Square	Coeff Var	Root MSE	Oxidacion Mean		
0.757649	4.053125	1.925145	47.49778		

Anexo. 2. Tabla análisis general de polimorfismo en vitroplantas de cocotero.

ANÁLISIS GENERAL												
Agrupación	Primers	Rango	# Individuos	No. Loci totales	No. Loci polimórficos	No. Loci comunes	% polimórfico	Índice de similitud	DS	Máximo	Mínimo	
A: E73 / M140	GGG/GTC	260 1066	10	22	5	17	22.73	0.94	0.0530	1	0.87	
B: E52 / M307	CCC/CAG	273 1039	10	23	5	18	21.74	0.94	0.0331	1	0.88	
C: E73 / M56	GGG/CGC	273 1300	10	21	5	16	23.81	0.95	0.0414	1	0.89	
D: E181 / M140	CCC/CAG	233 984	10	20	5	15	25	0.94	0.0359	1	0.88	
E: E43 / M238	ATA/ATC	280 984	10	13	1	12	7.69	0.98	0.0200	1	0.96	
F: E34 / M140	AAT/GTC	235 984	10	16	2	14	12.50	0.97	0.0239	1	0.93	
G: E35/M3	ACA/AAG	147 984	10	25	2	23	8	0.98	0.0151	1	0.96	
H: E35/ M13	ACA/AAG	290 984	10	15	1	14	6.67	0.98	0.0173	1	0.97	
I: E36/ M16	ACC/ACC	227 984	10	23	3	20	13.04	0.96	0.0316	1	0.93	
J: E36/M13	ACC/AAG	291 984	10	12	2	10	16.67	0.95	0.0364	1	0.91	
K: E38/ M13	ACT/AAG	202 984	10	17	0	17	0	1	0	1	1	
L: E38/M12	ACT/AAC	202 984	10	22	3	19	13.64	0.96	0.0273	1	0.93	
TOTAL			10	229	34	195	14.85	0.96	0.0205	0.9977	0.94	

Anexo. 3. Tabla análisis de polimorfismo en vitroplantas de alto del pacífico.

ALTO DEL PACÍFICO										
Agrupación	Primers	# Individuos	No. Loci totales	No. Loci polimórficos	No. Loci comunes	% polimórfico	Índice de similitud	DS	Máximo	Mínimo
A: E73 / M140	GGG/GTC	5	22	1	21	4.55	0.99	0.0126	1	0.98
B: E52 / M307	CCC/CAG	5	23	3	20	13.04	0.96	0.0248	1	0.92
C: E73 / M56	GGG/CGC	5	21	3	18	14.29	0.97	0.0397	1	0.92
D: E181 / M140	CCC/CAG	5	20	2	18	10.00	0.96	0.0304	1	0.94
E: E43 / M238	ATA/ATC	5	13	0	13	0	0.97	0	1	1
F: E34 / M140	AAT/GTC	5	16	2	14	12.5	0.97	0.0223	1	0.93
G: E35/M3	ACA/AAG	5	25	1	24	4	0.99	0.0110	1	0.98
H: E35/ M13	ACA/AAG	5	15	0	15	0	1	0	1	1
I: E36/ M16	ACC/ACC	5	23	2	21	8.70	0.98	0.0235	1	0.95
J: E36/M13	ACC/AAG	5	12	1	11	8.33	0.97	0.0225	1	0.96
K: E38/ M13	ACT/AAG	5	17	0	17	0	1	0	1	1
L: E38/M12	ACT/AAC	5	22	0	22	0	1	0	1	1
TOTAL		5	229	15	214	6.55	0.98323	0.0076	0.9977	0.9742

Anexo. 4. Tabla análisis de polimorfismo en vitroplantas de Enano verde de Pilipog.

ENANO VERDE DE PILIPOG										
Agrupación	Primers	# Individuos	No. Loci totales	No. Loci polimórficos	No. Loci comunes	% polimórfico	Índice similitud	DS	Máximo	Mínimo
A: E73 / M140	GGG/GTC	5	22	4	18	18.18	0.96	0.0544	1	0.89
B: E52 / M307	CCC/CAG	5	23	3	20	13.04	0.97	0.0251	1	0.93
C: E73 / M56	GGG/CGC	5	21	0	21	0	1	0	1	1
D: E181 / M140	CCC/CAG	5	20	2	18	10	0.97	0.0227	1	0.94
E: E43 / M238	ATA/ATC	5	13	0	13	0	0.97	0.0227	1	0.94
F: E34 / M140	AAT/GTC	5	16	2	14	12.5	0.97	0.0272	1	0.93
G: E35/M3	ACA/AAG	5	25	1	24	4	0.99	0.0105	1	0.98
H: E35/ M13	ACA/AAG	5	15	1	14	6.67	0.99	0.0178	1	0.97
I: E36/ M16	ACC/ACC	5	23	0	23	0	1	0	1	1
J: E36/M13	ACC/AAG	5	12	0	12	0	1	0	1	1
K: E38/ M13	ACT/AAG	5	17	0	17	0	1	0	1	1
L: E38/M12	ACT/AAC	5	22	1	21	4.55	0.97	0.02	1	0.95
TOTAL		5	229	14	215	6.11	0.98	0.01	0.9953	0.9741

Anexo. 5. Matriz de similitud de vitroplantas de cocotero.

	A1	A2	A3	A4	A5	P1	P2	P3	P4	P5
A1	1.0000									
A2	0.9883	1.0000								
A3	0.9906	0.9977	1.0000							
A4	0.9792	0.9862	0.9838	1.0000						
A5	0.9812	0.9742	0.9765	0.9746	1.0000					
P1	0.9577	0.9508	0.9531	0.9561	0.9531	1.0000				
P2	0.9442	0.9466	0.9442	0.9519	0.9442	0.9767	1.0000			
P3	0.9459	0.9390	0.9365	0.9444	0.9412	0.9741	0.9883	1.0000		
P4	0.9368	0.9439	0.9415	0.9447	0.9368	0.9742	0.9930	0.9859	1.0000	
P5	0.9365	0.9390	0.9412	0.9398	0.9412	0.9741	0.9883	0.9811	0.9953	1.0000