



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**EFFECTO DE LA INOCULACIÓN DE HONGOS MICORRÍZICOS
ARBUSCULARES EN EL DESARROLLO DE PLÁNTULAS
MICROPROPAGADAS DE COCOTERO**

Tesis que presenta

Natali Gómez Falcón

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

Ciencias Biológicas, opción Biotecnología

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 **Natali Gómez Falcón** titulado **Efecto de la inoculación de hongos micorrízicos arbusculares en el desarrollo de plántulas micropropagadas de cocotero** fue realizado en la Unidad de Biotecnología, en la línea de Agrobiotecnología, en el laboratorio de cocotero, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Luis Sáenz Carbonell y Dr. Carlos Oropeza Salín dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente



Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 09 de mayo de 2023

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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



Natali Gómez Falcón.

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado *Impulso a la cadena de valor del cocotero para aumentar su competitividad y contribuir al desarrollo socio-económico en la región Pacífico Sur y otros estados productores*, 2018-2021, FORDECYT 296195 en el que participé bajo la dirección del Dr. Luis Sáenz Carbonell y el Dr. Carlos Oropeza Salín.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACyT por la beca otorgada (733853) para estudios de doctorado.

Al Fondo FORDECyT-CONACyT, por el financiamiento del proyecto “Impulso a la cadena de valor del cocotero para aumentar su competitividad y contribuir al desarrollo socio-económico en la región Pacífico Sur y otros estados productores”, 2018-2021, FORDECYT 296195, del cual este proyecto es parte.

Al CICY, por las instalaciones, equipo e infraestructura para realizar las actividades experimentales (Laboratorio de cocotero e invernadero 1).

Al INBIOTECA, por las instalaciones, equipo e infraestructura para realizar actividades experimentales (Laboratorio de organismos simbióticos, dirigido por el Dr. Antonio Andrade Torres).

Al Comité Tutorial, Dr. Luis Alfonso Sáenz Carbonell, Dr. Carlos Oropeza Salín, Dr. Luis Alberto Lara Pérez y Dr. Antonio Andrade Torres, por su apoyo para la realización de proyecto de investigación.

Al Comité Predoctoral, Dr. Luis Alberto Lara Pérez, Dr. Antonio Andrade Torres, Dr. Jorge Santamaría Fernández, Dra. Blondy Canto Canché, Dr. Javier Orlando Mijangos Cortes. por su participación y comentarios que fortalecieron la investigación.

Al Comité Revisor, Dr. Luis Alberto Lara Pérez, Dr. Antonio Andrade Torres, Dr. Jorge Santamaría Fernández, Dra. Blondy Canto Canché, Dr. Javier Orlando Mijangos Cortes, Dr. Luis Alfonso Sáenz Carbonell, Dr. Carlos Oropeza Salín por sus aportaciones, comentarios y sugerencias que mejoraron el contenido de este documento.

A los Técnicos, Dra. María Narváez Cab, M.C. Iván Córdova Lara, M.C. Francisco Espadas, Ing. Luis Chang, Ing. Guillermo Rodríguez, del laboratorio de cocotero, fisiología vegetal y clonal por su apoyo técnico en la ejecución de actividades inherentes a este proyecto.

A los Doctores, Dr. Hassan Polo Marcial, Dr. Rubén Fernando Guzmán Olmos y Dr. Cristian H. del Ángel Piña del Laboratorio de organismos simbióticos del INBIOTECA, por su apoyo en el montaje de protocolos de micorriza arbuscular.

PRODUCTOS ASOCIADOS

Artículo de Investigación. *In vitro* Cellular & Developmental Biology – Plant. Enviado (15 de diciembre de 2022), aceptado (26 de marzo de 2023). Arbuscular mycorrhizal fungi increase the survival and growth of micropropagated coconut (*Cocos nucifera* L.) plantlets.

Artículo de Investigación. *En preparación.* Inoculation with native and commercial AMF promotes plantlets growth and nutrient transporter genes expression in micropropagated coconut.

Artículo de divulgación. Agroevento. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Septiembre 2022. Hongos micorrízicos arbusculares: Un biofertilizante que asegura un manejo sustentable de cocotero en México.

Artículo de divulgación. *Enviado.* Desde el Herbario del CICY. Marzo 2023. *Acaulospora cavernata*, un nuevo registro de hongo micorrízico arbuscular para Yucatán.

Presentación oral. Simposio Nacional de Herramientas de la Biotecnología para una agricultura sustentable. Octubre 2021. Efecto de la inoculación de hongos micorrízicos arbusculares en el desarrollo de plántulas micropropagadas de cocotero.

