



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN  
WRINKLED1  
EN EMBRIONES DE COCOTERO EN TRES ESTADIOS DE  
DESARROLLO.**

Tesis que presenta

**DAMIAN ALBERTO MAYO RUIZ**

En opción al título de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

(Ciencias Biológicas: **BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR DE PLANTAS**)

Mérida, Yucatán, México

2023

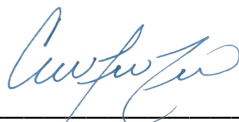
*CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS*



**RECONOCIMIENTO**

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Damian Alberto Mayo Ruiz** titulado “**Análisis de la expresión del factor de transcripción WRINKLED1 en embriones de Cocotero en tres estadios de desarrollo**”, fue realizado en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular en Plantas en la línea de investigación interacción planta-ambiente, laboratorio 06 del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección del **Dr. Ignacio Rodrigo Islas Flores**, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente



---

Dra. Cecilia Hernández Zepeda  
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México a 29 de junio de 2023

## 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.

Firma: \_\_\_\_\_



Damian Alberto Mayo Ruiz

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de **Bioquímica y Biología Molecular en Plantas** del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y forma parte del proyecto titulado “**Análisis de semillas de cocotero (*Cocos nucifera* L.) con diferente grado de madurez para determinar el efecto del proteoma y el metaboloma en la calidad del endospermo líquido y sólido**” CB 2017-2018-A1-S-10398, bajo la dirección del Dr. Ignacio Rodrigo Islas Flores.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a CICY por brindarme la oportunidad de estudiar la Maestría en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular en Plantas, además de todas las facilidades brindadas para el uso de sus instalaciones.

A CONACYT por la beca No. 787612 otorgada para la realización de los estudios de Maestría.

Al Dr. Ignacio Islas Flores director de tesis, por su apoyo académico y atención a cada detalle del trabajo realizado.

Al comité tutorial integrado por el Dr. Ignacio Islas Flores, Dr. Luis Alfonso Sáenz Carbonell y Dr. Jairo Cristóbal Alejo, por sus valiosas aportaciones en cada sesión de evaluación.

Al Dr. Gregorio Godoy Hernández y la Dra. Blondy Canto Canché por ser parte del Comité de examen de grado y revisión de tesis

Al M.C. Miguel A. Tzec Simá por su apoyo técnico y académico durante la realización del trabajo.

A mis compañeros del laboratorio 06 por el apoyo anímico durante mi estancia.

## **DEDICATORIAS**

A mi familia



---

---

## ÍNDICE

<b>ABSTRACT .....</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO I .....</b>	<b>9</b>
<b>ANTECEDENTES .....</b>	<b>9</b>
<b>JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>13</b>
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>14</b>
<b>OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>14</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>14</b>
<b>ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....</b>	<b>15</b>
<b>CAPÍTULO II .....</b>	<b>17</b>
<b>MATERIALES Y METODOS .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1. OBTENCIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO. ....</b>	<b>17</b>
<b>2.2. PROCESAMIENTO DE LAS SEMILLAS DE COCOTERO.....</b>	<b>17</b>
<b>2.3. REACTIVOS Y MATERIALES. ....</b>	<b>17</b>
<b>2.4. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS .....</b>	<b>18</b>
<b>2.5. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS. ....</b>	<b>18</b>
<b>2.6. EXTRACCIÓN DE ÁCIDO RIBONUCLEICO (ARN). ....</b>	<b>19</b>
<b>2.7. INTEGRIDAD Y PUREZA DEL ARN. ....</b>	<b>19</b>

---



---

<b>2.8. Tratamiento de ARN total con DNasa</b> .....	<b>19</b>
<b>2.9. PCR PARA VERIFICAR LA EFICIENCIA DEL TRATAMIENTO CON DNASA</b> .....	<b>20</b>
<b>3.0. SÍNTESIS DE ADNC</b> .....	<b>20</b>
<b>3.1. PCR PARA VERIFICAR SÍNTESIS DE ADNC</b> .....	<b>21</b>
<b>3.2. SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR</b> .....	<b>21</b>
<b>3.3. PCR EN TIEMPO REAL</b> .....	<b>21</b>
<b>3.4. DETERMINACIÓN DE NIVELES DE EXPRESION RELATIVA.</b> .....	<b>22</b>
<b>CAPÍTULO III</b> .....	<b>23</b>
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>23</b>
<b>3.3. ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE LOS CDS DE WRI1 DE ESPECIES MONOCOTILEDÓNEAS</b> .....	<b>23</b>
<b>3.4. ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE LOS CDS DE WRI1 DE ESPECIES DICOTILEDÓNEAS</b> .....	<b>25</b>
<b>3.5. ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS DE LOS CDS DE WRI1 DE INTEGRANTES DE LA FAMILIA ARECACEAE</b> .....	<b>26</b>
<b>ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS DE LOS CDS DE WRI1 DE C. NUCIFERA.</b> .....	<b>28</b>
<b>3.6. ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS COMPLETAS DE AMINOÁCIDOS DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN WRI1 DE ESPECIES MONOCOTILEDÓNEAS Y DICOTILEDÓNEAS</b> .....	<b>29</b>
<b>3.7. ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS COMPLETAS DE AMINOÁCIDOS DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN WRI1 DE LOS INTEGRANTES DE LA FAMILIA ARECACEAE.</b> .....	<b>31</b>
<b>3.8. COMPOSICIÓN DE AMINOÁCIDOS DE WRI1 DE COCOS NUCIFERA L.</b> .....	<b>33</b>
<b>3.9. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE CMWRI1 Y AtWRI1</b> .....	<b>34</b>

---

---

<b>3.10. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE CNWRI1, EGWRI1 Y PdWRI1.</b> .....	<b>36</b>
<b>3.11. ANÁLISIS FILOGENÉTICO</b> .....	<b>37</b>
<b>3.12 DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS.</b> .....	<b>38</b>
<b>3.13 EXTRACCIÓN DE ÁCIDO RIBONUCLEICO (ARN).</b> .....	<b>40</b>
.....	<b>40</b>
<b>3.14. AMPLIFICACIÓN DE LOS TRANSCRITOS DE CNWRI1 POR PCR PUNTO FINAL.</b> .....	<b>41</b>
<b>3.15. SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR</b> .....	<b>44</b>
<b>3.16. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN WRI1 EN EL EMBRIÓN CIGÓTICO DE LA VARIEDAD ALTA DEL PACÍFICO MEXICANO</b> .....	<b>45</b>
<b>3.17. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN WRI1 EN EMBRIONES CIGÓTICOS DE LA VARIEDAD YUCATÁN ENANO VERDE</b> .....	<b>45</b>
<b>CAPÍTULO IV</b> .....	<b>47</b>
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>47</b>
<b>CAPÍTULO V</b> .....	<b>53</b>
<b>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b> .....	<b>53</b>
<b>5.1. CONCLUSIONES GENERALES</b> .....	<b>53</b>
<b>5.2. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>53</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>54</b>

---

---

## LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Variedades de cocotero ( <i>C. nucifera</i> L.) .....	6
Figura 2. Estructura del fruto de cocotero.....	7
Figura 3. Mecanismo molecular de la biosíntesis de ácidos grasos regulada por WRI1.. .....	12
Figura 4. Estrategia experimental implementada para la evaluación de la expresión de WRI1. ....	15
Figura 5. Alineamiento de secuencias de nucleótidos de WRI1, de especies monocotiledóneas.....	24
Figura 6. Alineamiento de secuencias de nucleótidos de ADNc de WRI1 de especies dicotiledóneas.....	25
Figura 7. Alineamiento de secuencias de nucleótidos de WRI1, de integrantes de la familia Arecaceae.. .....	27
Figura 8. Alineamiento de secuencias de nucleótidos de WRI1 de <i>C. nucifera</i> .....	28
Figura 9. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de WRI1 de especies monocotiledóneas y dicotiledóneas.....	30
Figura 10. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de integrantes de la familia Arecaceae.....	32
Figura 11. Características estructurales de CnWRI1 (AFH68065.1) y AtWRI1 (NP_001030857.1). ....	34
Figura 12. Alineamiento de secuencias de aminoácidos correspondientes al factor de transcripción WRI1 de <i>A. thaliana</i> (NP_001030857.1) y <i>C. nucifera</i> . (AFH68065.1)...	35
Figura 13. Características estructurales de CnWRI1 (AFH68065.1), EgWRI1 (XP_010922928.1) y PdWRI1 (XP_026661158.2).....	36

---

---

<b>Figura 14. Árbol filogenético de WRI1 de diferentes integrantes de la familia Arecaceae.....</b>	<b>37</b>
<b>Figura 15. Diseño de oligonucleótidos específicos de WRI1 y Actina.....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 16. Perfil electroforético de ARN de embriones cigóticos. ....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 17. Análisis por electroforesis en geles de 1% de agarosa de los transcritos del gen WRI1 de los embriones cigóticos de <i>C. nucifera</i>.. ....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 18. Análisis de la expresión relativa por PCR punto final del gen WRI1 de <i>C. nucifera</i>. en embriones cigóticos de cocotero en tres estadios de desarrollo de las variedades Yucatán Enano verde o Alto del Pacífico mexicano.. ....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 19. Electroferogramas de didesoxinucleótidos producidos de la secuenciación del amplicón de 125 pb. ....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 20. Análisis de la expresión relativa por qPCR del factor de transcripción WRI1 en embriones cigóticos de <i>C. nucifera</i> inmaduros, intermedios y maduros de la variedad Yucatán Enano Verde y Alto del Pacífico mexicano.....</b>	<b>46</b>
<b>Figura 21. Modelo propuesto de la expresión del factor de transcripción WRI1 en embriones cigóticos de cocotero en diferentes estadios de desarrollo de las variedades Alto del Pacífico mexicano y Yucatán Enano verde. ....</b>	<b>51</b>

---



---

---

## LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación botánica de <i>Cocos nucifera</i> L. ....	1
Tabla 2. Características de las variedades de cocotero Altos y Enanos. ....	4
Tabla 3. Composición de aminoácidos de WRI1 de <i>Cocos nucifera</i> L.....	33
Tabla 4. Secuencia de los oligonucleótidos específicos y tamaño esperado para los amplicones de los genes WRI1 y actina de <i>C. nucifera</i> . ....	39
Tabla 5. Características específicas de los oligonucleótidos diseñados para este trabajo.....	60

---

---

## ABREVIATURAS

**aa:** aminoácidos.

**AP2:** APETALA2.

**At:** *Arabidopsis thaliana*.

**BLAST:** Herramienta básica de búsqueda de alineamiento local.

**DNAc:** Ácido desoxirribonucleico complementario.

**CDS:** Región de codificación.

**Cn:** *Cocos nucifera* L.

**DEPC:** Dietilpirocarbonato.

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético.

**Eg:** *Elaeis guineensis*.

**EREBP:** Proteínas de unión a elementos sensibles a etileno.

**LCT:** Ácidos grasos de cadena larga.

**MCT:** Triacilgliceroles de cadena media.

**MM:** Marcador de peso molecular.

**pb:** Pares de bases.

---

---

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.

**Pd:** *Phoenix dactylifera*.

**qPCR/ qRT-PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa.

**ARN:** Ácido ribonucleico.

**TAG:** Triacilgliceroles.

**UV:** Ultravioleta.

**Var:** Variedad.

**WRI1:** WRINKLED1.

**WT:** Tipo silvestre.

---



---

## RESUMEN

El cocotero (*Cocos nucifera* L.) Es un cultivo de importancia comercial, miembro de la familia Arecaceae y del género *Cocos*. El cocotero produce uno de los frutos de mayor tamaño; sin embargo, tiene un embrión pequeño con respecto al tamaño del fruto. El embrión, al encontrarse alojado en el endospermo sólido, un tejido con un alto valor económico, no ha sido valorado suficientemente para estudios moleculares. Al día de hoy, hay pocas investigaciones acerca de genes reguladores de la actividad de otros genes, y procesos metabólicos relacionados con el desarrollo del embrión cigótico. En el presente trabajo, a partir del embrión cigótico de cocotero, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se amplificó el factor de transcripción WRINKLED1 (WRI1), un miembro de la familia de factores de transcripción APETALA2 (AP2). Numerosos estudios reportan a WRI1 como un regulador crucial de genes que codifican enzimas involucradas en la biosíntesis de aceite vegetal. En el caso de cocotero hay escasa información acerca de WRI1, particularmente de su comportamiento durante la maduración del embrión cigótico de dos variedades de cocotero que contrastan en la producción de aceite y carbohidratos, la variedad Yucatán Enano verde y la variedad Alta del Pacífico mexicano; la primera con menor producción de aceite con respecto a la segunda. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue realizar análisis bioinformáticos, relacionados con las regiones conservadas y estructura del factor de transcripción WRINKLED1, así como determinar mediante qPCR su nivel de expresión en embriones cigóticos de cocotero en diferente estadio de desarrollo de dos variedades que contrastan en la producción de ácidos grasos. Los resultados mostraron que la secuencia del gen completo WRI1 de *Cocos nucifera* L. (designado como CnWRI1) posee 1475 nucleótidos. El marco de lectura abierto (1028 pb) de CnWRI1 codifica una proteína de 342 aminoácidos. La secuencia deducida de aminoácidos muestra un alto grado de homología con proteínas WRI1 de otras especies, en particular con miembros de la familia Arecaceae. Los miembros WRI1 de la familia Arecaceae tienen dos dominios AP2 de unión a ADN, además contienen sitios de fosforilación cercanos al extremo N-terminal de cada dominio AP2. Análisis de expresión por qPCR mostraron el patrón de expresión de CnWRI1 el cual en la variedad Alto del Pacífico mexicano alcanza su mayor expresión en el estadio intermedio. En el caso de la variedad Yucatán Enano verde, la expresión de WRI1 fue por debajo del control de referencia (sub-expresado) en los estadios analizados.

---



---

## ABSTRACT

The coconut palm (*Cocos nucifera* L.) is a commercially important crop, a member of the Arecaceae family and the *Cocos* genus. The coconut tree produces one of the largest fruits in nature; however, it has a small embryo with respect to the size of the fruit. The embryo, being housed in the solid endosperm, a tissue with a high economic value, has not been sufficiently valued for molecular studies. To date, there is little research on genes that regulate the activity of other genes, and metabolic processes related to the development of the zygotic embryo. In the present work, from the zygotic coconut embryo, the transcription factor WRINKLED1 (WRI1), a member of the APETALA2 (AP2) family of transcription factors, was amplified by polymerase chain reaction (PCR). Numerous studies report WRI1 as a crucial regulator of genes encoding enzymes involved in vegetable oil biosynthesis. In the case of the coconut tree, there is little information about WRI1, particularly about its behavior during the maturation of the zygotic embryo of two coconut varieties, that contrast in the production of oil and carbohydrates, the Yucatan Green Dwarf and the Mexican Pacific Tall; the first with lower oil production compared to the second. For this reason, the goal of this work was to carry out bioinformatic analyzes related to the conserved regions and structure of the transcription factor WRINKLED1, as well as to determine its expression level in zygotic coconut embryos at different stages of development of two contrasting varieties by means of qPCR. in the production of fatty acids. The results showed that the sequence of the complete WRI1 gene of *Cocos nucifera* L. (designated as CnWRI1) has 1475 nucleotides. The open reading frame (1028 bp) of CnWRI1 encodes a protein of 342 amino acids. The deduced amino acid sequence shows a high degree of homology with WRI1 proteins from other species, in particular with members of the Arecaceae family. WRI1 members of the Arecaceae family, have two AP2 DNA-binding domains, in addition they contain phosphorylation sites near the N-terminus of each AP2 domain. Expression analysis by qPCR showed the expression pattern of CnWRI1, which in the Mexican Pacific Tall variety reaches its highest expression in the intermediate stage. In the case of the Yucatan Green Dwarf variety, the expression of WRI1 was below the reference control (under-expressed) in the stages analyzed.

---

## INTRODUCCIÓN

La palma de coco (*Cocos nucifera* L.), es una planta tropical perenne, miembro del género *Cocos* y de la familia *Areaceae*, es un cultivo importante donde se aprovecha el fruto de coco, una fuente natural de aceite (Xiao *et al.*, 2017).

Según Alvarado *et al.* (2018), la clasificación botánica del cocotero es la siguiente:

Tabla 1. Clasificación botánica de *Cocos nucifera* L.

<b>Reino</b>	<b>Plantae</b>
<b>Subreino</b>	<b>Tracheobionta</b>
<b>División</b>	<b>Magnoliophyta</b>
<b>Clase</b>	<b>Liliopsida</b>
<b>Subclase</b>	<b>Commelinidae</b>
<b>Orden</b>	<b>Arecales</b>
<b>Familia</b>	<b>Areaceae</b>
<b>Subfamilia</b>	<b>Arecoideae</b>
<b>Género</b>	<b>Cocos</b>
<b>Especie</b>	<b><i>Cocos nucifera</i> L.</b>

Con frecuencia se hace referencia a la palma de coco (*Cocos nucifera* L.) como el “árbol de la vida”, debido a que tiene un gran valor como planta de múltiples usos, encontrándose en el 12° lugar de la lista de especies de plantas alimenticias más importantes para el hombre (Sánchez *et al.*, 2002). México contribuye con el 1.9% de la producción global de este cultivo agroindustrial, mientras que Indonesia tiene una cuarta parte del área mundial plantada con cocoteros, lo que la posiciona como un productor líder de este cultivo agrícola. Las naciones asiáticas exportan las mayores cantidades de copra, encabezadas por Tailandia, China, Malasia y Filipinas. México tuvo un balance comercial favorable en copra de coco durante 2020, con exportaciones que alcanzaron al menos 25,000 toneladas, por lo que ocupó el 7° lugar en el ranking mundial de productores (SIAP, 2021). Ese volumen representó el 5.2% de la producción nacional, y sus ventas al exterior registraron, en promedio, ingresos anuales de 16 millones de dólares para el país (SIAP, 2018). La superficie sembrada con cocotero alcanzó las 143,000 hectáreas en 2018. De estas 127,000 ha. se destinaron a la obtención de copra, y las 16,000 ha., restantes se destinaron para su consumo directo, dando así un consumo anual per capita de 3.4 kg.

Las condiciones climáticas y geográficas de la costa del Pacífico mexicano favorecen el cultivo de cocotero, especialmente en Guerrero, estado líder en producción con 194 mil toneladas, que alcanzaron un valor de 1,718 millones de pesos. En el caso particular de Yucatán se registró un volumen total de 10,042 toneladas entre 2017 y 2018 (SIAP, 2018).

Por sus características, las palmas de coco crecen en las costas; su tronco casi siempre está inclinado y alcanza una altura de 10 a 20 m, dependiendo de la variedad. Su grosor alcanza los 50 cm y se adelgaza a medida que asciende. Los cocos tienen forma ovoide, pesan hasta 2.5 kg y están cubiertos de fibras (SIAP, 2022). Dentro de la fruta se encuentra el endocarpio, también llamado semilla o cáscara. Luego se ubica la copra, la pulpa seca del coco, que forma una gran cavidad dentro de la cual se almacena el endospermo líquido (SIAP, 2018). El principal producto derivado de la palma de coco es la copra. Cuando está fresco contiene aproximadamente un 50% de humedad y cuando se seca baja al 3%, que es cuando concentra todos los nutrientes y aceite, dando lugar al producto copra, que tiene amplias posibilidades de uso en diferentes aplicaciones (SIAP, 2018).