Presentación cartel. Congreso Internacional de Agroecosistemas Tropicales (CIATROPIC marzo, 2023). Establecimiento de un sistema de aclimatización gradual de plántulas de cocotero micropropagadas utilizando polvillo de coco y HMA.

Presentación cartel. Congreso Internacional de Agroecosistemas Tropicales (CIATROPIC marzo, 2023). Riqueza de glomerosporas asociadas a plantas de cocotero resistentes a amarillamiento letal en el sur de Veracruz, México.

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE CUADROS.....	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO I	3
ANTECEDENTES	3
1.1. Origen, distribución e importancia económica del cocotero.	3
1.2. Problemática del cultivo de cocotero.....	4
1.3. Estrategias para la replantación del cocotero	5
1.4. Micropropagación de cocotero mediante embriogénesis somática	5
1.4.1. Aclimatización de plántulas de cocotero	6
1.4.2. Retos en la aclimatización de las plántulas.....	6
1.5. Hongos micorrízicos arbusculares y su interacción con las plantas	8
1.5.1. Señalización molecular en la simbiosis arbuscular	10
1.5.2. Metabolismo en la interfaz simbiótica arbuscular.....	11
1.6. Hongos micorrízicos arbusculares en sistemas de micropropagación	12
1.7. Hongos micorrízicos arbusculares y su interacción en el cultivo de cocotero.....	12
JUSTIFICACIÓN	14
HIPÓTESIS	15
OBJETIVO GENERAL	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	16
CAPITULO II	17
EFFECTO DE LA ADICIÓN EXÓGENA DE REGULADORES DE CRECIMIENTO <i>IN</i> <i>VITRO</i> EN PLÁNTULAS DE COCOTERO	17
2.1. INTRODUCCIÓN	17
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
2.2.1. Sitio experimental	18
2.2.2. Material vegetal	18

2.2.3. Preparación de medios de cultivo	18
2.2.4. Evaluación del crecimiento de raíces.....	19
2.2.5. Diseño experimental.....	20
2.2.6. Análisis estadístico	20
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
2.3.1. Formación de raíces primarias	20
2.3.2. Formación de raíces secundarias.....	21
2.3.3. Longitud de raíces primarias	21
2.4. CONCLUSIÓN	21
CAPITULO III	23
ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO DE ACLIMATIZACIÓN CON HMA EN PLÁNTULAS DE COCOTERO.....	23
3.1. INTRODUCCIÓN	23
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
3.2.1. Material biológico	23
3.2.2. Aclimatización y tratamientos de inoculación con HMA.....	24
3.2.3. Evaluación del crecimiento y sobrevivencia de las plántulas	25
3.2.4. Estimación de la colonización micorrízica.....	25
3.2.5. Diseño experimental.....	25
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
3.3.1. Sobrevivencia de plántulas	25
3.3.2. Crecimiento de plántulas de cocotero aclimatadas en invernadero	27
3.3.3. Colonización micorrízica de plántulas de cocotero inoculadas con HMA aclimatizadas en invernadero	30
3.4. CONCLUSIÓN	31
CAPITULO IV	33
LOS HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES AUMENTAN LA SOBREVIVENCIA Y EL CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS MICROPROPAGADAS DE COCOTERO (<i>Cocos nucifera</i> L.)	33
4.1. INTRODUCCIÓN	33
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
4.2.1. Sitio experimental y material vegetal	35
4.2.2. Hongos micorrízicos arbusculares utilizados	35
4.2.3. Identificación de HMA.....	36
4.2.4. Cuantificación de esporas.....	36

4.2.5. Inoculación y aclimatización de plántulas de cocotero con HMA	36
4.2.6. Experimentos realizados	37
4.2.7. Parámetros de crecimiento	37
4.2.8. Parámetros fisiológicos	38
4.2.9. Crecimiento de raíces y colonización	38
4.2.10. Análisis estadístico.....	38
4.3. RESULTADOS.....	39
4.3.1. Supervivencia de las plántulas	39
4.3.2. Altura de plántulas y diámetro de tallo.....	40
4.3.3. Número y área foliar de hojas	40
4.3.4. Fluorescencia de la clorofila	42
4.3.5. Capacidad fotosintética.....	42
4.3.6. Crecimiento de raíces.....	43
4.3.7. Identificación de especies de HMA nativos	45
4.3.8. Colonización de raíces	45
4.4. DISCUSIÓN	46
4.5. CONCLUSIONES	50
4.7. MATERIAL SUPLEMENTARIO	50
CAPITULO V	51
PERFIL DE EXPRESIÓN DE GENES TRANSPORTADORES INDUCIBLES EN LA SIMBIOSIS DE HMA Y PLÁNTULAS DE COCOTERO	51
5.1. INTRODUCCIÓN	51
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	52
5.2.2. Selección de genes inducibles a la interacción simbiótica	53
5.2.3. Análisis de expresión de genes.....	53
5.2.4. Análisis estadístico	55
5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	55
5.3.1. Perfiles de expresión de los genes <i>HAK</i> , <i>PHT</i> , <i>AMT</i> , <i>LEA</i> y <i>NIP</i> en respuesta a los tratamientos con HMA	55
5.4. CONCLUSIÓN	57
CAPÍTULO VI.....	59
ACLIMATIZACIÓN DE PLÁNTULAS DE COCOTERO CON DIFERENTES MEZCLAS DE SUSTRATO A BASE DE FIBRA DE COCO Y HMA	59
6.1. INTRODUCCIÓN	59
6.2.1. Sitio experimental	60

6.2.2. Material vegetal y biológico	60
6.2.3. Pre aclimatización de plántulas de cocotero	60
6.2.4. Aclimatización de plántulas de cocotero con diferentes mezclas de sustratos a base de fibra de coco y HMA	61
6.2.5. Evaluación del crecimiento y sobrevivencia de las plántulas	61
6.2.6. Análisis estadístico	61
6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	61
6.3.1. Efecto de la pre-aclimatización en la sobrevivencia y crecimiento de plántulas de cocotero.....	62
6.3.2. Efecto de las diferentes mezclas de sustrato de coco en la aclimatización de plántulas de cocotero.....	64
6.4. CONCLUSIÓN	67
CAPITULO VII.....	69
DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	69
7.1. DISCUSIÓN GENERAL	69
7.2. CONCLUSIONES	74
7.3. PERSPECTIVAS.....	74
BIBLIOGRAFÍA.....	75
ANEXOS	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Distribución actual del cultivo de cocotero.....	3
Figura 1.2. Principales países productores de cocotero.....	4
Figura 1.3. Embriogénesis somática secundaria de cocotero a partir de plúmula.	5
Figura 1.4. Tipos de colonización micorrízica. A) Colonización tipo <i>Arum</i> , B) Colonización tipo <i>Paris</i>	9
Figura 1.5. Desarrollo de la simbiosis de micorrízica arbuscular y su regulación molecular.	10
Figura 1.6. Flujos metabólicos en la micorrización arbuscular.....	11

Figura 2.2. Crecimiento radicular de plántulas de cocotero micropropagadas despues de 180 días.....	22
--	----

Figura 3.1. Plántulas utilizadas en los ensayos de aclimatación.....	24
Figura 3.2. Supervivencia de plántulas de cocotero micropropagadas de cuatro y nueve meses de edad en cultivo in vitro aclimatadas en invernadero.....	27
Figura 3.3. Porcentaje de colonización de hongos micorrízicos en plántulas micropropagadas de cocotero inoculadas con HMA y adaptadas en invernadero durante un periodo de 6 meses.	30
Figura 3.4. Representación de estructuras micorrízicas encontradas en los diferentes tratamientos.....	31

Figura 4.1. Supervivencia de plántulas de cocotero durante 180 días inoculadas con HMA.	39
Figura 4.2. Parámetros de crecimiento en plántulas micropropagadas de cocotero durante la aclimatización, bajo tres tratamientos diferentes (HMA comercial, HMA nativo, control sin HMA).....	41
Figura 4.3. Crecimiento de plántulas de cocotero inoculadas con HMA 360 después del inicio de la aclimatización	42
Figura 4.4. Parámetros fotosintéticos de plántulas de cocotero inoculadas con HMA..	43
Figura 4.5. Parámetros de crecimiento de raíces de plántulas micropropagadas inoculadas con diferentes tratamientos de HMA.	44
Figura 4. 6. HMA nativos de la rizosfera de cocotero.	45

Figura 5.1. Perfil de expresión de los genes asociados a transporte de nutrientes.	56
--	----

Figura 6.1. Sobrevivencia de plántulas después de 6 meses del trasplante. Cada línea representa la media de 20 plantas por tratamiento.	62
---	----

Figura 6.2. Plántulas de cocotero con raíces.....	63
Figura 6.3. Evaluación de parámetros de crecimiento de las plántulas después de 180 días de trasplante.	64
Figura 6.4. Supervivencia de plántulas de cocotero aclimatizadas en invernadero con diferentes mezclas de sustratos.....	65
Figura 6.5. Parámetros de crecimiento de las plántulas después de 6 meses de aclimatación..	66