No se conoce con exactitud el número de variedades de *C. nucifera*. Según Limones y Fernández (2016), hay dos tipos de palma según el tamaño y la estatura: altas y enanas,

aunque en los últimos años se reconoce la variedad híbrida, siendo ésta el resultado de cruces entre las variedades Enanas y Altas (Islas-Flores y Tzec-Simá, 2021). Los altos, son la variedad más cultivada alrededor del mundo; tienden a la polinización cruzada y, por lo tanto, poseen mayor variabilidad genética y morfológica, tal como se observa en la amplia variación de características como el tamaño, la forma y el color de la fruta, su composición (grosor de la cáscara, peso del endospermo) y el rendimiento. Los enanos, por otro lado, se autopolinizan en gran medida y, por lo tanto, son genéticamente más homogéneos. Esto se refleja en la morfología y apariencia más uniforme de los diferentes tipos de enanos (Chan y Elevitch, 2006). Los híbridos por lo general suelen ser más resistentes a plagas y enfermedades, pero sus características están sujetas a la variedad de sus progenitores (Niral *et al.*, 2019; Islas-Flores y Tzec-Simá, 2021). Las principales características de estas variedades se enlistan en la Tabla 2.



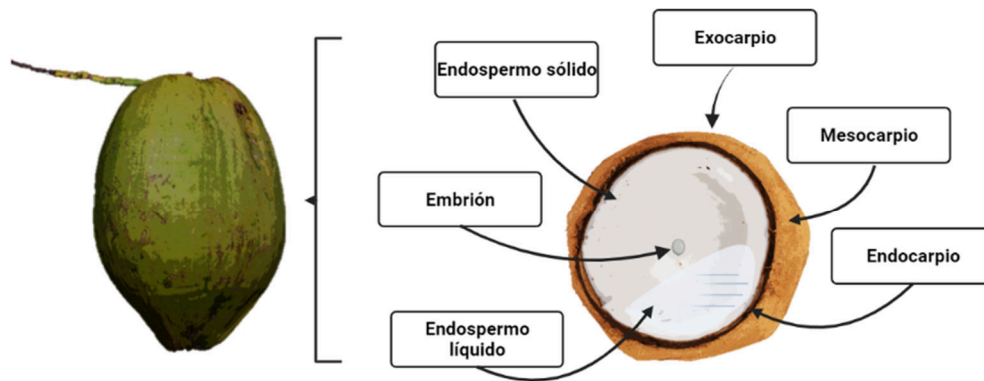
<p>Enanos</p>	<p>Tallo delgado con entrenudos cortos. Tronco leve o ausente. Floración temprana (3 años desde la plantación). Superposición considerable de las fases masculina y femenina de una inflorescencia que da como resultado la autopolinización.</p> <p>Tallo grueso con tronco, entrenudos más cortos que los enanos normales, cruzamiento exterior</p>	<p>Intermedio</p> <p>Intermedio</p>	<p>'Malayan Red', 'Yellow' and 'Green' Dwarfs, 'Cameroon Red' Dwarf, 'Nias Green' and 'Nias Yellow' Dwarfs, 'PNG Brown' Dwarf, 'Samoan Yellow' Dwarf.</p> <p>'Niu Leka', también conocido como 'Fiji Dwarf', y 'Samoan Dwarf'</p>
---------------	---	-------------------------------------	---





**Figura 1. Variedades de cocotero (*C. nucifera* L.).** Altura promedio de variedades de *Cocos nucifera* L. var. Altos del Pacífico mexicano -25m, var. Híbrida -15m, var. Yucatán Enano verde -12m.

Una de las principales características de la palma de coco, es su altura, que va desde los 12 a 25 m de altura (Figura 1), dependiendo de la variedad (Sánchez *et al.*, 2002). Posee un tallo delgado sin ramificaciones, y en la parte aérea o ápice se agrupan las hojas, formando una “corona” protegiendo el meristemo apical que es uno de los dos únicos puntos de crecimiento (Lizano, 2005). También en la parte superior se encuentra la inflorescencia y al ser una planta monoica ésta consta de flores masculinas y femeninas.



**Figura 2. Estructura del fruto de cocotero.** Se muestra un fruto completo de *Cocos nucifera* L. así como su estructura a través de un corte transversal. Las flechas indican la ubicación de cada componente en el fruto.

El fruto de *Cocos nucifera* L. consta del pericarpio, conformado por tres capas (Figura 2): el exocarpio que es una capa externa lisa y brillante; el mesocarpio fibroso, de color rojizo en estadios de madurez avanzados (Sánchez *et al.*, 2002); en el interior se encuentra el endocarpio o “nuez”, que es una capa rígida y fina de color café, llamada testa. Al interior de esta capa se encuentra el endospermo sólido que forma un espacio donde se encuentra el endospermo líquido o “agua de coco” (Lizano, 2005). El embrión se encuentra incrustado en el endospermo sólido debajo del poro germinativo (Rajesh *et al.*, 2021).



## CAPÍTULO I

### ANTECEDENTES

Numerosas especies de plantas acumulan aceite, en su mayoría triacilgliceroles (TAG), en sus semillas como recurso de almacenamiento (carbono y energía) para soporte de la germinación y el desarrollo de las plántulas (Chapman y Ohlrogge, 2012). Los aceites vegetales también son un suministro esencial para la dieta humana y para la industria. Se ha determinado que la demanda mundial de aceite vegetal se duplicará para 2030, lo que requerirá avances tecnológicos para su producción (Chapman y Ohlrogge, 2012). La biosíntesis de TAG se compone de dos pasos principales: la biosíntesis de ácidos grasos en los plástidos y el ensamblaje de TAG en el retículo endoplásmico. Después de la exportación de los ácidos grasos a partir de los plástidos, los ácidos grasos se convierten en acil-CoA y se ensamblan principalmente a través de la vía biosintética de los fosfolípidos (Bates *et al.*, 2009; Chapman y Ohlrogge, 2012). El mecanismo regulador de la biosíntesis de TAG en plantas, particularmente en las oleaginosas, es complicado y no se comprende por completo, por lo que la identificación de los reguladores de genes y el estudio de sus mecanismos regulatorios son importantes tanto para comprender el proceso biosintético del aceite como para diseñar estrategias para aumentar de manera eficiente la producción de aceite vegetal (Zhang *et al.*, 2016; Bates *et al.*, 2013).

Los triacilgliceroles se componen de tres moléculas de ácidos grasos unidas a una molécula de glicerol. La mayoría de los triacilgliceroles en las grasas y aceites contienen solo ácidos grasos de cadena larga y se denominan LCT (por sus siglas en inglés de Long Chain Triacylglycerols). El aceite de coco está compuesto principalmente por Triacilgliceroles de Cadena Media (MCT, por sus siglas en inglés de Medium Chain Triacylglycerols). Una de las principales diferencias entre los MCT de aceite de coco y los de otras grasas, es la forma en la que los animales los digieren y metabolizan (Fife *et al.*, 2013). Cuando se consumen, para metabolizar LCT se requieren enzimas digestivas pancreáticas y la bilis. A medida que los ácidos grasos individuales se liberan de la molécula de triacilglicerol, se absorben en la pared intestinal, donde forman quilomicrones (una forma de lipoproteína), que se envían al torrente sanguíneo para distribuirse por todo el cuerpo (Fife *et al.*, 2013).

Los MCT, por otro lado, no necesitan enzimas digestivas pancreáticas o bilis para la digestión. En el hígado, se utilizan preferentemente como fuente de combustible, no circulan en el torrente sanguíneo en el mismo grado que otras grasas, por lo cual es menos probable que se incorporen

a las células cebáceas y que se acumulen en las paredes de las arterias (Felton *et al.*, 1994). Debido a la facilidad con la que se digiere el aceite de coco, se ha demostrado que es útil en el tratamiento de la desnutrición (Fife *et al.*, 2013). Por esta razón, el aceite de coco se recomienda sobre otros aceites para aquellos que tienen problemas digestivos o que tienen problemas para digerir grasas.

Las células necesitan adaptarse constantemente a los cambios ambientales o intracelulares, y una forma de hacerlo es modificando los patrones de la expresión génica. La regulación de la expresión génica es uno de los eventos más importantes en el control del desarrollo y de las respuestas a los diferentes estímulos. Las proteínas maestras en la regulación de la expresión génica son conocidas como factores de transcripción (TF) (Gómez-Merino *et al.*, 2009).

Entre las familias de TF identificadas, la superfamilia AP2/ERF representa una de las clases más grandes de genes que codifican TF en las plantas (Licausi *et al.*, 2013). Los factores de transcripción AP2/ERF están involucrados en el crecimiento, desarrollo y transducción de señales en muchas respuestas fisiológicas y bioquímicas como organogénesis floral, desarrollo de semillas, resistencia a patógenos, estrés y respuesta a etileno (Sun *et al.* 2017).

Los miembros de la familia AP2/ERF contienen DBD; por sus siglas en inglés DNA-binding domains), de tipo AP2/ERF que consisten en alrededor de 60 a 70 aminoácidos y se pueden dividir en tres grupos según la estructura general: las subfamilias ERF, AP2, RAV (Hong., 2016).

La mayoría de las proteínas con un solo dominio AP2 y cuya secuencia genómica contiene una pequeña cantidad de intrones se asignan a la familia ERF (Nakano *et al.*, 2006). Los miembros de la subfamilia AP2 contienen dominios AP2/ERF dobles y las proteínas de la familia RAV contienen un dominio AP2/ERF y un dominio adicional Dominio B3, que es un dominio de unión a ADN conservado en otros TF específicos de plantas, (Swaminathan *et al.*, 2008).

WRINKLED1 (WRI1), es un miembro de la familia de factores de transcripción APETALA2 (AP2) y juega un papel clave en la biosíntesis del aceite vegetal ya que WRI1 regula la expresión de genes clave en las vías biosintéticas de ácidos grasos y glucolítica (Cernac y Benning, 2004; Chapman y Ohlrogge, 2012), (Figura 3).

En cuanto a su estructura, se ha descrito que *At*WRI1 posee un extremo del dominio conservado AP2 rico en residuos de aminoácidos S y T, y el extremo C terminal tiene un dominio ácido. El tercer exón contiene solo nueve nucleótidos y está altamente conservado, lo que corresponde a

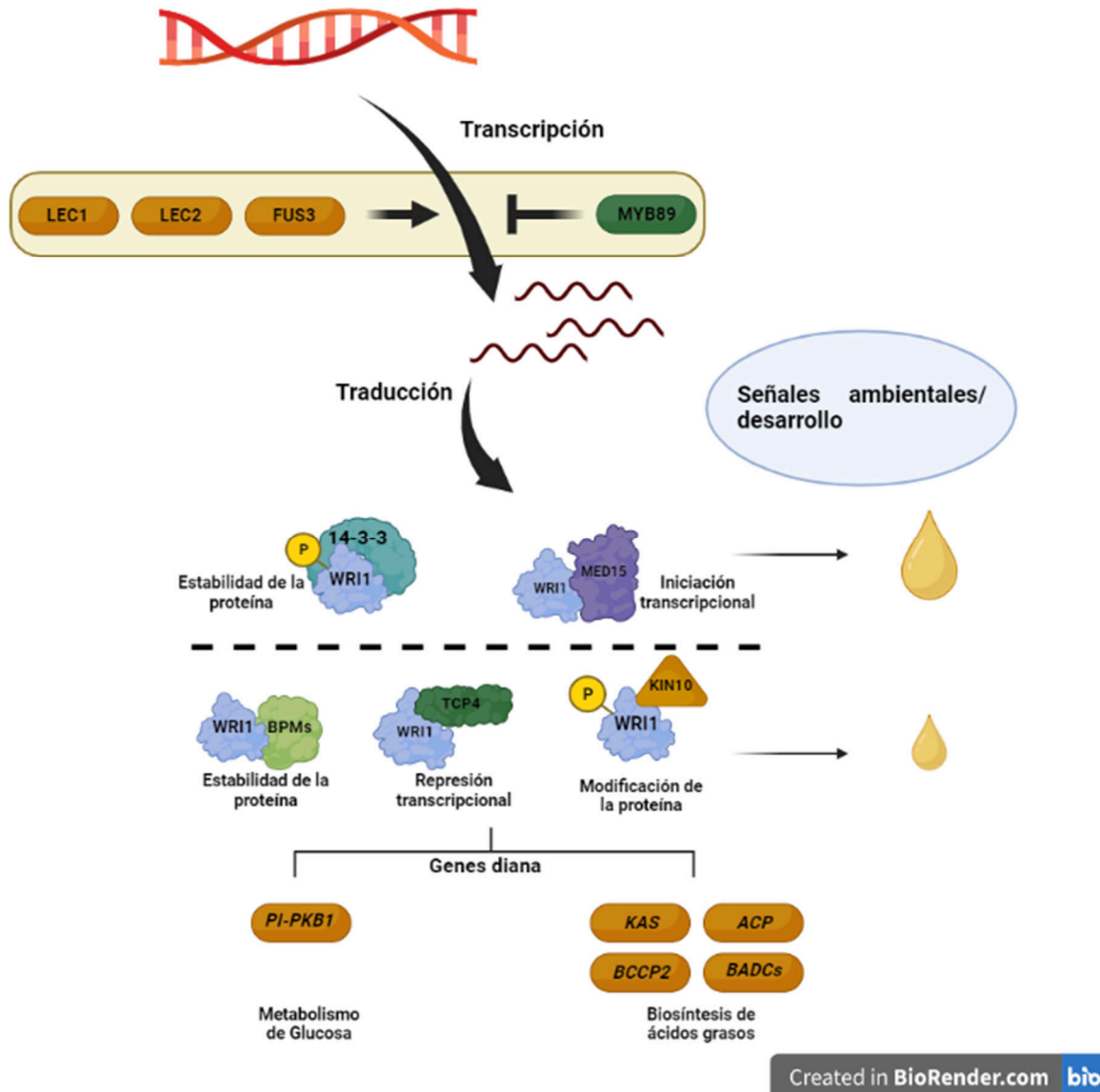
tres residuos de aminoácidos (VYL) en el primer dominio AP2 de la proteína AtWRI1 (An et al. 2017). La importancia de WRI1 se confirmó cuando el porcentaje de aceite de semillas de maíz provenientes de plantas de campo que sobreexpresan WRI1 se incrementó en un 30% (Shen et al., 2010), un aumento que se valoró en \$ 2 mil millones de dólares si se extendiera a toda la producción de maíz en los Estados Unidos.

Por otra parte, estudios en mutantes de *Arabidopsis thaliana* con pérdida de función de AtWRI1 mostraron que el contenido de aceite en la semilla se redujo en un 80% en comparación con las semillas de tipo silvestre (WT) (Forcks y Benning, 1998). Además, el análisis transcriptómico del desarrollo de semillas silvestres (WT) y mutantes (*wri1-1*), mostró que la mayoría de los genes que tienen una expresión reducida en *wri1-1* están relacionados con las vías biosintéticas glicolíticas y de ácidos grasos (Ruuska et al., 2002). Por lo tanto, WRI1 se conoce como un "regulador maestro" del control transcripcional de la biosíntesis del aceite de semilla (Chapman y Ohlrogge, 2012).

Se han encontrado numerosos ortólogos de WRI1 en especies de dicotiledóneas y monocotiledóneas, incluidas *Elaeis guineensis*, y *C. nucifera*. (Kong et al., 2018; Sun et al., 2017), aunque en estas especies no es clara su función y se conoce poco acerca de su expresión en semillas en desarrollo (Kong et al., 2018; Subroto et al., 2015). En la palma aceitera, se ha visto que *EgWRI1* se expresa abundantemente en el mesocarpio que acumula aceite y la transcripción aumenta a medida que la fruta madura (Bourgis et al., 2011). Resultados similares se observaron con el ortólogo WRI1 de aguacate (Kilaru et al., 2015) en el cuál se encontró que tiene una alta expresión en el mesocarpio.

Se ha asociado la expresión del WRI1 factor de transcripción con la regulación de la biosíntesis de aceite en las semillas oleaginosas. Por ejemplo, en el caso de *E. guineensis* el aumento en la expresión de WRI1 correlaciona con la acumulación de aceite, el cual alcanza hasta el 90% del peso del mesocarpio de la palma aceitera (Chapman y Ohlrogge, 2012). La comparación del perfil transcripcional de WRI1 en el mesocarpio de la palma aceitera reveló niveles de expresión de WRI1 cincuenta veces más altos en comparación con la detectada en el mesocarpio de palma datilera (*Phoenix dactylifera*), una palma de la familia de las Arecaceas que no acumula aceite (Chapman y Ohlrogge, 2012). En el caso de *C. nucifera*, no se sabe cuál es el comportamiento de WRI1; es por ello que en este trabajo se analizaron los niveles de expresión de WRI1 empleando la metodología de qPCR. Mediante este análisis se determinaron los cambios de expresión que se presentan entre los estadios de desarrollo; inmaduro (6-8 meses, etapa 1),

intermedio (9-10 meses, etapa 2) y maduro (11-14 meses, etapa 3; Zheng *et al.*, 2019) en embriones cigóticos de dos variedades de cocotero que contrastan en la acumulación de ácidos grasos y carbohidratos.



**Figura 3. Mecanismo molecular de la biosíntesis de ácidos grasos regulada por WRI1.** LEC1, LEC2 y FUS3 son reguladores que median la expresión de WRI1 positivamente, mientras MYB89 actúa como un regulador negativo. A nivel de proteína, WRI1 está regulado por modificaciones postraduccionales (como la fosforilación y la ubiquitinación) y reguladores que interactúan con WRI1. En respuesta a señales ambientales o de desarrollo, se forman complejos, que regulan positiva o negativamente la actividad transcripcional de WRI1, lo que conduce a la mediación de la expresión de sus genes diana. La interacción de WRI1 con las proteínas 14-3-3s o con MED15 conduce a una mayor estabilidad de la actividad transcripcional, lo que da como resultado una mayor acumulación de aceite. Los complejos formados entre WRI1 y TCP4, BPM o KIN10 reducen la actividad transcripcional o la estabilidad de la proteína, lo que da como resultado una menor acumulación de aceite. 14-3-3, proteínas 14-3-3; MED15, subunidad mediadora 15; BPM, proteínas BTB/POZMATH (BPM) adaptadoras de ligasa E3 y cinasa KIN10. Modificado de Kong *et al.* (2020 a,b).

## JUSTIFICACIÓN

Se ha descrito que el factor de transcripción WRINKLED1 (WRI1) tiene un papel clave en el control transcripcional de la biosíntesis de aceite vegetal. La acumulación de aceite en tejidos de diferentes especies, se relaciona, al menos en parte, a un cambio en la expresión de WRI1. Los estudios realizados en organismos modelo como *Arabidopsis thaliana* lo han definido como un “regulador maestro” ya que controla la transcripción de casi todas las enzimas clave que convierten a la sacarosa en precursores de la biosíntesis de triacilgliceroles (Cernac y Benning, 2004). Si bien la demanda de aceites vegetales para alimento y materia prima ha aumentado drásticamente en los últimos años, la ingeniería genética se ha enfocado en las vías del metabolismo de los lípidos o la sobreexpresión de genes involucrados en la regulación de las vías biosintéticas de los ácidos grasos o TAG en plantas oleaginosas, para mejorar el contenido de aceite de las semillas. Estudios en semillas oleaginosas de *Jatropha curcas* demostraron mayor contenido de lípidos en semillas debido a la sobreexpresión de WRI1; en tal estudio se identificó un homólogo de WRI1, y se demostró que la estrategia de su expresión se puede aplicar no solo para mejorar la acumulación de lípidos de la semilla sino para mejorar la calidad de los lípidos en el cultivo (Ye *et al.*, 2018). Otro estudio en *Camelina sativa* indicó que la expresión de WRI1 causó un incremento de la masa de semillas, así como en su contenido de aceite, dado que éste aumentó ~14% en las líneas transgénicas en comparación con las plantas silvestres (An y Suh, 2015). También se ha demostrado que ortólogos WRI1 en maíz (*Zea mays*), colza (*Brassica napus*), y la palma de aceite (*Elaeis guineensis*) están involucrados en la producción de TAG en embriones o mesocarpios de los frutos, y que, su sobreexpresión conduce a mayor contenido de aceite en las semillas (Yang *et al.*, 2015). En el caso de *C. nucifera*, no se sabe cuál es el comportamiento de WRI1 ni cómo influye la producción de TAGs. Es por ello que en este trabajo se analizaron los niveles de expresión de WRI1 en el embrión cigótico, empleando la metodología de qPCR. Mediante este análisis se determinó los cambios de expresión que se presentan entre los estadios de desarrollo inmaduro, intermedio y maduro en embriones cigóticos de dos variedades de cocotero.