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. 1. Estrategias para mejorar la eficiencia de aclimatización de plántulas de cocotero.....	7
Cuadro 2.1. Componentes del medio de cultivo Y3.....	19
Cuadro 2. 2. Perfil de crecimiento de raíces en plántulas de cocotero pre-tratadas con NAA y SNP.	22
Cuadro 3.1. Parámetros de crecimiento de plántulas de cocotero micropropagadas de cuatro y nueve meses después de un periodo de 180 días en invernadero.	28
Cuadro 3.2. Parámetros fisiológicos de plántulas de cocotero micropropagadas aclimatadas en invernadero.	29
Cuadro 3.3. Colonización por estructura de plantas micropropagadas de cocotero adaptadas en invernadero.	31
Cuadro 5.1. Oligonucleótidos específicos de genes utilizados en el análisis de expresión de genes.	54
Cuadro 5.2. Programas de amplificación de genes.	54

RESUMEN

El cocotero es un cultivo de importancia económica que recientemente se está propagando por cultivo *in vitro*. Sin embargo, durante la aclimatización, algunas plántulas no sobreviven. Existen reportes que demuestran que la aplicación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) mejoran el desarrollo de las plantas. Hasta el momento no hay reportes de aclimatización de plántulas de cocotero con HMA. Por lo tanto, este estudio reporta la evaluación de la sobrevivencia y el crecimiento de plántulas de cocotero (*Cocos nucifera* L.) obtenidas por embriogénesis somática e inoculadas con HMA nativos o comerciales durante la etapa de aclimatización. Después de 180 días, la sobrevivencia aumentó de 1.19 a 1.24 veces con HMA nativos, pero no se produjo ningún aumento con los HMA comerciales. Se evaluaron parámetros de crecimiento y fotosintéticos y no hubo cambios significativos entre tratamientos. Sin embargo, seis meses después hubo un aumento significativo en la altura, el área foliar y el diámetro del tallo en las plántulas inoculadas con HMA comercial. Hubo diferencias en el desarrollo de raíces secundarias cuando las plántulas fueron tratadas con HMA comercial. La colonización con HMA nativos mostró una mayor proporción de coils e hifas, mientras que, con los HMA comerciales los arbusculos e hifas fueron más abundantes. Estos resultados fueron consistentes con el perfil de expresión de los genes *NIP*, *LEA*, *PHT*, *AMT*, *HAK*, donde se reportó un alto nivel de expresión en los primeros días de evaluación. Según nuestros resultados, se puede recomendar la inoculación de HMA para mejorar la sobrevivencia y el crecimiento de las plántulas de cocotero micropropagadas.

ABSTRACT

Coconut is a crop of economic importance, which is recently being propagated by *in vitro* culture. However, during acclimatization, some micropropagated plants or plantlets do not survive. There are reports that show that the application of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) improves the development of plants. So far there are no reports of acclimatization of coconut plantlets with or without AMF. Therefore, this study reports the evaluation of survival and growth during acclimatization of coconut plantlets *Cocos nucifera* L. (obtained by somatic embryogenesis) testing inoculation with native or commercial AMF. After 180 days, survival increased from 1.19-1.24-fold with native AMF, but no increase occurred with commercial AMF. Growth and photosynthetic parameters were evaluated and there were no significant changes among treatments. However, six months later there was a significant increase in height, leaf area, and stem diameter in plantlets inoculated with commercial AMF. There were differences in the development of secondary roots when plantlets were treated with commercial AMF. The colonization with native AMF showed a greater proportion of coils and hyphae, whereas, with commercial AMF, arbuscules and hyphae were more abundant. These results were consistent with the expression profile of the NIP, LEA, PHT, AMT, and HAK genes, where a high level of expression was reported in the first days and very low at the end of the evaluation period. According to our results, AMF inoculation can be recommended to improve the survival and growth of micropropagated coconut plantlets.