## **HIPÓTESIS**

Si la expresión del factor de transcripción WRI1 se relaciona con la acumulación de los TAGs en las semillas y embriones cigóticos de cocotero, entonces su expresión disminuye conforme transcurren los estadios de desarrollo del embrión de inmaduro a maduro. La disminución en la expresión ocurre tanto en la variedad Enano verde como en la Alto del Pacífico.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la expresión del factor de transcripción WRI1 en embriones cigóticos de cocotero (*Cocos nucifera* L.) en diferentes estadios de dos variedades.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificar las regiones conservadas y variables que puedan estar involucradas con la función reguladora de WRI1.
- Diseñar oligonucleótidos específicos para la amplificación de WRI1 de *C. nucifera*.
- Determinar mediante qRT-PCR el nivel de expresión del factor de transcripción WRI1 en los embriones cigóticos de cocotero en estadios inmaduro, intermedio y maduro de las variedades Yucatán Enano verde y Alto del Pacífico mexicano.

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La Figura 4 muestra la estrategia experimental seguida en el presente trabajo.



**Figura 4. Estrategia experimental implementada para la evaluación de la expresión de WR11.** Se muestra desde la colecta del material vegetal hasta la evaluación por qPCR de la expresión del factor de transcripción WR11 en los diferentes estadios de maduración de embriones cigóticos de *C. nucifera*.



## CAPÍTULO II

### MATERIALES Y METODOS

#### 2.1. Obtención de Material biológico.

Semillas de *Cocos nucifera* L. de la Península de Yucatán, de las variedades Alto del Pacífico mexicano y Yucatán Enano verde, fueron colectadas en la plantación “Guadalupana” en San Crisanto Yuc. con coordenadas 21°21'08.8"N 89°10'19.0"W. Estas fueron clasificadas en tres estadios de maduración inmaduro (6-8 meses), intermedio (9-10 meses) y maduro (11-14 meses) (Perera *et al.* 2010). Una vez colectados e identificados, los frutos se etiquetaron y se transportaron a las instalaciones del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (CICY) y ahí se procesaron para la obtención del embrión.

#### 2.2. Procesamiento de las semillas de cocotero.

Las semillas recolectadas se sacaron del laboratorio y en la zona de procesamiento, se cortaron transversalmente con un machete estéril. Una vez expuesto el endospermo sólido, la sección correspondiente a la ubicación del embrión fue extraída con un sacabocados de aproximadamente de 2 cm de diámetro. Enseguida, el cilindro de tejido recuperado se colocó en hielo y fue transportado al laboratorio. En el laboratorio, los cilindros de tejido se cortaron con ayuda de pinzas y bisturí para eliminar el endospermo sólido que rodea al embrión. Se recuperaron los embriones, se colocaron en un tubo estéril de 1.5 mL, se introdujeron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta la extracción del ARN.

#### 2.3. Reactivos y materiales.

Los reactivos utilizados en este trabajo fueron de grado analítico y se adquirieron en casas comerciales especializadas (Invitrogen, Thermo Scientific, Sigma-Aldrich, etc). La

cristalería y el material de laboratorio se esterilizó en autoclave a 1.1 kg cm<sup>-2</sup> y 121°C por 15 min y posteriormente se calentaron en mufla con calor seco a 400 °C por 3 h.

#### **2.4. Análisis bioinformáticos**

A partir de las secuencias homólogas descargadas del NCBI y los softwares “MultAlin” (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) y PRALINE multiple sequence alignment (<https://www.ibi.vu.nl/programs/pralinewww/>), se realizaron alineamientos múltiples correspondientes a monocotiledóneas, dicotiledóneas y a la familia Arecaceae, esto con el fin de identificar regiones conservadas entre los grupos de estudio. Para obtener la composición de aminoácidos de la proteína en estudio, la secuencia de aminoácidos fue analizada en el software “ProtParam” (<https://web.expasy.org/protparam/>). Adicionalmente la secuencia de aminoácidos se sometió a análisis en el software “PROSITE” (<https://prosite.expasy.org/>) con la finalidad de identificar dominios y sitios funcionales, finalmente para la generación de imágenes de dominios se utilizó la herramienta “MyDomains” (<https://prosite.expasy.org/mydomains/>). El árbol filogenético se construyó utilizando el método Neighbor-Joining, con un bootstrap inferido de 1000 repeticiones. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA11.

#### **2.5. Diseño de oligonucleótidos.**

Utilizando la secuencia del factor de transcripción de WRI1 (Sun *et al.*, 2017) como sonda, se realizó una búsqueda de los genes de interés en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la familia Arecaceae que mostraron homología con WRI1 fueron descargadas del NCBI y se alinearon. Utilizando las secuencias de nucleótidos del cDNA de los genes de WRI1 (JQ040545.1) o actina (MH017421.1) y el software “Oligo Quest Tool” de IDT DNA Technologies (<https://www.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index>), se diseñaron los oligonucleótidos específicos para cada gen.

### **2.6. Extracción de ácido ribonucleico (ARN).**

El ARN total de los embriones cigóticos se extrajo con TRIzol™ (Invitrogen) siguiendo el protocolo del proveedor, con algunas modificaciones. Brevemente, en presencia de nitrógeno líquido se lisaron y homogenizaron 0.060 g correspondientes al peso fresco de la muestra de embrión cigótico de *C. nucifera*. Al homogenado se le adicionó 1 mL de TRIzol™, y se incubó por 5 min a temperatura ambiente; enseguida se agregó con 0.2 ml de cloroformo, y se incubó por 2 min en hielo. Las muestras se centrifugaron por 15 min a  $12,000 \times g$  a 4°C. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo, se le agregaron 0.5 mL de isopropanol y se homogenizó suavemente; los tubos se incubaron a -20°C por 10 min. Las muestras se centrifugaron por 10 minutos a  $12,000 \times g$  a 4°C y el precipitado se lavó con 1 mL de etanol al 75%; enseguida, la muestra se agitó y centrifugó a  $12000 \times g$  por 10 min. La pastilla se secó a temperatura ambiente durante 5–10 minutos.

### **2.7. Integridad y pureza del ARN.**

La pureza del ARN de cada una de las muestras se analizó con un espectrofotómetro (NanoDrop 2000) tomando 1 µl de muestra. Como blanco de calibración se utilizó 1 µl de H<sub>2</sub>O tratada con dietilpirocarbonato (DEPC). La absorbancia de las muestras fue registrada a 260/280 y 230/260 nm; las muestras cuya relación de absorbancias 260/280 estuvo más cercana a 2 fueron seleccionadas para continuar con los experimentos. El análisis de la integridad de los ARNs se realizó por electroforesis en geles desnaturalizantes de agarosa al 1.4% (agarosa-formaldehído-formamida). Las bandas de ARN en el gel se visualizaron y digitalizaron en el GelDoc (BioRad) mediante luz ultravioleta.

### **2.8. Tratamiento de ARN total con DNasa.**

Para eliminar el ADN contaminante en las muestras, el ARN total (ARNt) se trató con DNasa I (Invitrogen™), tal como indica el fabricante. Brevemente, en un tubo de 0.2 mL se adicionó 1 µg de ARNt, 1 µl de amortiguador 10X para DNasa, 1 µl de DNasa I (1 U / µl) y H<sub>2</sub>O tratada con DEPC hasta alcanzar un volumen final de 10 µl. Las mezclas fueron

homogenizadas, centrifugadas brevemente e incubadas a 37°C por 15 minutos a temperatura ambiente. La reacción de la DNasa I se detuvo adicionando 1 µl de EDTA 25 mM a la mezcla de reacción, y calentando las muestras a 65 °C por 10 min. Las muestra se centrifugaron brevemente y se almacenaron a -80 °C hasta su uso para la retrotranscripción.

### **2.9. PCR para verificar la eficiencia del tratamiento con DNasa**

Debido a la interferencia que puede ocasionar el ADN contaminante en las muestras de la retrotranscripción, fue necesario verificar que el tratamiento con DNasa I eliminó por completo el ADN genómico en las muestras de interés. Brevemente, en reacciones individuales de PCR, se colocaron alícuotas conteniendo cantidades equivalentes de los ARNs tratados con la DNasa I. Enseguida, por separado, los ARNs se adicionaron con las mezclas de reacción conteniendo 1 µl (10µM) de los oligonucleótidos específicos en sentido y en reverso, para la amplificación del gen de actina, 2.5 µl de amortiguador 10X para Taq polimerasa, 0.5 µl de dNTP's (10 mM), 0.75 µl de MgCl<sub>2</sub> (250 mM), 0.14 µl de Taq polimerasa (1U) y 18.6 µl de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas. Como control negativo se utilizó agua, como control positivo se utilizó ADN genómico. La reacción de PCR de punto final comprendió los siguientes ciclos: desnaturalización a 95 °C por 1 min, alineación a 59°C por 1 min y amplificación a 72°C por 1 min, estos 3 pasos se repitieron por 35 ciclos; además, la PCR incluyó un paso de desnaturalización inicial a 95°C por 5 min y un paso de extensión final a 72 °C por 10 min. La presencia/ausencia de amplicones de actina en las reacciones de PCR se verificó cuando los productos de la PCR fueron sometidos a electroforesis en geles de 1% de agarosa y los geles se visualizaron mediante luz UV.

### **3.0. Síntesis de ADNc.**

El ADNc se sintetizó por medio de la transcriptasa reversa (RT Superscript III, Invitrogen™), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, en tubos de 0.5 ml se mezcló 1 µl de ARNt tratado con DNasa I, 1 µl de oligodT 2.5µM, 1 µl dNTPs 10 mM y H<sub>2</sub>O tratada con DEPC hasta alcanzar un volumen final de 10 µl. Las mezclas se homogenizaron y los tubos

se incubaron a 65°C por 5 min, se colocaron en hielo por 5 min. Enseguida, a los tubos se les añadió 2 µl de amortiguador 10x para RT, 4 µl de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 2 µl de DTT (0.1 M), 1 µl de RNaseOUT™ (40 U/µl), 1 µl de SuperScript® III RT (200 U/µl). Las mezclas se homogenizaron suavemente, se centrifugaron y se incubaron a 50°C por 30 min. La reacción de síntesis de ADNc se detuvo incubando las mezclas a 85°C por 5 min; los tubos se colocaron en hielo por 5 min y se centrifugaron brevemente. Los ADNc recién sintetizados se almacenaron a -20°C hasta su uso en las reacciones de PCR.

### **3.1. PCR para verificar síntesis de ADNc**

Con el objetivo de comprobar la síntesis de ADNc, se realizó una reacción de PCR con oligonucleótidos específicos de actina (gen control). Brevemente, para la reacción se tomaron alícuotas con cantidades equivalentes (100 ng) de cada uno de los ADNc sintetizados previamente. Las mezclas de reacción, así como las condiciones de la PCR se realizaron como se describe en el apartado de la verificación el tratamiento del ARN utilizando DNasa I.

### **3.2. Secuenciación de los productos de PCR**

Para comprobar que se amplificó un fragmento de WRI1, el producto obtenido por PCR con los oligonucleótidos específicos para *CnWRI1*: (CoWRI1q-F TGTATATCCTCCTCTCGATGTCC y CoWRI1q-R CACTCTCATCGCCTCCAAAG), el producto de 125 pb fue escindido del gel y se secuenció por medio del método de didesoxinucleótidos marcados, en el secuenciador 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) en el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C. (IPICYT).

### **3.3. PCR en tiempo real.**

El análisis de expresión en cada muestra de interés, se realizó con el equipo de PCR en tiempo real StepOnePlus™ (Applied Biosystems). Brevemente, se tomaron alícuotas



conteniendo 100 ng de cada uno de los ADNc almacenados a -20°C, enseguida se adicionaron a la mezcla de reacción conteniendo los oligonucleótidos específicos en sentido y en reverso, SYBR® Green PCR Master Mix y H<sub>2</sub>O libre de nucleasas hasta un volumen final de 10 ul. La temperatura de alineamiento dependió de la T<sub>m</sub> de cada par de oligonucleótidos. Para comparar los niveles de expresión, la actina se utilizó como gen de control interno (de la Cruz *et al.*, 2011) y como control negativo se utilizó agua.

#### **3.4. Determinación de niveles de expresión relativa.**

Los niveles de expresión relativa se analizaron mediante el método 2- $\Delta\Delta$ Ct descrito por Pfaffl (2001). Este método es un modelo matemático que calcula los cambios de expresión génica como un cambio relativo entre el gen de interés y un calibrador (Livak y Schmittgen, 2001). Se calculó la expresión relativa para cada replica biológica y luego se utilizó el promedio de los valores de expresión para graficar los resultados de acuerdo a los estadios de maduración y a las variedades Alto del Pacífico mexicano o Yucatán Enano verde.

## CAPÍTULO III

### RESULTADOS

#### 3.3. Alineamiento de las secuencias de los CDS de WRI1 de especies monocotiledóneas

El alineamiento de las secuencias completas de los cds del factor de transcripción WRI1, mostró que las secuencias variaron en longitud entre 1014 y 1734 pb. En el alineamiento se observaron regiones conservadas (rojo), regiones medianamente conservadas (azul) y regiones poco conservadas (negro). La región con mayor homología se encuentra en la parte central de las secuencias (260-780pb), mientras el extremo carboxilo se encuentra medianamente conservado (Figura 5).

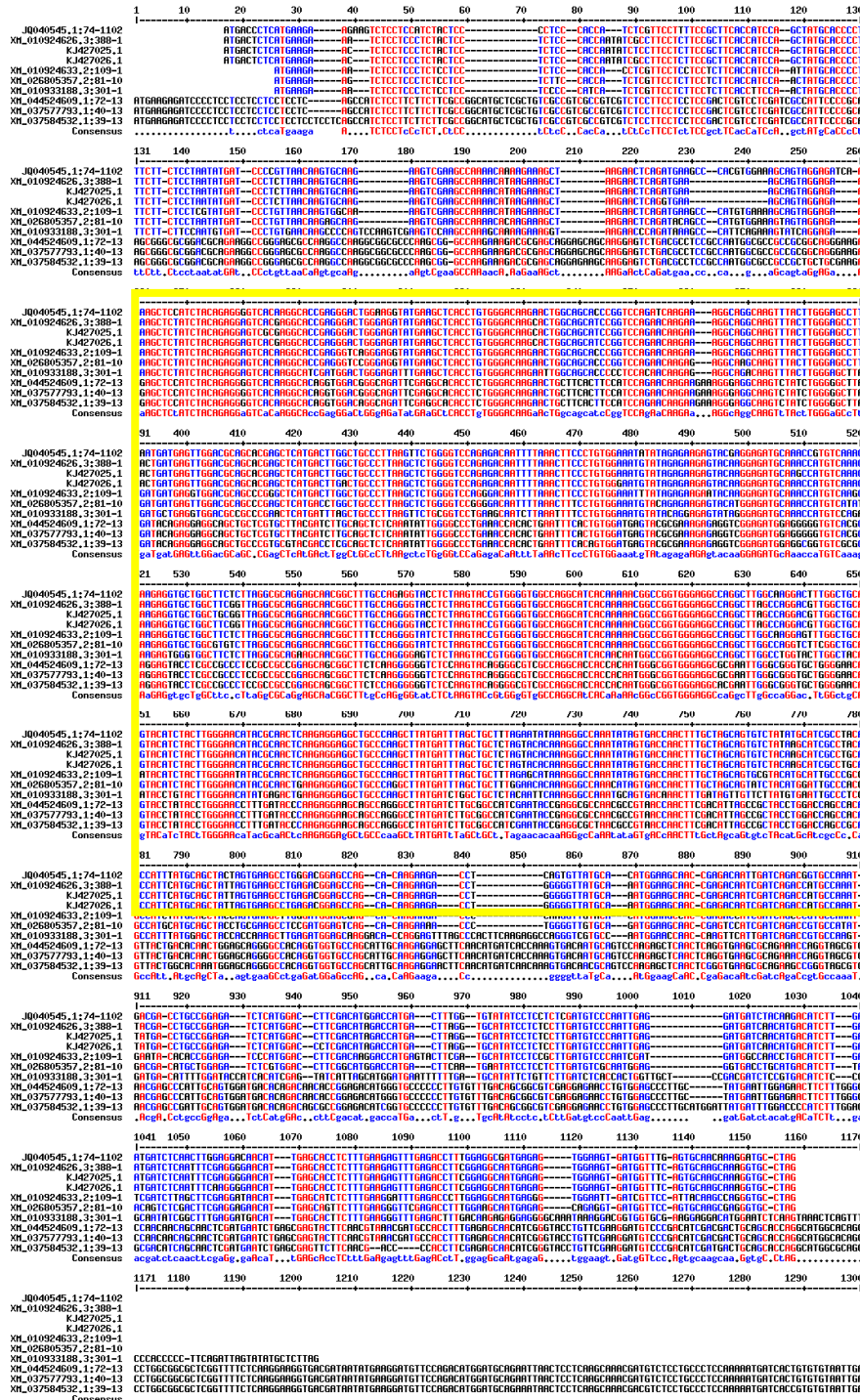
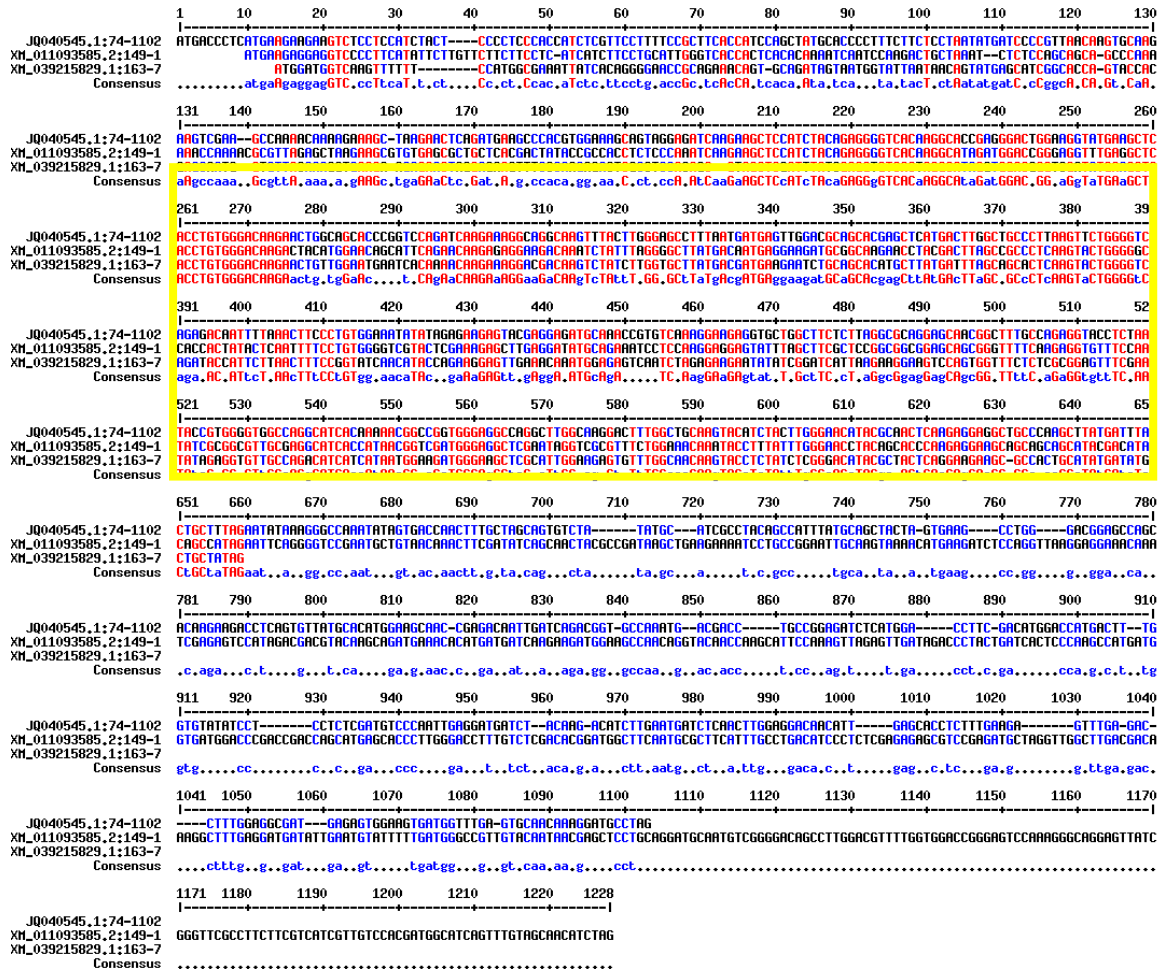


Figura 5. Alineamiento de secuencias de nucleótidos de WR1, de especies monocotiledóneas. Rojo, regiones con alta conservación. Azul, regiones medianamente conservadas. Negro, regiones no conservadas. El cuadro amarillo encierra la región central con mayor conservación, a la izquierda de cada secuencia se muestra el número de accesión para cada una.