INTRODUCCIÓN

El cocotero (*Cocos nucifera* L.) es un cultivo importante económicamente, debido a la creciente demanda de sus productos de alto valor, como agua envasada, leche, aceite virgen, copra, coco fresco o desecado y productos derivados de sus fibras (Sáenz-Carbonell *et al.*, 2018). Sin embargo, las plagas y enfermedades, como el amarillamiento letal (ALC), y la senescencia de las plantas ha llevado a una disminución de la productividad (Samosir y Adkins, 2014). Además, la propagación por semilla es lenta, y hay pocas variedades resistentes, lo que dificulta la replantación en áreas afectadas por el ALC (Zizumbo-Villarreal *et al.*, 2006). Por lo tanto, es necesario establecer protocolos de multiplicación masiva, como el cultivo *in vitro*. En el CICY han desarrollado un protocolo de propagación vía embriogénesis somática reproducible y altamente eficiente en proceso de escalamiento (Sáenz-Carbonell *et al.*, 2016). Sin embargo, se requieren más estudios en la etapa de aclimatización de las plántulas, lo que puede ser una limitante para el éxito del protocolo generado (Sáenz-Carbonell *et al.*, 2018). Aunque la tasa de sobrevivencia *ex vitro* es de aproximadamente el 80 % en los primeros meses de aclimatización, desde un punto de vista comercial, se busca una tasa cercana al 100 %. Mejorar el proceso en un 10-20 % tendría una ventaja socioeconómica significativa. Una alternativa para mejorar la sobrevivencia y el desempeño de las plántulas *ex vitro* es la aplicación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA), debido su eficiencia en mejorar el desarrollo radicular, la protección contra patógenos y la absorción de nutrientes (Berruti *et al.*, 2016). En este estudio, se aislaron HMA de la rizosfera de cocotero, se propagaron y se utilizaron como fuente de inóculo mixto en la aclimatización de plántulas de cocotero, en comparación con un inóculo comercial. Se evaluó el efecto de los HMA en términos de sobrevivencia, parámetros de crecimiento, parámetros fisiológicos, colonización y expresión de genes transportadores de nutrientes inducibles en la interacción con los HMA. También se evaluó un sistema de pre-aclimatización en plántulas de cocotero utilizando diferentes mezclas de sustratos a base de fibra de coco y HMA.

CAPITULO I

ANTECEDENTES

1.1. Origen, distribución e importancia económica del cocotero.

El cocotero es originario del Pacífico e Indo-Atlántico y forma parte de los ecosistemas costeros en todo el mundo (Gunn *et al.*, 2011). Se cultiva en más de 90 países de América, África, Asia y el Pacífico (Pham, 2016). La distribución de las plantaciones de cocotero hasta 2021, se muestra en la Figura 1.1 (FAOSTAT, 2021).

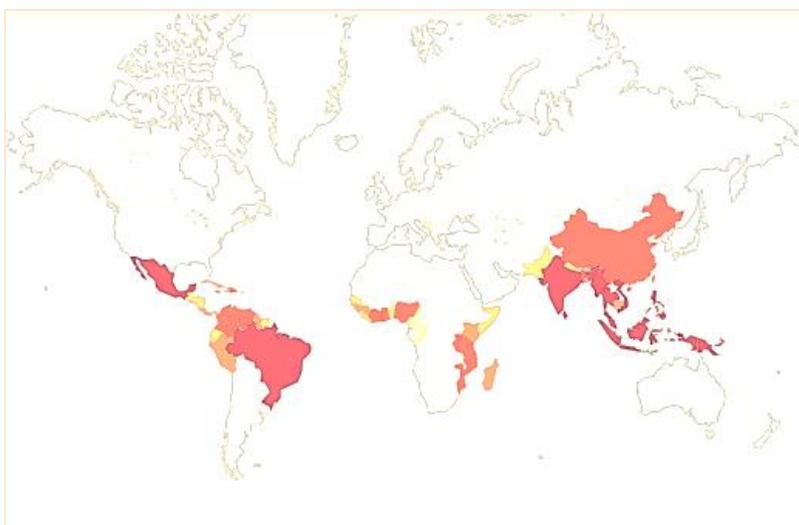


Figura 1.1. Distribución actual del cultivo de cocotero.

La producción mundial del cocotero alcanzó 11,575 millones de hectáreas, lo que equivale a una producción de 57.97 millones de toneladas métricas hasta 2020. La Figura 1.2 ilustra los diez principales productores de coco y sus derivados en el mundo, donde Indonesia, Filipinas e India lideran la producción (FAOSTAT, 2021).

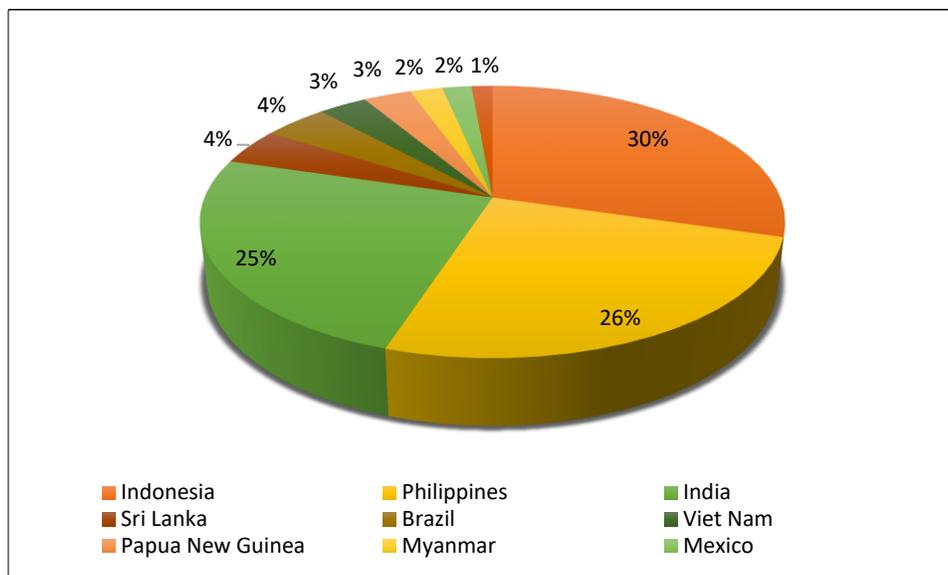


Figura 1.2. Principales países productores de cocotero en el mundo.

El cocotero se considera la sexta especie frutal más cultivada en el mundo y su valor bruto de producción es de 9.7 millones de dólares según datos de la FAOSTAT (2020). Los principales productos comerciales son coco fresco o desecado, agua envasada, azúcar, aceite virgen, copra y productos derivados de sus fibras (Sáenz-Carbonell *et al.*, 2018). México se ubica en el octavo lugar de la producción mundial de cocotero, representando el 1.93 % del total con una producción de 1.12 millones de toneladas métricas. La producción se destina principalmente a la copra y el fruto, lo que equivale a 474 mil 139 toneladas, siendo Guerrero, Jalisco y Sinaloa los principales productores (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2022).

1.2. Problemática del cultivo de cocotero

La productividad del cocotero ha disminuido debido a plantaciones seniles, reducción en la fertilidad del suelo, desastres naturales y, al aumento en la incidencia de plagas y enfermedades (Samosir y Adkins, 2014). Entre las enfermedades, el amarillamiento letal del cocotero (ALC) es la que ha causado mayor daño a las plantaciones (Oropeza *et al.*, 2020). En México, provocó una caída de 60,000 ha en área cultivada y una disminución en la densidad del cultivo de 100 a solo 60 palmas por hectárea (Zizumbo-Villarreal *et al.*, 2006). El control del ALC se lleva a cabo con la identificación temprana de las plantas

infectadas y su eliminación inmediata, seguida de la replantación de especies alternativas o variedades resistentes (Oropeza-Salín *et al.*, 2020).

1.3. Estrategias para la replantación del cocotero

Una de las primeras estrategias fue la selección de ecotipos resistentes al amarillamiento letal, donde destacan el Enano Malayo Amarillo y el Alto del Pacífico Mexicano (MYD, MXPT) (Zizumbo-Villareal *et al.*, 2008). Estas variedades han sido utilizadas en programas de replantación y producción de híbridos (MYD-MXPT; MXPT1-MXPT2). Debido a que la propagación por semilla es lenta, la tecnología de micropropagación se ha establecido como una alternativa eficiente. Para ello, se han utilizado diferentes protocolos y tejidos, siendo la embriogénesis somática, el protocolo más viable para la producción a gran escala (Sáenz-Carbonell *et al.*, 2016; Kalaipandian *et al.*, 2021).

1.4. Micropropagación de cocotero mediante embriogénesis somática

El proceso de embriogénesis somática del cocotero implica varios pasos, comenzando con la inducción del callo embriogénico, la formación y el desarrollo del embrión somático, su maduración, la germinación y el desarrollo de la plántula (Sáenz *et al.*, 2018). Aunque la micropropagación mediante embriogénesis somática está disponible, el protocolo ha mejorado significativamente para producir plántulas de alta calidad utilizando embriones somáticos como explantes, proceso conocido como embriogénesis somática secundaria (Figura 1.3).