### 3.4. Alineamiento de las secuencias de los CDS de WR11 de especies dicotiledóneas

El alineamiento de las secuencias completas de los cds de WR11 de dicotiledóneas mostró que la longitud de las mismas varió entre 1561 y 1238 pb. En el alineamiento se observaron regiones conservadas (rojo), regiones medianamente conservadas (azul) y regiones no conservadas (negro). La región con mayor homología se encuentra en la parte central de las secuencias (260-780 pb), mientras el extremo amino se encuentra medianamente conservado (Figura 6).



**Figura 6. Alineamiento de secuencias de nucleótidos de ADNc de WR11 de especies dicotiledóneas.** El cuadro amarillo representa la región central con mayor conservación (260-780 pb). Rojo, regiones con alta conservación. Azul, regiones medianamente conservadas. Negro, regiones no conservadas, a la izquierda de cada secuencia se muestra el número de accesión para cada una de las secuencias

### **3.5. Alineamiento de secuencias de los CDS de WRI1 de integrantes de la familia Arecaceae**

El alineamiento de las secuencias de WRI1 de Arecaceas mostró que su longitud fue variable con tamaños de 1014 a 1734 pb. En el alineamiento se observaron regiones conservadas (rojo), regiones medianamente conservadas (azul) y regiones no conservadas (negro). Las secuencias muestran una alta conservación en la mayoría de su longitud, mientras el extremo carboxilo se encuentra medianamente conservado (Figura 7).

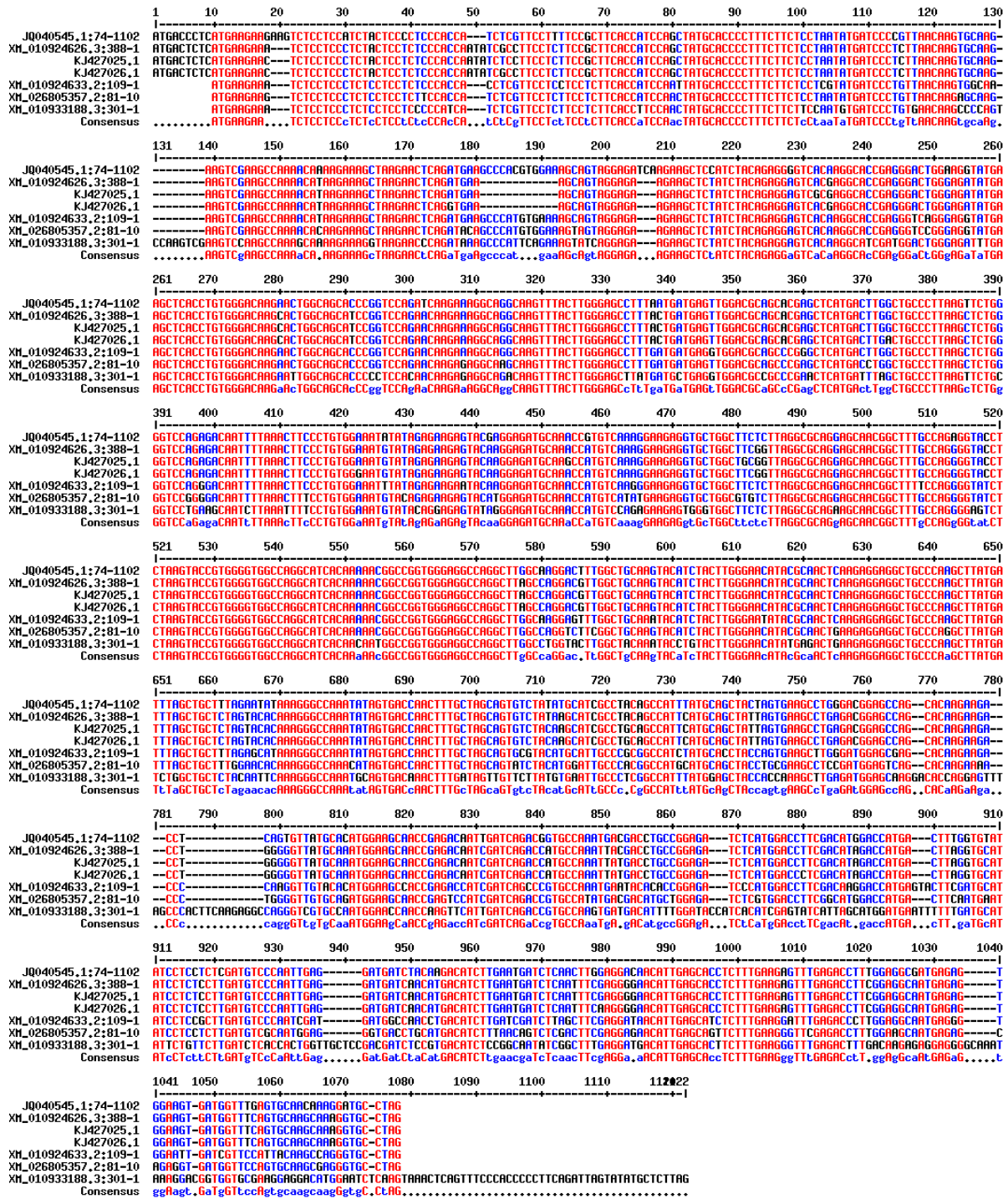
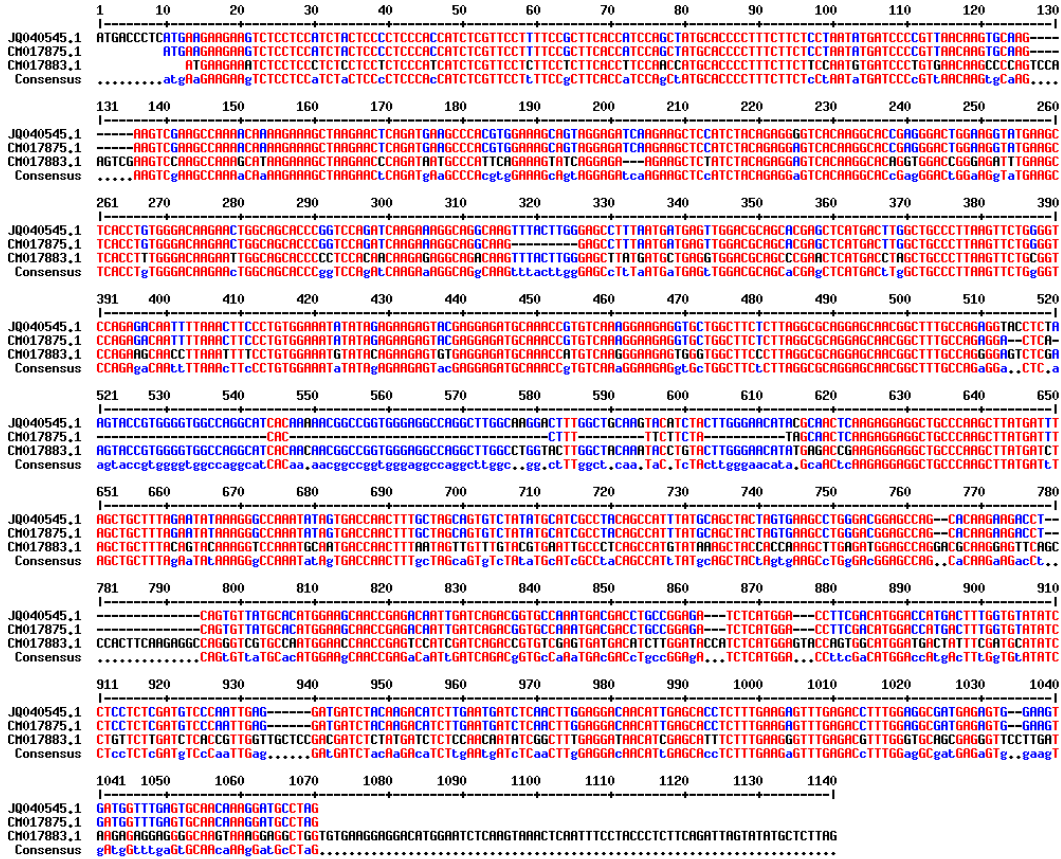


Figura 7. Alineamiento de secuencias de nucleótidos de WR1, de integrantes de la familia **Areaceae**. A la izquierda de cada secuencia se muestra el número de accesión para cada una, el cuadro negro representa el extremo carboxilo medianamente conservado. Rojo, regiones ampliamente conservadas. Azul, regiones medianamente conservadas. Negro, regiones no conservadas.

**Alineamiento de secuencias de los CDS de WRI1 de *C. nucifera*.**

El alineamiento de las secuencias completas de los cds de WRI1 de *C. nucifera* (Figura 8). mostró que la longitud en pb de las mismas es variable. En el alineamiento se observaron regiones conservadas (rojo), regiones medianamente conservadas (azul) y regiones no conservadas (negro).



**Figura 8. Alineamiento de secuencias de nucleótidos de WRI1 de *C. nucifera*.** A la izquierda de cada secuencia se muestra el número de accesión para cada una, los colores indican el nivel de conservación.

### **3.6. Alineamiento de las secuencias completas de aminoácidos del factor de transcripción WRI1 de especies monocotiledóneas y dicotiledóneas**

El alineamiento de las secuencias de proteínas WRI1 provenientes de especies monocotiledóneas y dicotiledóneas mostró que las secuencias fueron variables en longitud, pues comprendían de 241 a 450 aminoácidos (aa). En el alineamiento se observaron regiones conservadas (rojo), regiones medianamente conservadas (azul) y regiones no conservadas (negro). Las secuencias muestran una mediana conservación en la parte central, mientras los extremos amino y carboxilo tienen baja conservación. Alrededor de la posición 180 se encuentra un motivo "VYL" medianamente conservado en las secuencias analizadas (Figura 9).



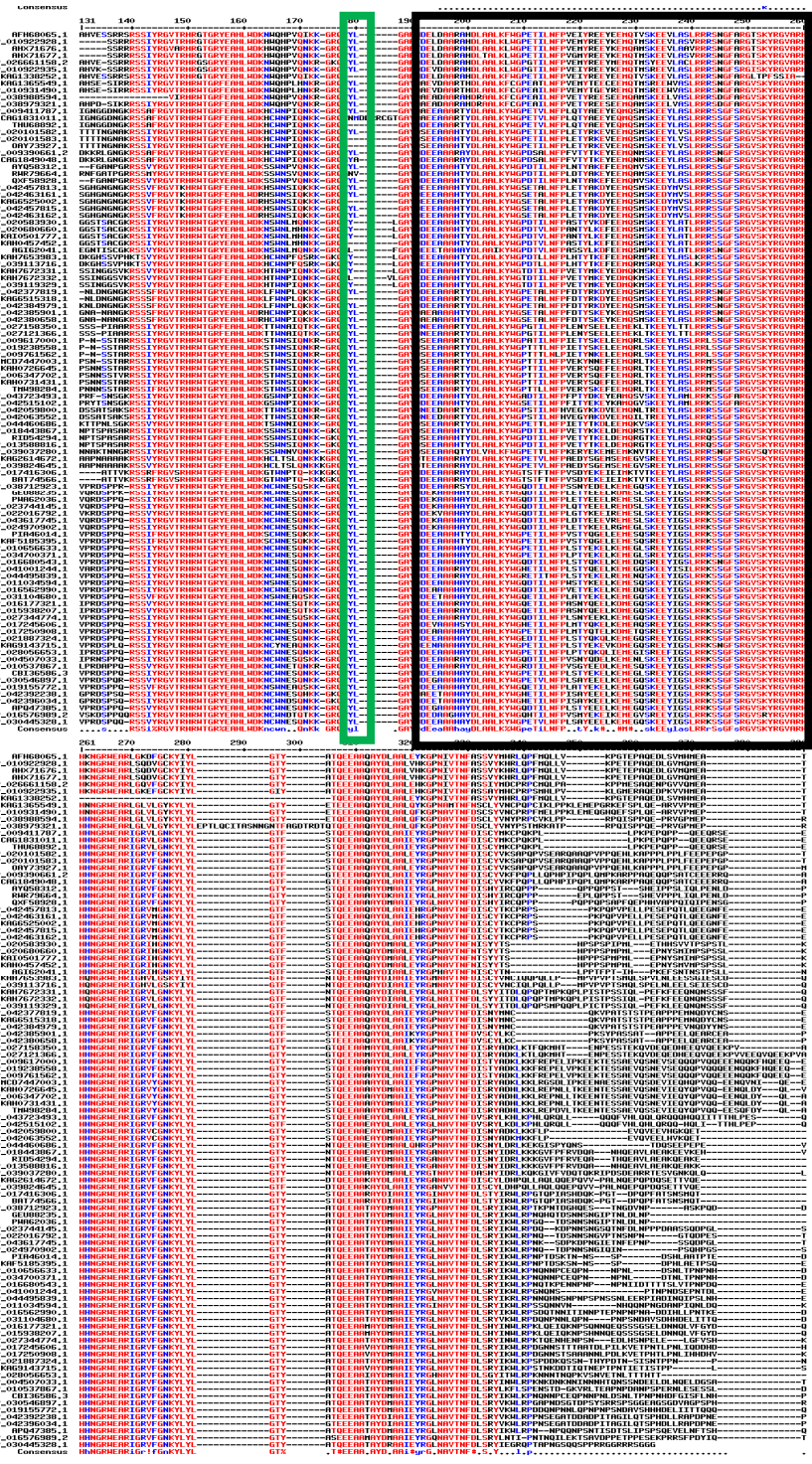


Figura 9. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de WR1 de especies monocotiledóneas y dicotiledóneas. Se exhibe una porción del alineamiento de las secuencias; a la izquierda de cada secuencia se muestra el número de accesión para cada una, en verde se observa el motivo VYL, el cuadro negro representa una región con conservación media-alta. Rojo, regiones con alta conservación. Azul, regiones medianamente conservadas. Negro, regiones no conservadas.

### **3.7. Alineamiento de las secuencias completas de aminoácidos del factor de transcripción WRI1 de los integrantes de la familia Arecaceae.**

Las secuencias de aminoácidos de WRI1 de los integrantes de la familia Arecaceae fueron variables en longitud, pues mostraron de 309 a 374 aminoácidos. En el alineamiento se observaron regiones conservadas (rojo), regiones medianamente conservadas (verde-naranja) y regiones no conservadas (azul). Las secuencias muestran una alta conservación en la parte central, mientras el extremo carboxilo no se encuentra conservado. Alrededor de la posición 110 (cuadro amarillo) se encuentra un motivo compuesto por 3 aminoácidos; valina, tirosina y leucina (VYL) altamente conservado (todas las secuencias lo poseen). Además, se identificaron sitios de fosforilación (cuadros verdes). Adicionalmente se observan las regiones donde están situados los dominios de unión a ADN (AP2) (Figura 10).

Unconserved 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 Conserved

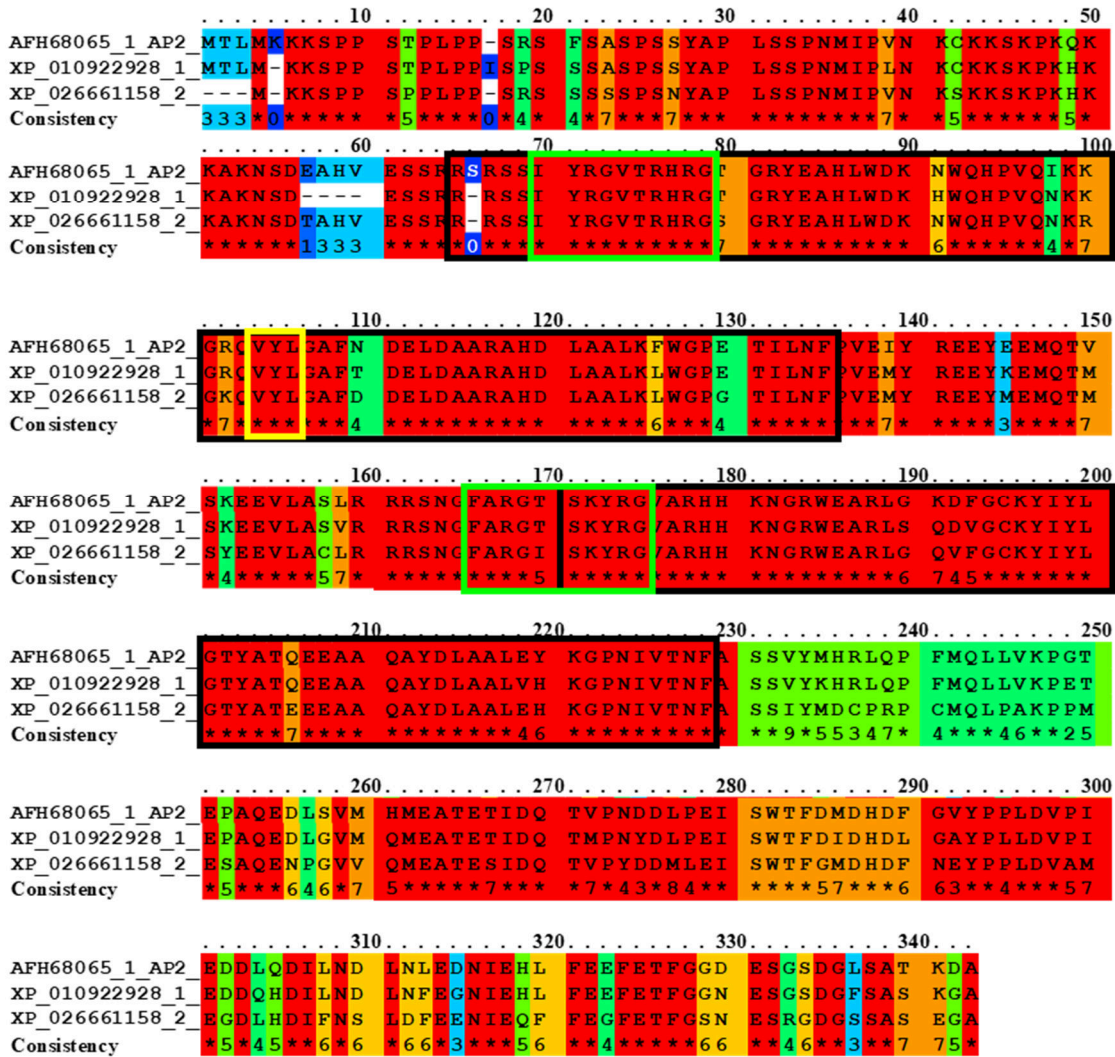


Figura 10. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de integrantes de la familia *Areaceae*. El alineamiento fue realizado con el software PRALINE. Los colores indican el nivel de conservación. En negro-Dominios de unión a ADN (AP2), en amarillo-motivo conservado (VYL), en verde-regiones de fosforilación.

### 3.8. Composición de aminoácidos de WRI1 de *Cocos nucifera* L.

Para determinar la composición de la secuencia primaria de aminoácidos de WRI1 la secuencia fue analizada por la herramienta ProtParam, (Tabla 3). El análisis mostró que los aminoácidos en mayor proporción son Serina y ácido Glutámico con 8.2%, seguidos por Leucina (7.9%) y Alanina (7.6%), mientras que, el aminoácido en menor proporción fue Cisteína (0.6%).

**Tabla 3. Composición de aminoácidos de WRI1 de *Cocos nucifera* L.**

<b>Aminoácidos</b>	<b>Composicion (%)</b>
<b>Ala (A) 26</b>	<b>7.6%</b>
<b>Arg (R) 20</b>	5.8%
<b>Asn (N) 14</b>	4.1%
<b>Asp (D) 23</b>	6.7%
<b>Cys (C) 2</b>	0.6%
<b>Gln (Q) 12</b>	3.5%
<b>Glu (E) 28</b>	8.2%
<b>Gly (G) 20</b>	5.8%
<b>His (H) 11</b>	3.2%
<b>Ile (I) 12</b>	3.5%
<b>Leu (L) 27</b>	7.9%
<b>Lys (K) 23</b>	6.7%
<b>Met (M) 9</b>	2.6%
<b>Phe (F) 13</b>	3.8%
<b>Pro (P) 22</b>	6.4%
<b>Ser (S) 28</b>	8.2%
<b>Thr (T) 17</b>	5.0%
<b>Trp (W) 5</b>	1.5%
<b>Tyr (Y) 14</b>	4.1%
<b>Val (V) 16</b>	4.7%

### 3.9. Características estructurales de *CnWRI1* y *AtWRI1*

*CnWRI1* tiene dos dominios AP2 conservados, que están ubicados entre los aminoácidos 69 y 135 y entre los aminoácidos 171 y 229. El motivo "VYL" codificado por 9 pb se encuentra entre los aminoácidos 103 y 195, la estructura de *A. thaliana* (Figura 11) mostró dos dominios de unión a ADN AP2 entre los aminoácidos 63 y 131 y entre los aminoácidos 167 y 225. El alineamiento de secuencias mostró que la similitud de la secuencia de proteína *AtWRI1* y *CnWRI1* es media-alta. Las regiones de los dos dominios conservados AP2 entre la proteína *CnWRI1* y *AtWRI1* comparten una similitud especialmente alta (Figura 12).

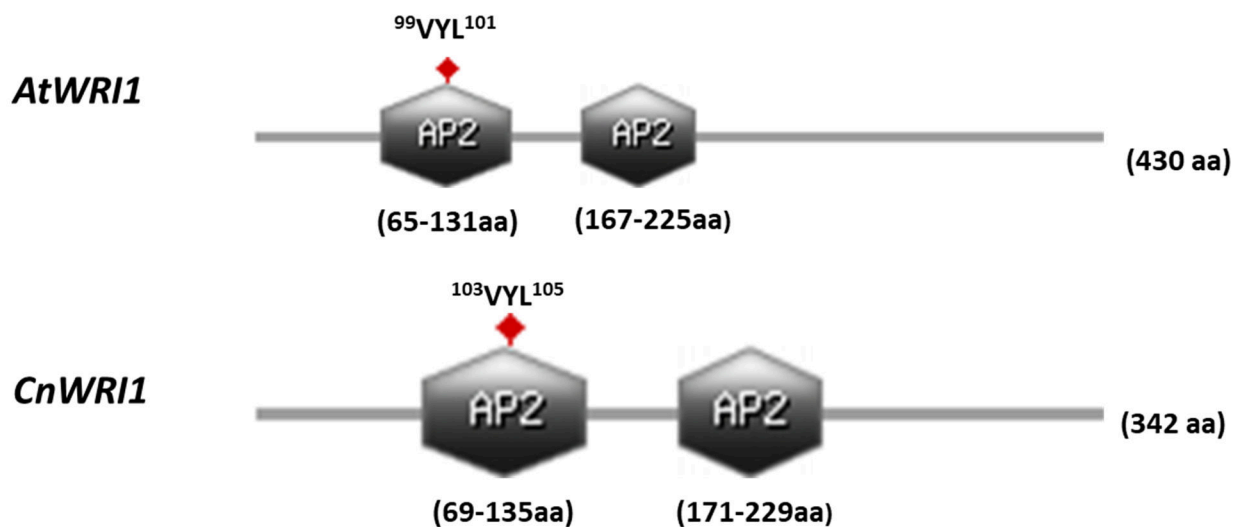


Figura 11. Características estructurales de *CnWRI1* (AFH68065.1) y *AtWRI1* (NP\_001030857.1). *Cn*-*Cocos nucifera*, *At*-*Arabidopsis thaliana*

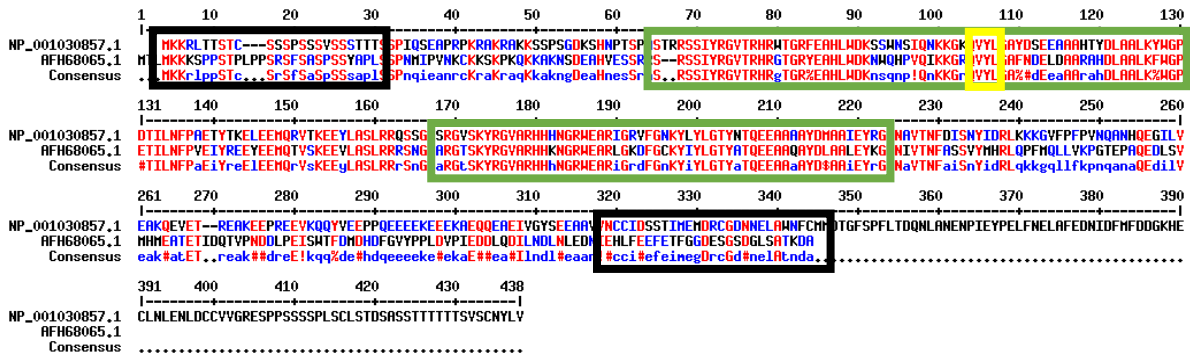


Figura 12. Alineamiento de secuencias de aminoácidos correspondientes al factor de transcripción WRI1 de *A. thaliana* (NP\_001030857.1) y *C. nucifera*. (AFH68065.1). Rojo, regiones con alta conservación. Azul, regiones medianamente conservadas. Negro, regiones no conservadas. Los cuadros verdes representan los dominios de unión al ADN y los cuadros negros representan las regiones C-terminal y N-terminal.

### 3.10. Características estructurales de *CnWRI1*, *EgWRI1* y *PdWRI1*.

El análisis de secuencias de *CnWRI1* pertenecientes a los integrantes de la familia Arecaceae (AFH68065.1), *E. guineensis* *EgWRI1* (XP\_010922928.1) y *Phoenix dactylifera* *PdWRI1* (XP\_026661158.2), mostró la presencia de los dos dominios de unión a ADN, entre los aminoácidos 69-135, 171-229, 64-130, 166-224 y 64-130, 166-224 respectivamente (Figura 13). Las secuencias de *WRI1* fueron variables en longitud (337-342aa); se identificó el motivo funcional (VYL) presente en todas las secuencias *WRI1*.

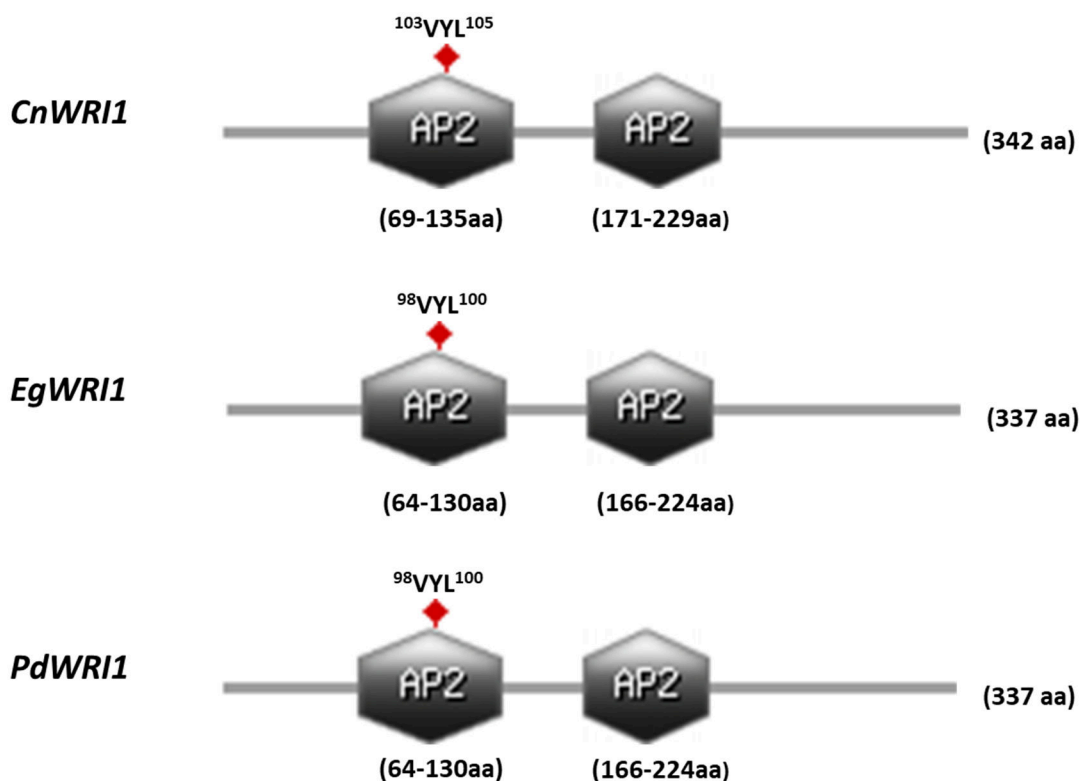
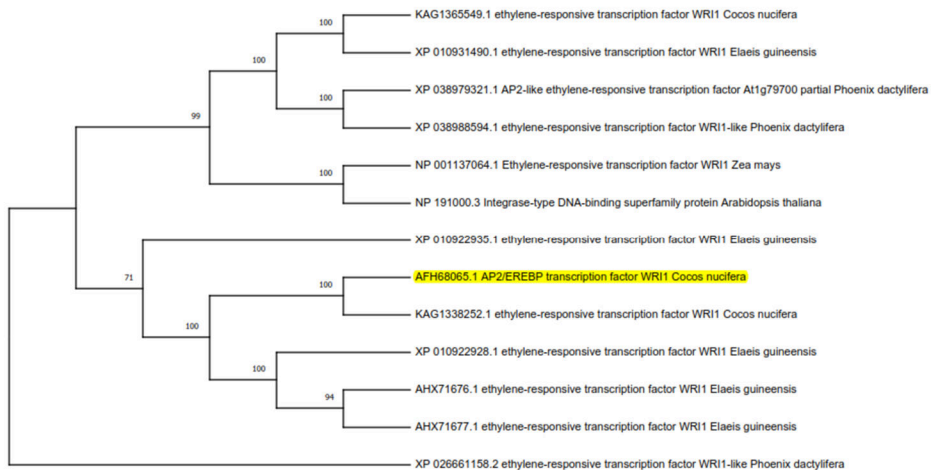


Figura 13. Características estructurales de *CnWRI1* (AFH68065.1), *EgWRI1* (XP\_010922928.1) y *PdWRI1* (XP\_026661158.2). *Cn*-*Cocos nucifera*, *At*-*Arabidopsis thaliana*, *Pd*- *Phoenix dactylifera*.

### 3.11. Análisis filogenético

El árbol filogenético de las secuencias de aminoácidos de WRI1 de la familia Arecaceae muestra 2 grupos distinguibles (Figura 14). El primer grupo alberga secuencias de las 3 especies representativas de la familia (*C. nucifera*, *P. dactylifera* y *E. guineensis*), además de dos secuencias de WRI1 de *A. thaliana* y *Z. mays* (NP\_191000.3 y NP\_001137064.1), que se expresan en embrión, mientras el segundo grupo contiene solo a *C. nucifera* y *E. guineensis*. En amarillo se indica la secuencia analizada en este trabajo (AFH68065.1). También se muestra un “outgroup” que alberga una secuencia de *E. guineensis*. Las secuencias AFH68065.1 y KAG1338252.1 que corresponden a *C. nucifera* se albergan en un mismo nodo interno, lo que indica su cercanía filogenética, además de estar cercanamente emparentada con las secuencias que pertenecen a *E. guineensis*. Interesantemente la secuencia KAG1365549.1 de *C. nucifera* se localiza en la misma rama donde se albergan las secuencias de *A. thaliana* y *Z. mays*. Las secuencias de WRI1 en la familia Arecaceae se compone por 5 secuencias de *E. guineensis*, 3 secuencias de *C. nucifera* y 3 secuencias de *P. dactylifera*. Los clados que componen el árbol filogenético se encuentran respaldados con valores Bootstrap.



**Figura 14. Árbol filogenético de WRI1 de diferentes integrantes de la familia Arecaceae. En amarillo se muestra WRI1 de *C. nucifera*.**



3.12. Diseño de oligonucleótidos.

Utilizando el software “Oligo Quest Tool” de IDT DNA Technologies (<https://www.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index>), se diseñaron los oligonucleótidos específicos para cada gen tomando como molde las secuencias JQ040545.1 y MH017421.1 (Figura 15).

Parameter Set: General PCR (Primers only)  
 Sequence Name: qPCR WRI1  
 Amplicon Length: 125

		Start	Stop	Length	Tm	GC%
Forward	<b>IGTATATCCTCCTCTCGATGTCC (Sense)</b>	870	893	23	62	47.8
Reverse	<b>CACTCTCATGCCTCCAAG (AntiSense)</b>	975	995	20	62	55

Base Sequence

```

1 ATGACCCCTCATGAAGAAGAAGTCTCCTCCATCTACTCCCCTCCCACCATCTCGTTCCTTTCCGCTTCACCATCCAGCTATGCACCCCTTTCTTCTCCT
101 ATATGATCCCCGTTACCAAGTGCAGAAGTCGAAAGCCAAAACAAAAGAAAGCTAAGAACTCAGATGAAGCCACGTTGGAAGCAGTAGGAGATCAAGAA
201 CTCCATCTACAGAGGGTCAAGGCACCGAGGGACTGGAAGGTATGAAGTCACTGTGGGACAAGAAGTGGCAGCACCCGGTCCAGATCAAGAAAGG
301 AGGCAAGTTTACTTGGGAGCCTTAAATGATGAGTTGGACGCAGCAGACTCATGACTTGGCTGCCCTTAAGTCTGGGGTCCAGAGACAATTTAAAC
401 TCCCTGTGGAAATATATAGAGAAGTACGAGGAGATGCAAAACCGTGTCAAAAGGAAGGTGCTGGCTTCTCTAGGCCAGAGCAACGGCTTTGCCA
501 AGGTACCTCTAAGTACCGTGGGGTGGCCAGGCATCACAAAAACGGCGGTGGGAGGCCAGGCTTGGCAAGGACTTTGGCTGCAAGTACATCTACTTGGG
601 ACATACGCAACTCAAGAGGAGGCTGCCCAAGCTTATGATTTAGTGTCTTAGAATATAAAGGGCCAAATATAGTGACCAACTTTGCTAGCAGTGTCTAT
701 TGATCGCCTACAGCCATTTATGCACTACTAGTGAAGCCTGGGACGGAGCCAGCACAAGAAAGACCTCAGTGTATGCACATGGAAGCAACCGAGACAA
801 TGATCAGACGGTGCCAAATGACGACCTGCCGGAGATCTCATGACCTTCGACATGGACCATGACTTTGGIGTATATCCTCCTCTCGATGTCCCAATTGA
901 GATGATCTACAAGACATCTTGAATGATCTCAACTTGGAGSACAACATTGAGCACCTCTTTGAAGAGTTGAGACCTTGGAGGCGATGAGAGTGGAAGT
1001 ATGGTTTGTAGTGCACCAAGGATGCCTAG
    
```

---

Parameter Set: General PCR (Primers only)  
 Sequence Name: ANTIN  
 Amplicon Length: 125

		Start	Stop	Length	Tm	GC%
Forward	<b>TGGTATCCACGAGACCCT (Sense)</b>	822	842	20	64	55
Reverse	<b>TCATACGGTCACCAATGCC (AntiSense)</b>	927	947	20	64	55

Base Sequence

```

1 ATGGCTGATGCTGAGGACATTCAACCCCTTGTCTGTGACAAATGGAACAGGGATGGTGAAGGCTGGATTTGCTGGAGATGATGCTCCCAGAGCTGTGTTC
101 CAAGCATTGTTGGTTCGGCCCCGCCACTGGTGTGATGTTGGATGGGACAGAAAGATGCATATGTTGGTATGAGGCCCAATCCAAGAGAGGTATTC
201 GACATTGAAATACCTTATTGACATGGAATTGTAGTAATTGGGATGATATGGAGAAGATCTGGCATCATACCTTCTACAATGAGTCCGTGTAGCACCC
301 GAAGAACATCCAATTCTTCTCACGGAAGCCCTCTGAACCCCAAGGCCAACAGGAAAAAGATGACACAAATAATGTTGAGACATTTGATGTCCTGCC
401 TGTATGTTGCTATTGAGGCTGTCTTTCCCTTTATGCTAGTGGACGTACCACAGTATTGTGCTGGACTCTGGTATGGTGTGAGCCACAGGTTCCGA
501 CTATGAAGGCTATGCACTTCCACATGCTATCCTTCGGCTTGACCTTGTGCTGAGATGCTGACGGATGCCCTCATGAAGATTTTACTGAGAGGGGATA
601 TCCTTCACTACCACAGCCGAACTGAAATTGTTCCGGACATCAAAGAGAAGCTTGCATATGTGGCCCTTGATTATGAGCAAGAGCTCGAGACTGCCAAG
701 GCAGCTCAGCAGTTGAGAAAAGCTATGAGCTACCTGATGGCCAGGTCATCACCATTGGGGCTGAGCGCTCAGTGCCCTGAGTGTCTTCCAGCCAT
801 GCTCATTGGTATGGAATCCCTTGGTATCCACGAGACCCTACAATTCTATCATGAAGTGGGATGTTGATATCAGGAAAGATTTGATGGGAACATTGT
901 CTTAGTGGAGGATCCACATGTTCCCGGGATTGGTACCGTATGAGCAAAGAGATCACTGCACTTGCCTTAGCAGCATGAAGATCAAGGTGGTGCCA
1001 CGCCTGAGAGGAGTATAGTGTGGATTGGAGGATCCATCTGGCTTCTTAAGCACATCCACACAGATGTGGATAACAAAGGCGGAATATGACGAAT
1101 TGGTCCGGCCATCGTTCACAGGAAGTGCCTTTAG
    
```

Figura 15. Diseño de oligonucleótidos específicos de WRI1 y Actina. En sentido (verde), en reverso (rojo).