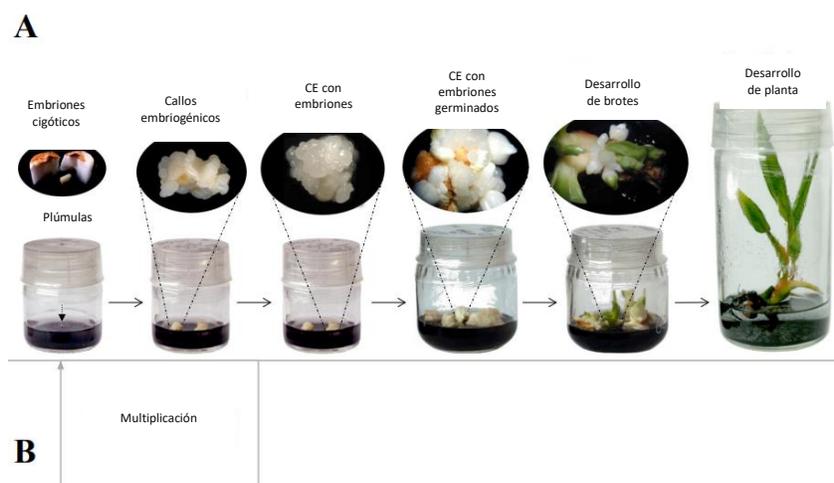


Figura 1.3. Embriogénesis somática secundaria de cocotero a partir de plúmula.

1.4.1. Aclimatización de plántulas de cocotero

La última fase del proceso de micropropagación implica la aclimatización de las plántulas, el éxito se logra cuando se trasplantan la mayor cantidad posible de plántulas al campo (Chandra *et al.*, 2010). Algunos estudios donde proponen sistemas para mejorar la eficiencia de la aclimatización se describen en el Cuadro 1.1.

1.4.2. Retos en la aclimatización de las plántulas

El Cuadro 1.1 muestra que uno de los desafíos en la micropropagación es la aclimatización de las plántulas antes de su siembra en campo. Aunque la tasa de sobrevivencia *ex vitro* es de aproximadamente el 80 % en los primeros meses de aclimatización, desde un punto de vista comercial se busca una tasa cercana al 100 %. Mejorar el proceso en un 10-20 % tendría una ventaja socioeconómica significativa. De acuerdo con diferentes sistemas de micropropagación, algunos factores que pueden influir en la pérdida de plántulas están relacionados con el desarrollo de las plantas, factores bióticos y abióticos. Las plantas micropropagadas son particularmente susceptibles a varios tipos de estrés debido a que aún no han desarrollado patrones adecuados de asignación de recursos ni las características morfológicas y fisiológicas necesarias para sobrevivir al nuevo entorno (Chandra *et al.*, 2010; Kumar y Rao., 2012), entonces, durante la aclimatización, las plantas terminan su desarrollo, una forma de acelerar y mejorar el desarrollo de las plantas e incrementar la sobrevivencia, es a través de la aplicación de microorganismos benéficos durante esta etapa, entre ellos destacan los HMA, diferentes estudios demuestran que la inoculación de los HMA en plantas micropropagadas mejora notablemente su estado fisiológico, morfología, estado nutricional, sistema radicular y protección contra patógenos (Chandra *et al.*, 2008).

Cuadro 1.1. Estrategias para mejorar la eficiencia de aclimatización de plántulas de cocotero.

Variedad	Protocolo <i>in vitro</i>	Sobrevivencia (%)		Estrategia	Referencia
		Previa	Posterior		
Enano malayo amarillo	Embriogénesis cigótica	40	82	1) Cultivo <i>in vitro</i> de cocotero en condiciones de invernadero con luz natural, 2) Cultivo <i>in vitro</i> bajo condiciones controladas de cuarto de cultivo, 3) Cámara de cultivo <i>in vitro</i> en invernadero	Talavera <i>et al.</i> , 2005
Enano verde malayo	Embriogénesis cigótica	50	81	Adición de sacarosa exógena al medio de cultivo a una concentración de 45 g L ⁻¹ .	Fuentes <i>et al.</i> 2005
Enano verde local	Embriogénesis cigótica		80	Adición de ácido giberélico en medio semisólido.	Pech-Aké, 2007
Enano verde local	Embriogénesis cigótica	10 a 40	80-90	Enriquecimiento de CO ₂ <i>in vitro</i> durante la fase de luz y oscuridad.	Samosir y Adkins, 2014
Enano marrón Kopyor	Embriogénesis cigótica	< 30	80-90	Adaptación de un sistema de enraizamiento <i>ex vitro</i> y adición de IBA al medio de cultivo.	Sisunandar <i>et al.</i> , 2018
Alto del Pacífico Mexicano (híbrido)	Embriogénesis somática		80	Implementación de diferentes estrategias, cubierta de bolsa, adición de glucosa y ácido giberélico	Oropeza, CICY (No publicado)