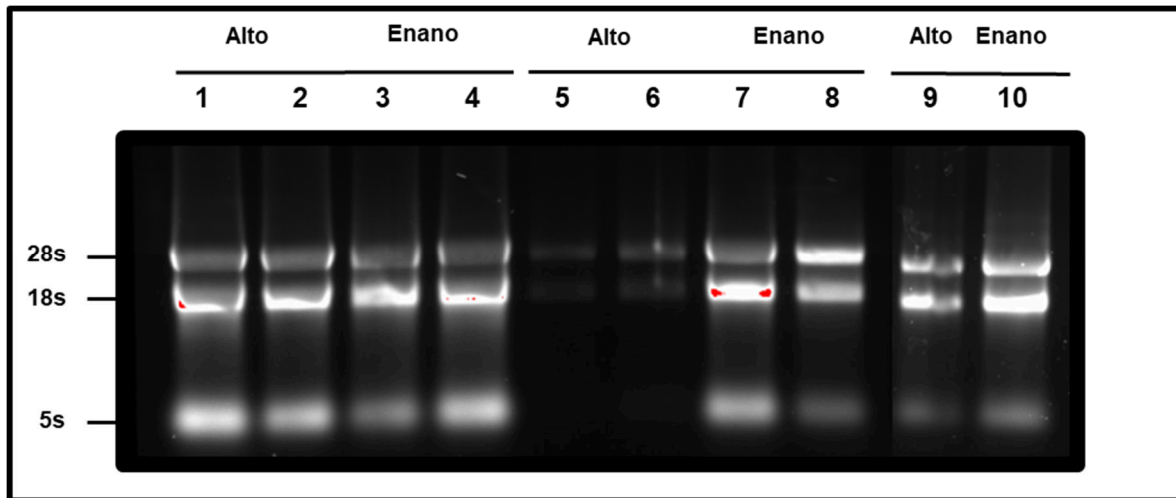
La secuencia de oligonucleótidos diseñados en sentido y en reverso para la amplificación específica de los genes WRI1 y actina de *C. nucifera*. se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4. Secuencia de los oligonucleótidos específicos y tamaño esperado para los amplicones de los genes WRI1 y actina de *C. nucifera*.** (F) en sentido, (R) en reverso. Rojo. - tiempo real, Negro- punto final

Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño del amplicón
CoWRI1qF	TGTATATCCTCCTCTCGATGTCC	125pb
CoWRI1qR	CACTCTCATCGCCTCCAAAG	
CoWRI1pfF	AAGAGTACGAGGAGATGCAAAC	563pb
CoWRI1pfR	GCCTCCAAAGGTCTCAAAC	
ActinqF	TGGTATCCACGAGACCACCT	125pb
ActinqR	TCATACGGTCACCAATGCCC	
ActinpfF	CACACGGTTCCGATCTATGAA	551pb
ActinpfR	GATCCTCCAATCCAGACACTATAC	

### 3.13 Extracción de ácido ribonucleico (ARN).

La extracción de ARN total se realizó a partir de embriones cigóticos en diferentes estadios de madurez, de dos variedades de cocotero. En la Figura 16 se muestra la integridad de los ARNs. Se observan las bandas correspondientes a los ARNs ribosomales 28S y 18S. Dichos resultados muestran que los ARNs son de calidad aceptable para continuar con los experimentos.

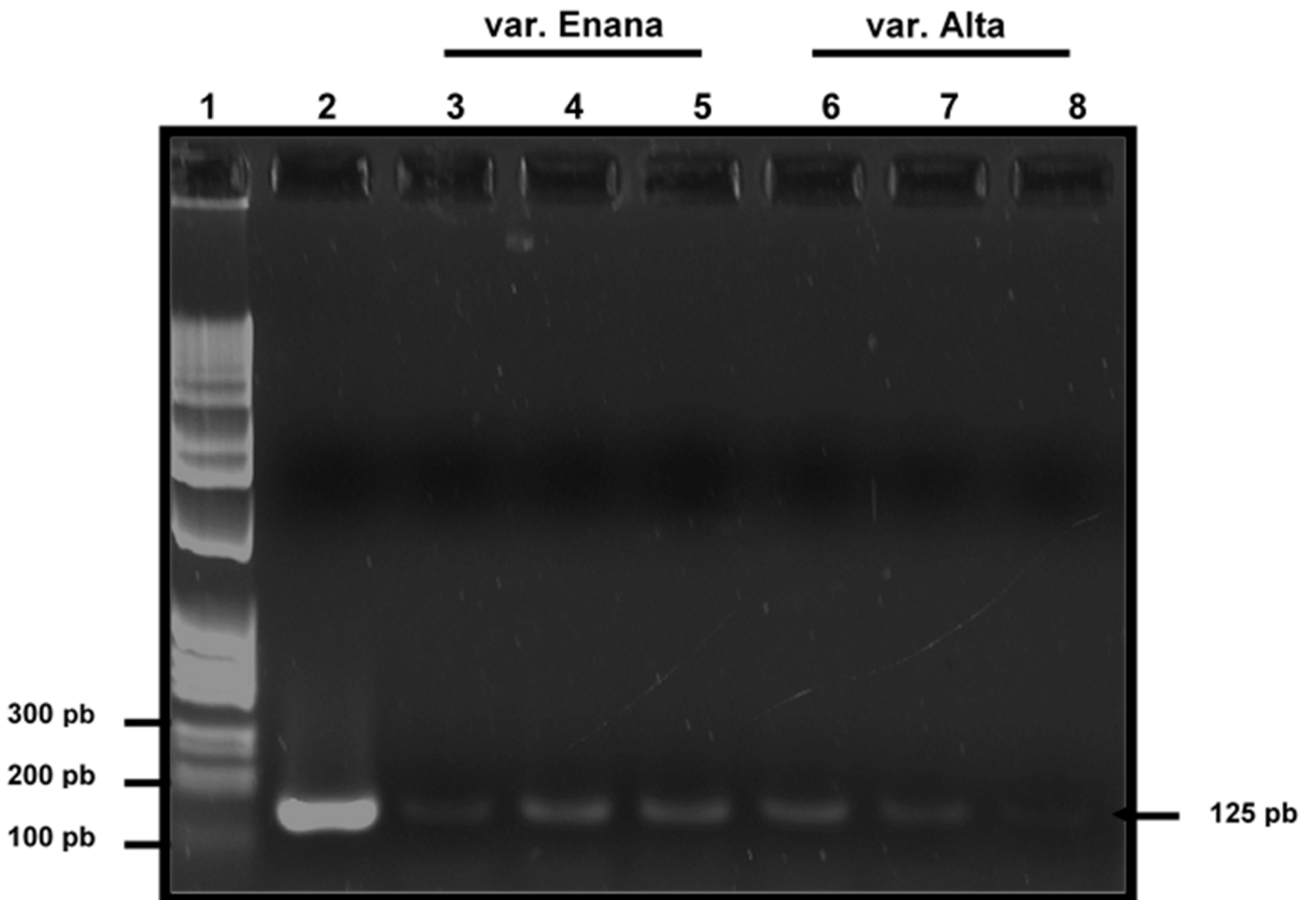


**Figura 16. Perfil electroforético de ARN de embriones cigóticos.** Estadios inmaduro (carriles 9 y 10), intermedio (5,6,7 y 8) y maduro (1,2,3 y 4) de la variedad Enano verde o Alto del Pacífico respectivamente, siguiendo el protocolo TRIzol modificado. Gel de agarosa al 1% teñido con BrEt.

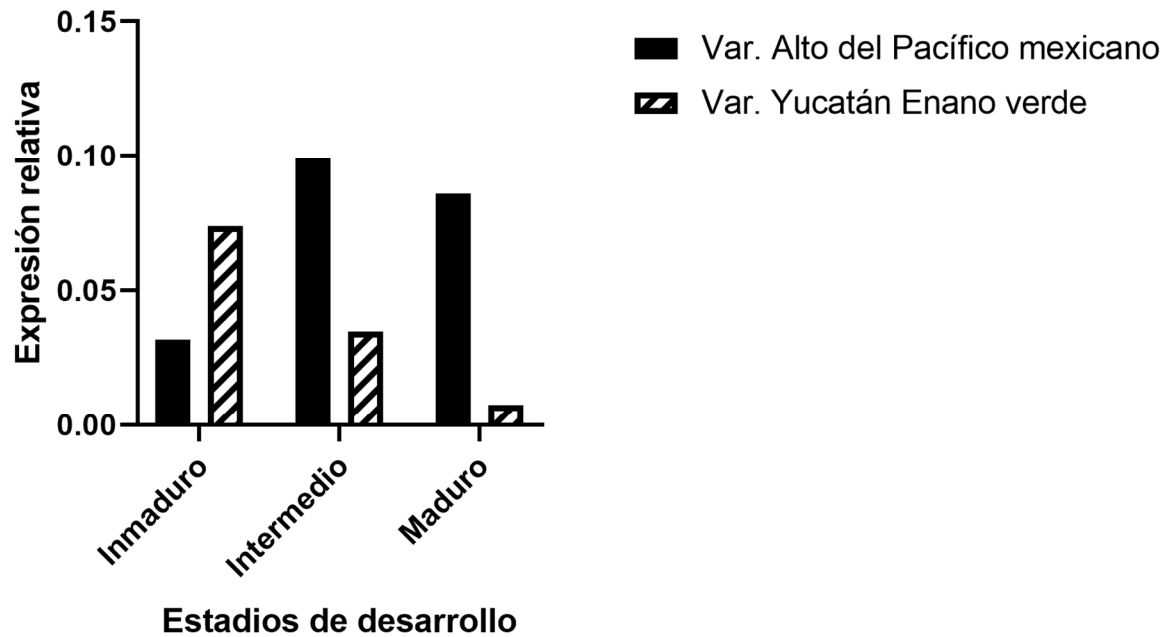
### 3.14 Amplificación de los transcritos de *CnWRI1* por PCR punto final.

El análisis en geles de 1% de agarosa del patrón de expresión de *WRI1* de *C. nucifera* en embriones cigóticos, mostró un amplicón de 125 pb en todos los estadios de madurez (Figura 17). Interesantemente, *CnWRI1* alcanza su mayor expresión en la variedad enana en el estadio intermedio y disminuye en el estadio maduro (Figura 17), tal comportamiento también se reflejó en el patrón de expresión relativa de dicho gen (Figura 18).

En el caso de la variedad Alto del Pacífico mexicano, en los geles de agarosa se observó mayor expresión de *CnWRI1* en el estadio inmaduro y disminuyó conforme aumentó el estadio de desarrollo (Figura 17). Este comportamiento se confirmó al realizar la cuantificación relativa de la expresión de *CnWRI1* (Figura 18). La amplificación de la actina como gen de referencia, a partir de la mezcla de los ADNc de los diferentes estadios de madurez, produjo el amplicón esperado de 125 pb (Figura 17) cuya intensidad aparente, disminuyó conforme aumenta la madurez del embrión. Es de resaltar que, la comparación de la expresión relativa de *WRI1* con respecto a la actina como gen de referencia mantuvo valores de 1.



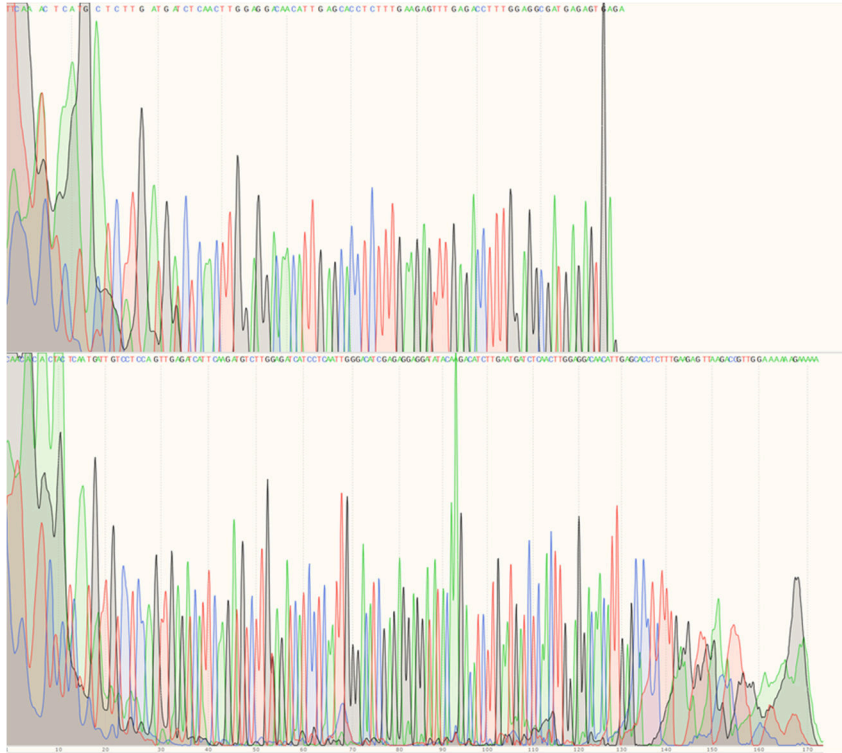
**Figura 17. Análisis por electroforesis en geles de 1% de agarosa de los transcritos del gen WRI1 de los embriones cigóticos de *C. nucifera*.** (1) marcador de tamaño de DNA, (2) mezcla de ADNc de los estadios analizados, estadios de desarrollo (3) inmaduro, (4) intermedio y (5) maduro de la variedad Yucatán Enano verde o (6) inmaduro, (7) intermedio y (8) maduro de la Alto del Pacífico mexicano. A la izquierda de la Figura se muestran los valores en pb de los marcadores de tamaño para el ADN. La flecha indica la posición del amplicón esperado.



**Figura 18.** Análisis de la expresión relativa por PCR punto final del gen WRI1 de *C. nucifera* en embriones cigóticos de cocotero en tres estadios de desarrollo de las variedades Yucatán Enano verde o Alto del Pacífico mexicano. En el eje de las X se observan los diferentes estadios de madurez de los embriones cigóticos y las variedades, en el eje de las Y se presenta la escala de expresión relativa con respecto al gen de actina como gen calibrador o de comparación interna.

### 3.15. Secuenciación de los productos de PCR

La Figura 19 muestra los electroferogramas en sentido y en reverso obtenidos de la secuenciación del amplicón de 125 pb.



**Figura 19. Electroferogramas de didesoxinucleótidos producidos de la secuenciación del amplicón de 125 pb.** En verde Adenina, en rojo, Timina, en azul Citosina y en negro Guanina.

La búsqueda mediante la herramienta Blast en la plataforma del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, de sus siglas en inglés) mostró 98.72% de identidad con la secuencia de WRI1 (JQ040545.1) de coco depositada en dicha base de datos.

### **3.16. Análisis de la expresión génica del factor de transcripción WRI1 en el embrión cigótico de la variedad Alta del Pacífico mexicano**

El análisis de PCR en tiempo real (qPCR), del patrón de expresión del factor de transcripción WRI1, en embriones cigóticos de *C. nucifera* en diferentes estadios de desarrollo de la variedad Alta del Pacífico mexicano, mostró que WRI1 se expresó en todos los estadios de desarrollo (Figura 20). Interesantemente, en el estadio inmaduro WRI1 se sub-expresa pero alcanza su mayor expresión en el estadio intermedio, mientras que en el estadio maduro su expresión disminuye con respecto al resto de los estadios analizados (Figura 20). Es de resaltar que, en los diferentes estadios, en el análisis de expresión relativa, el gen de referencia (actina) mantuvo un valor de 1, es decir, su expresión fue constante en los diferentes estadios de maduración. En comparación con dicho nivel de expresión, el factor de transcripción WRI1 solo se sobre-expresó en el estadio intermedio, dado que en las otras etapas sus valores de expresión relativa fueron menores a 1.

### **3.17. Análisis de la expresión génica del factor de transcripción WRI1 en embriones cigóticos de la variedad Yucatán Enano verde**

El análisis de PCR tiempo real (qPCR) mostró el patrón de expresión del factor de transcripción WRI1 en embriones cigóticos de *C. nucifera* correspondientes a los diferentes estadios de desarrollo de la variedad Yucatán Enano verde. La expresión de WRI1 es casi constante en los embriones de esta variedad (niveles basales), con un ligero incremento en el estadio maduro (Figura 20). Es de resaltar, que la expresión de la actina como gen de referencia mantuvo un valor de 1.



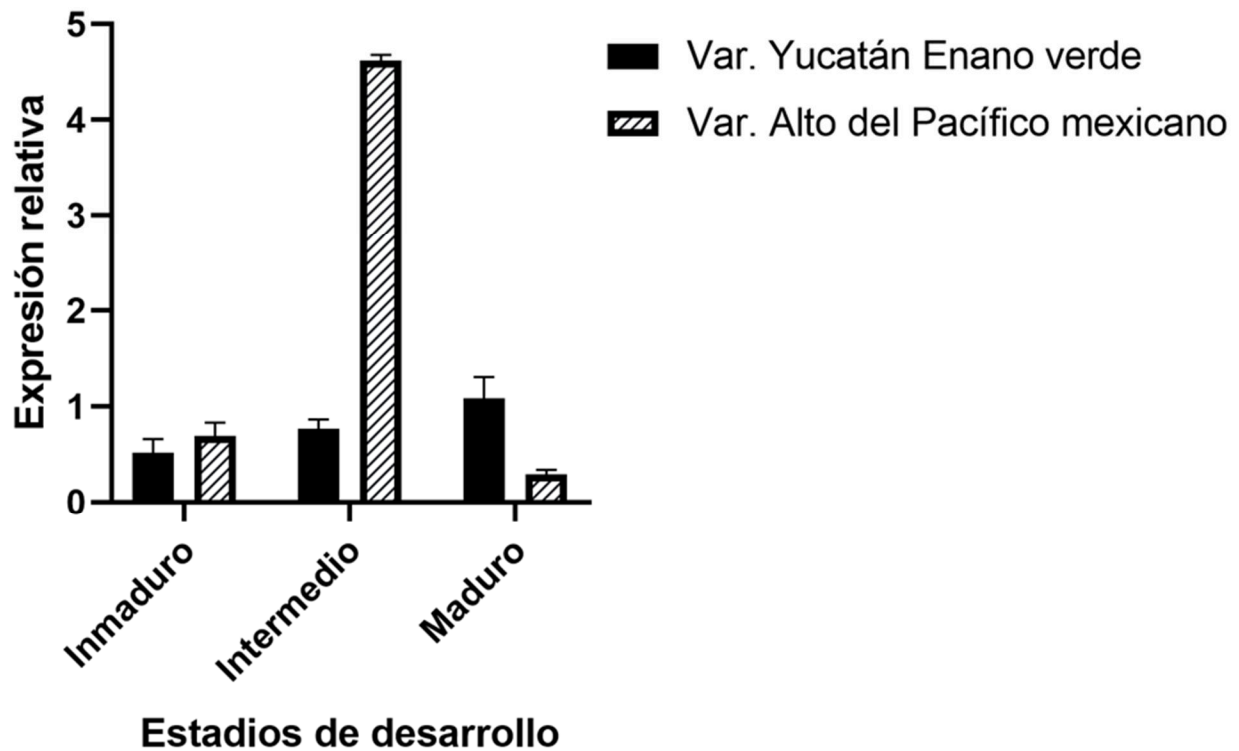


Figura 20. Análisis de la expresión relativa por qPCR del factor de transcripción WRI1 en embriones cigóticos de *C. nucifera* inmaduros, intermedios y maduros de la variedad Yucatán Enano Verde y Alto del Pacífico mexicano. La expresión de cada estadio se comparó contra el valor del calibrador (Actina =1).

## CAPÍTULO IV

### DISCUSIÓN

Estudios previos señalan a WRI1 como el principal regulador en la acumulación de aceite. Debido a su importante papel ha sido utilizado en la bioingeniería para incrementar el rendimiento de aceite vegetal, además de ser blanco de numerosas investigaciones en plantas angiospermas (Tang *et al.*, 2019; Qiao *et al.*, 2022). WRI1 es una proteína con características de factor de transcripción que se une a elementos de APETALA 2 (AP2) /EREBP (proteína de unión a elementos sensibles al etileno) (Cernac y Benning., 2004; Chapman y Ohlrogge., 2012).

Este factor de transcripción tiene al menos un dominio AP2 conservado y desempeña un papel importante en el crecimiento, el desarrollo y las respuestas al estrés en las plantas (Fei *et al.*, 2020).

El análisis filogenético mostró que de las 3 secuencias depositadas de WRI1 de *C. nucifera* la accesión KAG1365549.1 se agrupa con los WRI1 de *A. thaliana* y *Z. mays* cuya expresión ha sido reportada en embriones. Interesantemente la secuencia AFH68065.1 se localizó en un segundo grupo diferente, siendo agrupada con una secuencia más de *C. nucifera* y secuencias de *E. guineensis*, mostrando la cercanía de estas dos especies, lo cual es de esperarse sabiendo que el endospermo de coco es rico en aceite, del cual el 50% está constituido por ácido láurico, el mesocarpio de la palma aceitera se caracteriza por un 90% de aceite por lo cual ambas especies almacenan aceites en sus respectivos tejidos, mientras que el mesocarpio de la palmera datilera contiene pocos niveles de aceite (Xiao *et al.*, 2019).

Se secuenció el producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos específicos para *CnWRI1* y el ADNc de la variedad Alto del Pacífico mexicano de cocotero y se comparó con la secuencia de WRI1 (JQ040545.1) que se encuentra en la base de datos y que corresponde a una variedad de Hainan, China. La comparación mostró un 98.72% de identidad entre las secuencias. Esto podría deberse a que *C. nucifera* es una especie con una gran variabilidad genética por su modo de reproducción y su amplia distribución geográfica (Limonos *et al.*, 2016), lo que genera diferencias genéticas naturales entre las variedades. Por lo cual sería interesante secuenciar WRI1 de la variedad Yucatán Enano verde y evaluar sus porcentajes de identidad.

La mayoría de los genes WRI1, incluido AtWRI1, tienen siete exones; el tercer exón de los cuales contiene solo nueve nucleótidos que codifican a tres residuos de aminoácidos, valina, tirosina y leucina (VYL); este motivo está altamente conservado en el primer dominio AP2, el cual es un elemento clave de la estructura y función de AtWRI1 (Ma *et al.*, 2013; An *et al.*, 2017).

El alineamiento de las proteínas WRI1 de las Arecaceae, donde se incluye a *C. nucifera* (Figura 10), mostró que los aminoácidos VYL se encuentran en la posición 103, 104 y 105 de la estructura primaria del primer dominio AP2.

En *Arabidopsis* se ha mostrado que una mutación puntual en el motivo "VYL" puede provocar un mal funcionamiento de la proteína WRI1 (Ma *et al.*, 2013). En ese estudio, se sustituyeron los residuos de aminoácidos VYL de manera individual o en grupo. Al cuantificar el contenido de ácidos grasos en semilla mutantes en WRI1, se encontró que las mutantes afectadas en un solo aminoácidos podían ser complementadas en su función. En contraste, la mutante en los tres aminoácidos no pudo ser complementada y su rendimiento de ácidos grasos se redujo y su morfología se vio afectada. Dichos resultados sugieren que el motivo VYL desempeña un papel esencial en la función de WRI1, así como en el desarrollo de la semilla.

Adicionalmente, el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de WRI1 en la familia Arecaceae, mostró sitios de fosforilación en serina ~166, cercanos a los dominios de unión a ADN, como se ha reportado en otras especies (Fei *et al.*, 2021) (Figura 10).

El análisis de PCR en tiempo real reveló que en los embriones cigóticos de la variedad Alto del Pacífico mexicano, el factor de transcripción WRI1 alcanzó su mayor expresión en el estadio intermedio y mostró una disminución en el estadio maduro (Figura 20). Estos datos concuerdan con lo reportado por Sun (2020) en semillas de *Arabidopsis*. Adicionalmente, Kanai *et al.* (2016) señalaron que durante el desarrollo normal de semillas de *Arabidopsis*, WRI1, mostró altos niveles de transcripción durante la fase temprana del desarrollo de la semilla y que comprendieron los días 6 a 8 después de la floración (DAF; por sus siglas en inglés, Days After Flowering). Posteriormente en la fase tardía (10 a 14 DAF) los niveles de transcripción se redujeron considerablemente, lo que indica que WRI1 se expresa en etapas tempranas del desarrollo en semillas de *Arabidopsis*.

Además, se ha encontrado que la expresión de WRI1 aumentó entre los días 15 y 18 (etapa intermedia de desarrollo) después de la floración en *Helianthus annuus* (Moreno-Pérez *et al.*, 2021). Sun y colaboradores (2021) reportaron que en semillas de *Paeonia ostii* el nivel de expresión de *PoWRI1* fue mayor a los 50 DAF con respecto a los observados a los 30 o 70 DAF, mostrando una cinética de expresión similar a la observada en los embriones del coco de la variedad Alto del Pacífico mexicano.

El análisis de qPCR en los embriones de la variedad Yucatán Enano verde (Figura 20) se observó niveles basales de expresión del factor de transcripción en los estadios tempranos y alcanza su mayor expresión en el estadio maduro. Dicho comportamiento ha sido reportado anteriormente en *Gossypium hirsutum* L. donde se evaluó la expresión de genes asociados a la biosíntesis de FA en semillas en desarrollo (10, 20 y 30 DPA), y se observó que WRI1 alcanzó el mayor nivel de expresión el día 30 de la evaluación; además, el perfil de expresión coincidió con la acumulación de TAG (Zhao *et al.*, 2018).

Tomando en cuenta los antecedentes y los resultados en este trabajo se presenta un modelo del patrón expresión de WRI1 durante el desarrollo de embriones cigóticos en dos variedades de cocotero. Para la variedad Alto del Pacífico mexicano el factor de transcripción WRI1 se expresa mayormente en estadios intermedios del desarrollo del embrión cigótico y disminuye en estadios maduros (Figura 21), mientras que en la variedad Yucatán Enano verde la expresión mantiene niveles basales conforme los estadios de desarrollo se acercan a la madurez.

Se conoce que las variedades enanas tienen una baja calidad y rendimiento de copra por lo que son mayormente utilizados para la obtención de agua en estadios inmaduros, mientras las variedades altas son destinadas como fuente de copra/aceite (Rajesh *et al.*, 2021).

En el análisis de qPCR se observó que, en la variedad Alto del Pacífico mexicano, los niveles de expresión de WRI1 son 5 veces más altos en la fase intermedia que los niveles de expresión en la variedad Yucatán Enano verde. Y esos resultados son congruentes con

la mayor acumulación de ácidos grasos y TAGs en el endospermo sólido de las variedades altas (que es la fuente de copra), en comparación con las enanas (Rajesh *et al.*, 2021).

El presente trabajo proporciona evidencia para plantear el patrón de expresión de WRI1 en embriones cigóticos de cocotero en tres estadios de desarrollo, además, el conocimiento obtenido en este estudio constituye un acercamiento a la regulación génica en tejido embrionario vegetal, lo cual puede ayudar a futuras investigaciones en otras plantas oleaginosas.

Aunque el patrón de acumulación de ácidos grasos durante el desarrollo del cocotero ya ha sido documentado (Arunachalam *et al.*, 2021), los mecanismos de regulación génica en tejidos específicos aún siguen en estudio, por lo que es posible que, en un futuro, el conocimiento de genes, complejos enzimáticos y factores de transcripción formen parte de la red regulatoria de biosíntesis de ácidos grasos en plantas, y donde CnWRI1 tiene un lugar fundamental.

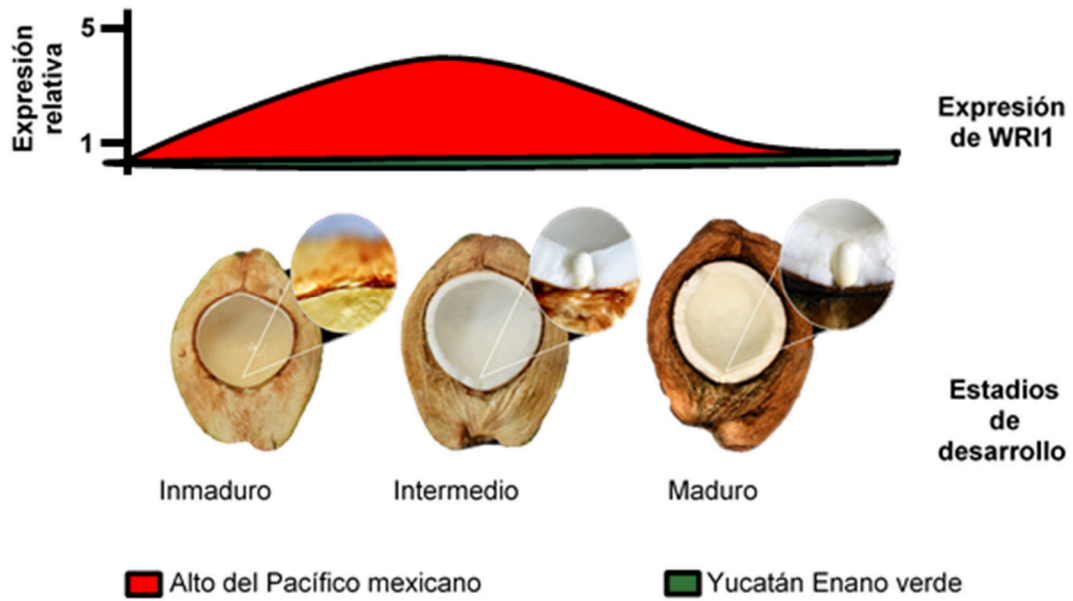


Figura 21. Modelo propuesto de la expresión del factor de transcripción WR1 en embriones cigóticos de cocotero en diferentes estadios de desarrollo de las variedades Alto del Pacífico mexicano y Yucatán Enano verde.



## **CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

### **5.1. CONCLUSIONES GENERALES**

- El análisis bioinformático de la proteína deducida a partir del ADNc obtenido del cocotero en este trabajo identificó el motivo “VYL”, que, junto con los resultados del BLAST, apoya que se logró clonar uno de los genes WRI1 de cocotero. Este gen se expresa en los embriones cigóticos.
- La expresión de WRI1 en los embriones cigóticos de la variedad Yucatán Enano verde mantuvo niveles basales en todos los estadios evaluados. En la variedad Alta del Pacífico mexicano, la expresión de WRI1 incrementó 5 veces en el estadio intermedio.

### **5.2. PERSPECTIVAS**

La investigación y trabajo futuro se centrará en analizar los cambios en el nivel de expresión de *CnWRI1* en otros tejidos de *C. nucifera*. Además, se trabajará en comprender las funciones de los dominios y motivos de *CnWRI1* y cómo intervienen en su mecanismo de acción. También es deseable que se evalúe la expresión por medio de otras metodologías como hibridación *in situ* y con ello contribuir al conocimiento de este factor de transcripción en cultivos oleaginosos.



---

**BIBLIOGRAFÍA**

- Alvarado Ruffo, K., Albaro Blanco, I., de la Noval Pons, B. M., & Martín Alonso, G. M. (2018). Propagación en vivero de *Cocos nucifera* L. . Caso de estudio: BARACOA. 39(4), 92–101.
- An, D., & Suh, M. C. (2015). Overexpression of *Arabidopsis* WRI1 enhanced seed mass and storage oil content in *Camelina sativa*. *Plant Biotechnology Reports*, 9(3), 137-148.
- An, D., Kim, H., Ju, S., Go, Y. S., Kim, H. U., & Suh, M. C. (2017). Expression of *Camelina* WRINKLED1 isoforms rescue the seed phenotype of the *Arabidopsis* *wri1* mutant and increase the triacylglycerol content in tobacco leaves. *Frontiers in Plant Science*, 8, 34.
- Arunachalam, V., Ramesh, S. V., Paulraj, S., Babu, B. K., Muralikrishna, K. S., & Rajesh, M. K. (2021). Endosperm Oil Biosynthesis: A Case Study for Trait Related Gene Evolution in Coconut. *The Coconut Genome*, 145-157.
- Bates, P. D., Durrett, T. P., Ohlrogge, J. B., & Pollard, M. (2009). Analysis of acyl fluxes through multiple pathways of triacylglycerol synthesis in developing soybean embryos. *Plant Physiology*, 150 (1), 55-72.
- Bates, P. D., Stymne, S., & Ohlrogge, J. (2013). Biochemical pathways in seed oil synthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 16(3), 358-364.
- Bourgis, F., Kilaru, A., Cao, X., Ngando-Ebongue, G. F., Drira, N., Ohlrogge, J. B., & Arondel, V. (2011). Comparative transcriptome and metabolite analysis of oil palm and date palm mesocarp that differs dramatically in carbon partitioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108 (30), 12527-12532.
- Cernac, A., & Benning, C. (2004). WRINKLED1 encodes an AP2/EREB domain protein involved in the control of storage compound biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 40 (4), 575-585.

- 
- Chan, E., & Elevitch, C. R. (2006). *Cocos nucifera* (coconut). Species profiles for Pacific Island agroforestry, 2, 1-27.
- Chapman, K. D., & Ohlrogge, J. B. (2012). Compartmentation of triacylglycerol accumulation in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 287 (4), 2288-2294.
- Fei, W., Yang, S., Hu, J., Yang, F., Qu, G., Peng, D., & Zhou, B. (2020). Research advances of WRINKLED1 (WRI1) in plants. *Functional Plant Biology*, 47(3), 185-194.
- Felton, C. V., Crook, D., Davies, M. J., & Oliver, M. F. (1994). Dietary polyunsaturated fatty acids and composition of human aortic plaques. *The Lancet*, 344(8931), 1195-1196.
- Fife, B. (2013). Health properties of coconut oil. *Agro Food Ind Hi Tec*, 24(3), 7-10.
- Focks, N., & Benning, C. (1998). Wrinkled1: a novel, low-seed-oil mutant of *Arabidopsis* with a deficiency in the seed-specific regulation of carbohydrate metabolism. *Plant Physiology*, 118 (1), 91-101.
- Gómez-Merino, F. C., Trejo-Téllez, L. I., & Tiessen, A. (2009). Factores de transcripción. Fundamentos y Metodologías Innovadoras para el Mejoramiento Genético de Maíz. A Tiessen (ed). Fundación Ciencia Activa, Bogotá, Colombia. pp, 127-163.
- Harrison N.A., Richardson P.A., Kramer J.B., Tsai J.H. (1994) Detection of the mycoplasma-like organism associated with lethal yellowing disease of palms in Florida by polymerase chain reaction. *Plant Pathology*, 43, 998–1008.
- Hong, J. C. (2016). General aspects of plant transcription factor families. In *Plant transcription factors* (pp. 35-56). *Academic Press*.
- Ignacio, I. F., & Miguel, T. S. (2021). Research opportunities on the coconut (*Cocos nucifera* L.) using new technologies. *South African Journal of Botany*, 141, 414-420.
- Jaakola, L., Pirttilä, A. M., Halonen, M., & Hohtola, A. (2001). Isolation of high-quality RNA from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit. *Molecular biotechnology*, 19(2), 201-203.

- Kanai, M., Mano, S., Kondo, M., Hayashi, M., & Nishimura, M. (2016). Extension of oil biosynthesis during the mid-phase of seed development enhances oil content in *Arabidopsis* seeds. *Plant Biotechnology Journal*, 14(5), 1241-1250.
- Kilaru A, Cao X, Dabbs PB, Sung HJ, Rahman MM, Thrower N, Zynda G, Podicheti R, Ibarra-Laclette E, Herrera-Estrella L, Mockaitis K, Ohlrogge JB. Oil biosynthesis in a basal angiosperm: transcriptome analysis of *Persea Americana* mesocarp. *BMC Plant Biol.* 2015 Aug 16;15:203. doi: 10.1186/s12870-015-0586-2. PMID: 26276496; PMCID: PMC4537532.
- Kong, Q., & Ma, W. (2018). WRINKLED1 transcription factor: How much do we know about its regulatory mechanism? *Plant Science*, 272, 153-156.
- Kong, Q., Yang, Y., Guo, L., Yuan, L., & Ma, W. (2020). Molecular basis of plant oil biosynthesis: Insights gained from studying the WRINKLED1 transcription factor. *Frontiers in Plant Science*, 11, 24. a
- Kong, Q., Yang, Y., Low, P. M., Guo, L., Yuan, L., & Ma, W. (2020). The function of the WRI1-TCP4 regulatory module in lipid biosynthesis. *Plant Signaling & Behavior*, 15(11), 1812878. b
- Licausi, F., Ohme-Takagi, M., & Perata, P. (2013). APETALA 2/Ethylene Responsive Factor (AP 2/ERF) transcription factors: Mediators of stress responses and developmental programs. *New Phytologist*, 199(3), 639-649.
- Limones Briones, V., & Fernández Barrera, M. A. (2016). El cocotero: “El árbol de la vida.” 110, 107–110.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>ΔΔCT method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Lizano, M. (2005). Guía técnica del cultivo de coco. IICA, San Salvador (El Salvador) Ministerio de Agricultura y Ganadería, San Salvador (El Salvador).
- Ma W, Kong Q, Arondel V, Kilaru A, Bates PD, Thrower NA, Benning C, Ohlrogge JB. Wrinkled1, a ubiquitous regulator in oil accumulating tissues from *Arabidopsis* embryos to oil palm mesocarp. *PLoS One*. 2013 Jul 26;8(7): e68887. doi:

---

10.1371/journal.pone.0068887. PMID: 23922666; PMCID: PMC3724841.

- Moreno-Pérez, A. J., Santos-Pereira, J. M., Martins-Noguerol, R., DeAndrés-Gil, C., Troncoso-Ponce, M. A., Venegas-Calerón, M., & Martínez-Force, E. (2021). Genome-wide mapping of histone H3 lysine 4 trimethylation (H3K4me3) and its involvement in fatty acid biosynthesis in sunflower developing seeds. *Plants*, 10(4), 706.
- Nakano, T., Suzuki, K., Fujimura, T., & Shinshi, H. (2006). Genome-wide analysis of the ERF gene family in Arabidopsis and rice. *Plant physiology*, 140(2), 411-432.
- Niral V, Samsudeen K, Sudha R, Ranjini TN (2019) Genetic resource management and improved varieties of coconut. *Ind Coconut J* 62(4): 10-14.
- Oropeza, C., Cordova, I., Puch-Hau, C., Castillo, R., Chan, J. L., & Sáenz, L. (2017). Detection of lethal yellowing phytoplasma in coconut plantlets obtained through in vitro germination of zygotic embryos from the seeds of infected palms. *Annals of Applied Biology*, 171 (1), 28-36.
- Perera, P. I., Hocher, V., Weerakoon, L. K., Yakandawala, D. M. D., Fernando, S. C., & Verdeil, J. L. (2010). Early inflorescence and floral development in *Cocos nucifera* L.(Arecaceae: Arecoideae). *South African Journal of Botany*, 76(3), 482-492.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45-e45.
- Qiao, Z., Kong, Q., Tee, W. T., Lim, A. R., Teo, M. X., Olieric, V., & Gao, Y. G. (2022). Molecular basis of the key regulator WRINKLED1 in plant oil biosynthesis. *Science Advances*, 8(34), eabq1211.
- Rajesh, M. K., Ramesh, S. V., Perera, L., & Kole, C. (Eds.). (2021). *The Coconut Genome*. Springer International Publishing.
- Ruuska, S. A., Girke, T., Benning, C., & Ohlrogge, J. B. (2002). Contrapuntal networks of gene expression during Arabidopsis seed filling. *The Plant Cell*, 14 (6), 1191-1206.
- Sánchez, D. G., & Ríos, G. L. (2002). Manejo de la palma de coco (*Cocos nucifera* L.) en

- 
- México. Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente, 8 (1), 39.
- Shen B, Allen WB, Zheng P, Li C, Glassman K, Ranch J, Nubel D, Tarczynski MC.  
Expression of ZmLEC1 and ZmWRI1 increases seed oil production in maize.  
*Plant Physiol.* 2010 Jul;153(3):980-7. doi: 10.1104/pp.110.157537. Epub 2010  
May 20. PMID: 20488892; PMCID: PMC2899924.
- SIAP, Agroalimentario, A. 2018. Available online:  
[https://nube.siap.gob.mx/gobmx\\_publicaciones\\_siap/pag/2018](https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2018)
- SIAP, Agroalimentario, A. 2021. Available online:  
[https://nube.siap.gob.mx/gobmx\\_publicaciones\\_siap/pag/2021/Panorama-Agroalimentario-2021](https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2021/Panorama-Agroalimentario-2021)
- SIAP, Agroalimentario, A. 2022. Available online:  
[https://nube.siap.gob.mx/gobmx\\_publicaciones\\_siap/pag/2022/Panorama-Agroalimentario-2022](https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2022/Panorama-Agroalimentario-2022)
- Souza-Perera, R., Torres-Hernández, N., & Zúñiga-Aguilar, J. J. (2018). Extraction of high quality RNA from hard tissues of adult coconut palms. *African Journal of Biotechnology*, 17(9), 263-268.
- Subroto, A. P., Utomo, C., Darmawan, C., Tanjung, Z. A., & Liwang, T. (2015). Isolation and characterization of oil palm Wrinkled 1 (WRI1) gene. *Procedia Chemistry*, 14, 40-46.
- Sun R, Ye R, Gao L, Zhang L, Wang R, Mao T, Zheng Y, Li D and Lin Y (2017)  
Characterization and Ectopic Expression of CoWRI1, an AP2/EREBP Domain-Containing Transcription Factor from Coconut (*Cocos nucifera* L.) Endosperm, Changes the Seeds Oil Content in Transgenic *Arabidopsis thaliana* and Rice (*Oryza sativa* L.). *Front. Plant Sci.* 8:63. doi: 10.3389/fpls.2017.00063
- Sun, J., Chen, T., Liu, M., Zhao, D., & Tao, J. (2021). Analysis and functional verification of PoWRI1 gene associated with oil accumulation process in *Paeonia ostii*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 6996.
- Sun, T. (2020). Unexpected Role of a TCP Transcription Factor in Seed Oil

Biosynthesis, *Plant Physiology*, Volume 184, Issue 2, October 2020, Pages 550–551.

- Swaminathan, K., Peterson, K., & Jack, T. (2008). The plant B3 superfamily. Trends in *Plant Science*, 13(12), 647-655.
- Tang, T., Du, C., Song, H., Aziz, U., Wang, L., Zhao, C., & Zhang, M. (2019). Genome-wide analysis reveals the evolution and structural features of WRINKLED1 in plants. *Molecular Genetics and Genomics*, 294, 329-341.
- Xiao, Y., Xu, P., Fan, H., Baudouin, L., Xia, W., Bocs, S. & Yang, Y. (2017). The genome draft of coconut (*Cocos nucifera*). *Gigascience*, 6 (11), gix095.
- Yang, Y., Munz, J., Cass, C., Zienkiewicz, A., Kong, Q., Ma, W., ... & Benning, C. (2015). Ectopic expression of WRINKLED1 affects fatty acid homeostasis in *Brachypodium distachyon* vegetative tissues. *Plant Physiology*, 169(3), 1836-1847.
- Ye, J., Wang, C., Sun, Y., Qu, J., Mao, H., & Chua, N. H. (2018). Overexpression of a transcription factor increases lipid content in a woody perennial *Jatropha curcas*. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1479.
- Zhang, M., Cao, X., Jia, Q., & Ohlrogge, J. (2016). FUSCA 3 activates triacylglycerol accumulation in *Arabidopsis* seedlings and tobacco BY 2 cells. *The Plant Journal*, 88 (1), 95-107.
- Zhao, Y., Wang, Y., Huang, Y., Cui, Y., & Hua, J. (2018). Gene network of oil accumulation reveals expression profiles in developing embryos and fatty acid composition in *Upland cotton*. *Journal of Plant Physiology*, 228, 101-112.
- Zheng, Y., Jin, Y., Yuan, Y., Feng, D., Chen, L., Li, D., & Zhou, P. (2019). Identification and function analysis of a type 2 diacylglycerol acyltransferase (DGAT2) from the endosperm of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Gene*, 702, 75-82.

## ANEXOS

**Tabla 5. Características específicas de los oligonucleótidos diseñados para este trabajo.**

<b>CoWRI1q</b>	Tipo	Secuencia	Longitud	Tm	Porcentaje de CG	Amplicón
	Forward Primer	TGTATATCCTCCTCTCGATGTCC	23	62.298	47.826	
	Reverse Primer	CACTCTCATCGCCTCCAAAG	20	62.215	55	
	Producto					125
<b>CoWRI1pf</b>						
	Forward Primer	AAGAGTACGAGGAGATGCAAAC	22	62.088	45.455	
	Reverse Primer	GCCTCCAAAGGTCTCAAAC	20	62.13	50	
	Producto					563
<b>Actinq</b>						
	Forward Primer	TGGTATCCACGAGACCACT	20	64.348	55	
	Reverse Primer	TCATACGGTCACCAATGCCC	20	64.2	55	
	Producto					125
<b>Actinpf</b>						
	Forward Primer	CACACGGTTCGATCTATGAA	21	61.827	47.619	
	Reverse Primer	GATCCTCCAATCCAGACACTATAC	24	61.704	45.833	
	Producto					551

Secuencia completa de nucleótidos del factor de transcripción de interés, depositado en la base de datos de NCBI.

```
>JQ040545.1 Cocos nucifera AP2/EREBP transcription factor WRI1 (WRI1)
mRNA, complete cds
TATCGGCCATTACGGCCGGGGATCAACCAAACCAACAGTATATAATAAAAATTTAAAATTATCCCTTTCTAG
AGCATGACCCATCATGAAGAAGAAGTCTCCTCCATCTACTCCCCTCCCACCATCTCGTTCCCTTTTCCGCTT
CACCATCCAGCTATGCACCCCTTTCTTCTCCTAATATGATCCCCGTTAACAAGTGCAAGAAGTCAAGGCC
AAAACAAAAGAAAGCTAAGAAGCTCAGATGAAGCCCACGTGGAAAGCAGTAGGAGATCAAGAAGCTCCATC
TACAGAGGGGTACACAAGGCACCGAGGGACTGGAAGGTATGAAGCTCACCTGTGGGACAAGAAGCTGGCAGC
ACCCGGTCCAGATCAAGAAAGGCAGGCAAGTTTACTTGGGAGCCTTTAATGATGAGTTGGACGCAGCAGCAG
AGCTCATGACTTGGCTGCCCTTAAGTTCTGGGGTCCAGAGACAATTTTAAACTTCCCTGTGGAAATATAT
AGAGAAGAGTACGAGGAGATGCAAACCGTGTCAAAGGAAGAGGTGCTGGCTTCTCTTAGGCGCAGGAGCA
ACGGCTTTGCCAGAGGTACCTCTAAGTACCGTGGGGTGGCCAGGCATCACAAAAACGGCCGGTGGGAGGC
CAGGCTTGGCAAGGACTTTGGCTGCAAGTACATCTACTTGGGAACATACGCAACTCAAGAGGAGGCTGCC
CAAGCTTATGATTTAGCTGCTTTAGAATATAAAGGGCCAAATATAGTGACCAACTTTGCTAGCAGTGTCT
ATATGCATCGCCTACAGCCATTTATGCAGCTACTAGTGAAGCCTGGGACGGAGCCAGCACAGAAGACCT
CAGTGTATGCACATGGAAGCAACCGAGACAATTGATCAGACGGTGCCAAATGACGACCTGCCGGAGATC
TCATGGACCTTCGACATGGACCATGACTTTGGTGTATATCCTCCTCTCGATGTCCCAATTGAGGATGATC
TACAAGACATCTTGAATGATCTCAACTTGGAGGACAACATTGAGCACCTCTTTGAAGAGTTTGAAGACCTT
TGGAGGCGATGAGAGTGAAGTGTGGTTTGGAGTGAACAAAGGATGCCTAGGGGAGGAGAGTGGTTGA
AGGTGGAGGACATGGCATCTCACGTGAACTCGGTTTCTGCCCTCCTCAAAAAGTATTGTCTGCTTTTAGA
AATCTTGTCTATGTGAGCCTTTCTTGTCTGAGGGTGTATTGGTGGGTGCGATTGGAGTCAGGAGCCTAATA
CGCCTTTGAATCTGTGAGGGATATGTTTCAAGTTTCAATTCTAGCTAGTTTTCTTTTCTTTTCTTTTTTTT
TTCTTTCAGTCGCCAGTCTGGTACTCTGTTGAATATTATGGTGTGCTTCTTGTTTAGCTGTTCTTTTTCTT
CTCCCTTTTAGAGTCCAACATATTTATGTATGTTTTGATGTAATGGGGTATGCTGGCAGACAACCTTGATA
TATGT
```

Secuencia cds de nucleótidos del factor de transcripción de interés, depositado en la base de datos de NCBI.

```
>JQ040545.1:74-1102 Cocos nucifera AP2/EREBP transcription factor WRI1
(WRI1) mRNA, complete cds
ATGACCCCTCATGAAGAAGAAGTCTCCTCCATCTACTCCCCTCCCACCATCTCGTTCCCTTTTCCGCTTAC
CATCCAGCTATGCACCCCTTTCTTCTCCTAATATGATCCCCGTTAACAAGTGCAAGAAGTCAAGGCCAAA
ACAAAAGAAAGCTAAGAAGCTCAGATGAAGCCCACGTGGAAAGCAGTAGGAGATCAAGAAGCTCCATCTAC
AGAGGGGTACACAAGGCACCGAGGGACTGGAAGGTATGAAGCTCACCTGTGGGACAAGAAGCTGGCAGCACC
CGGTCCAGATCAAGAAAGGCAGGCAAGTTTACTTGGGAGCCTTTAATGATGAGTTGGACGCAGCAGCAGCAGC
TCATGACTTGGCTGCCCTTAAGTTCTGGGGTCCAGAGACAATTTTAAACTTCCCTGTGGAAATATATAGA
GAAGAGTACGAGGAGATGCAAACCGTGTCAAAGGAAGAGGTGCTGGCTTCTCTTAGGCGCAGGAGCAACG
GCTTTGCCAGAGGTACCTCTAAGTACCGTGGGGTGGCCAGGCATCACAAAAACGGCCGGTGGGAGGCCAG
GCTTGGCAAGGACTTTGGCTGCAAGTACATCTACTTGGGAACATACGCAACTCAAGAGGAGGCTGCCCAA
GCTTATGATTTAGCTGCTTTAGAATATAAAGGGCCAAATATAGTGACCAACTTTGCTAGCAGTGTCTATA
TGCATCGCCTACAGCCATTTATGCAGCTACTAGTGAAGCCTGGGACGGAGCCAGCACAGAAGACCTCAG
TGTTATGCACATGGAAGCAACCGAGACAATTGATCAGACGGTGCCAAATGACGACCTGCCGGAGATCTCA
TGGACCTTCGACATGGACCATGACTTTGGTGTATATCCTCCTCTCGATGTCCCAATTGAGGATGATCTAC
AAGACATCTTGAATGATCTCAACTTGGAGGACAACATTGAGCACCTCTTTGAAGAGTTTGAAGCCTTTGG
AGGCGATGAGAGTGAAGTGTGGTTTGGAGTGAACAAAGGATGCCTAG
```

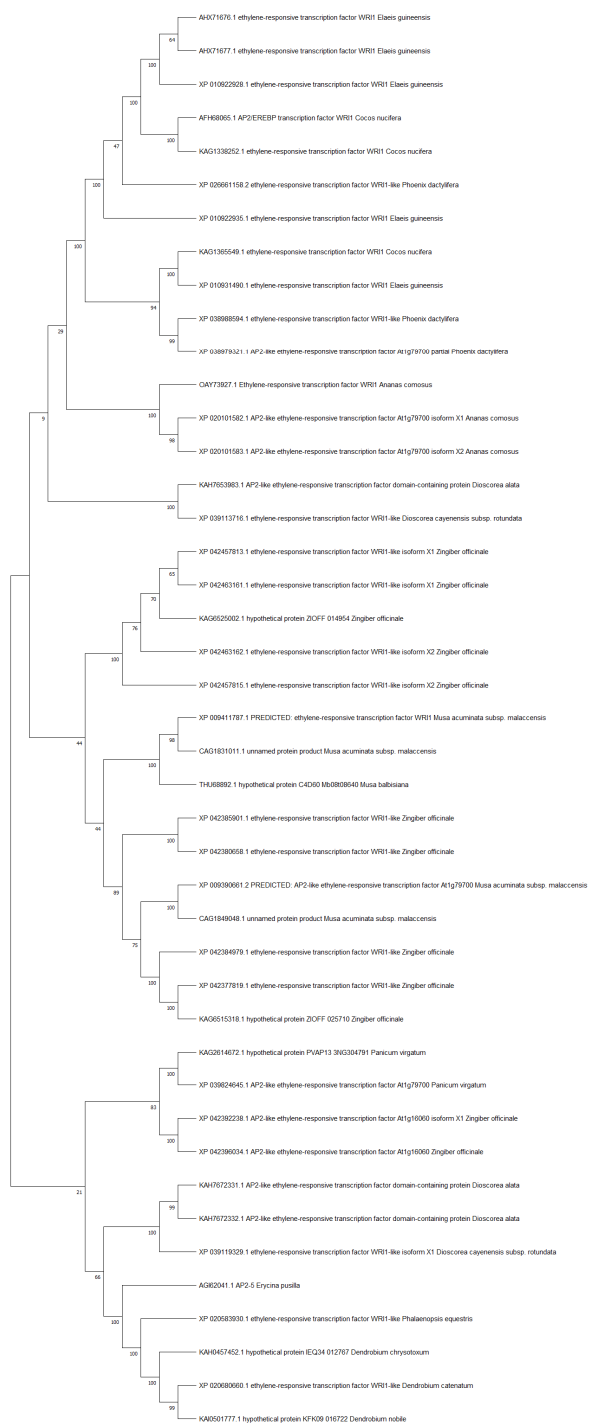


---

**Secuencia de aminoácidos, depositado en la base de datos de NCBI.**

```
>AFH68065.1 AP2/EREBP transcription factor WR11 [Cocos nucifera]
MTLMKKKSPSTPLPPSRFSASPSSYAPLSSPNMIPVNCCKKSKPKQKKAKNSDEAHVSSRRSRSSIY
RGVTRHRGTGRYEHLWDKNWQHPVQIKKGRQVYLGAFNDELDAARAHDLAALKFWGPETILNFPVEIYR
EEYEEMQTVSKEEVLASLRRRSNGFARGTSKYRGVARHHKNGRWEARLGKDFGCKYIYLGTYATQEEAAQ
AYDLAALEYKGPNIVTNFASSVYMHRLQPFMQLLVKPGTEPAQEDLSVMHMEATETIDQTVPNDDLPEIS
WTFDMDHDFGVYPPLDVPIEDDLQDILNDLNLEDNIEHLFEFETFGGDESGSDGLSATKDA
```

## Árbol filogenético de WRI1 correspondiente a especies monocotiledóneas



Alineamiento de secuencias de aminoácidos de tres accesiones del factor de transcripción WRI1 de *C. nucifera*.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> AP2/EBEP transcription factor WRI1 [Cocos nucifera]	<a href="#">Cocos nucifera</a>	717	717	100%	0.0	100.00%	342	<a href="#">AFH68065.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> ethylene-responsive transcription factor WRI1 [Cocos nucifera]	<a href="#">Cocos nucifera</a>	611	611	99%	0.0	89.09%	309	<a href="#">KAG1338252.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> ethylene-responsive transcription factor WRI1 [Cocos nucifera]	<a href="#">Cocos nucifera</a>	380	380	89%	1e-127	63.84%	374	<a href="#">KAG1365549.1</a>

```

..... 10 ..... 20 ..... 30 ..... 40 ..... 50
AFH68065_1_AP2_MTLMKKKSPP STPLPPSRSF SASPSSYAPL SSPNMIPVNK --CK-KSKPK
KAG1338252_1_et ---MKKKSPS STPLPPSRSF SASPSSYAPL SSPNMIPVNK --CK-KSKPK
KAG1365549_1_et ----MKKSPS SPPLPSSRSS SSSPSNHAPL SSSNVIPVNK PQSKSKSKPK

..... 60 ..... 70 ..... 80 ..... 90 ..... 100
AFH68065_1_AP2_QKKAKNSDEA HVESRRRSRS SIYRGVTRHR GTGRYEHLW DKNWQHPVQI
KAG1338252_1_et QKKAKNSDEA HVESRRRSRS SIYRGVTRHR GTGRYEHLW DKNWQHPVQI
KAG1365549_1_et HKKAKNPDNA HSESI RR-RS SIYRGVTRHR WTGRFEHLW DKNWQHPLHN

..... 110 ..... 120 ..... 130 ..... 140 ..... 150
AFH68065_1_AP2_KKGRQVYLG FNDLDAARA HDLAALKFWG PETILNFPVE IYREYEEMQ
KAG1338252_1_et KKGRQ---GA FNDLDAARA HDLAALKFWG PETILNFPVE IYREYEEMQ
KAG1365549_1_et KKGRQVYLG YDAEVDAART HDLAALKFCG PEATLNFPVE MYTECEEMQ

..... 160 ..... 170 ..... 180 ..... 190 ..... 200
AFH68065_1_AP2_TVSKEEVLAS LRRRSNGFAR GTSKYRGVAR HKNNGRWEAR LGKDFGCKYI
KAG1338252_1_et TVSKEEVLAS LRRRSNGFAR GLTPFESI - - - - -
KAG1365549_1_et TMSREEWVAS LRRRSNGFAR GTSKYRGVAR HNNNGRWEAR LGLVLGKYKYI

..... 210 ..... 220 ..... 230 ..... 240 ..... 250
AFH68065_1_AP2_YLGTYTEEE AAQAYDLAAL EYKGNIVTN FASSVYMHRL QPFMQLLVKP
KAG1338252_1_et ----ATQEE AAQAYDLAAL EYKGNIVTN FASSVYMHRL QPFMQLLVKP
KAG1365549_1_et YLGTYTEEE AAQAYDLAAL QYKGNAMTN FNSCLYVNC PQCICKLPPKL

..... 260 ..... 270 ..... 280 ..... 290 ..... 300
AFH68065_1_AP2_GTEPAQEDLS -----VMHM EATETIDQTV PNDD-LPEIS W-TFDMHDF
KAG1338252_1_et GTEPAQEDLS -----VMHM EATETIDQTV PNDD-LPEIS W-TFDMHDF
KAG1365549_1_et EMEPGRKEFS PLQEARVVP EPTESIDQTV SSDDILDITIS WSTSGMDDYF

..... 310 ..... 320 ..... 330 ..... 340 ..... 350
AFH68065_1_AP2_GVYPPLDVPI --EDDLQDIL NDLNLEDNIE HLFEEFETFG ---GD---ES
KAG1338252_1_et GVYPPLDVPI --EDDLQDIL NDLNLEDNIE HLFEEFETFG ---GD---ES
KAG1365549_1_et DAYPVLDLTV GCSDDLVDLS NNIGFEDNIE HFFEGFETFG CSEGLIREE

..... 360 ..... 370 .....
AFH68065_1_AP2_GSDGLSATKD A-----
KAG1338252_1_et GSDGLSATKD A-----
KAG1365549_1 et GQVKEAGVKE DMESQVNSIS YPLQISICS

```

■ Dominio AP2
 ■ Dominio AP2
 ■ Motivo VYL