1.5. Hongos micorrízicos arbusculares y su interacción con las plantas

Los HMA constituyen un grupo de microorganismos biotrofos obligados de la raíz que intercambian beneficios mutuos con más del 80% de las plantas. Se consideran biofertilizantes naturales, ya que proporcionan al huésped agua, nutrientes y protección contra patógenos, a cambio de productos fotosintéticos (Berruti *et al.*, 2016). El proceso de interacción con las plantas consta de tres fases: asimbiótica, presimbiótica y simbiótica (Souza, 2015). Durante la fase asimbiótica, las esporas empiezan un proceso de germinación, en la fase presimbiótica, las hifas comienzan a explorar el suelo en busca de una planta huésped. Una vez que las hifas encuentran una raíz del sistema radicular de la planta, se produce la interacción dentro de las células epidérmicas de la raíz, donde las puntas de las hifas se diferencian para formar los apresorios que actúan como puntos de entrada a la raíz, dando inicio a la fase simbiótica (Luginbuehl *et al.*, 2017).

Después de que las hifas penetran a la raíz, las células del apresorio se diferencian en dos fases distintas: una fase extrarradical caracterizada por el crecimiento de las hifas en el suelo, y una fase intrarradical caracterizada por la ramificación en la corteza exterior (Brundrett *et al.*, 1985). En la primera fase, las hifas se dividen morfológicamente en dos tipos: hifas corredoras, que transportan activamente nutrientes y propagan la red de hifas a través de la región rizosférica para extender la asociación con plantas cercanas, e hifas ramificadas, que desempeñan un papel importante en la absorción de nutrientes del suelo (Luginbuehl *et al.*, 2017).

De acuerdo con la distribución de las estructuras fúngicas en las raíces (arbúsculos o coils), se pueden distinguir principalmente dos patrones de colonización micorrízica, el tipo *Arum* y el tipo *Paris* (Figura 1.4) (Brundrett *et al.*, 1996).

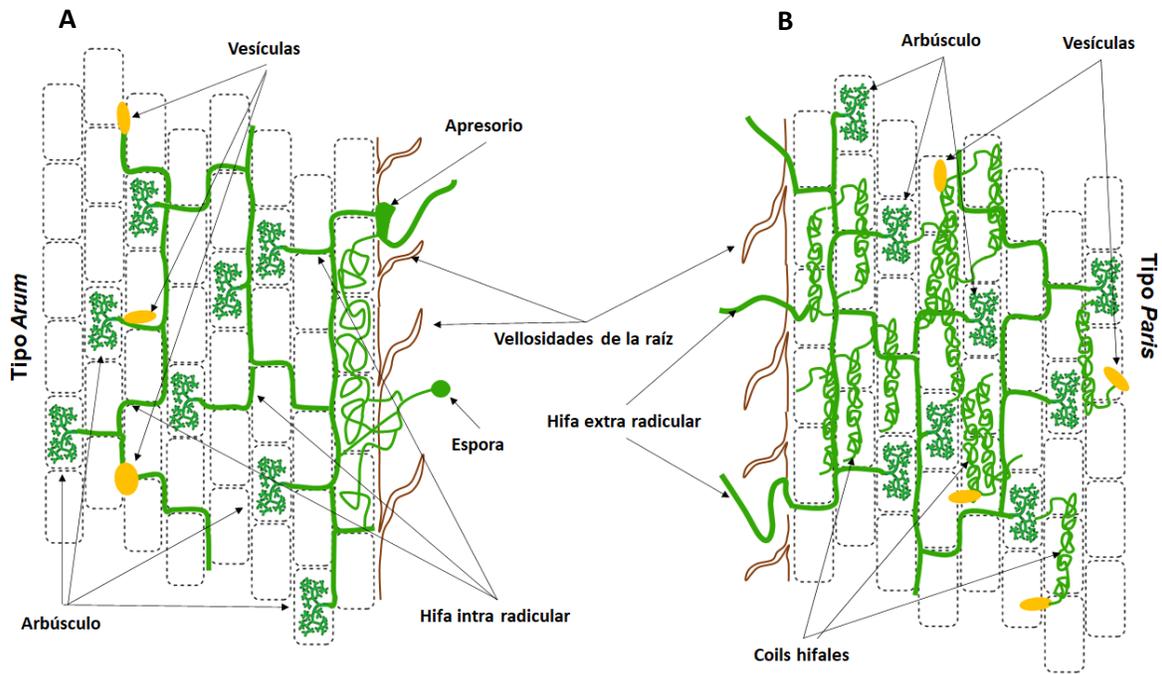


Figura 1.4. Tipos de colonización micorrízica. A) Colonización tipo *Arum*, B) Colonización tipo *Paris*.

En la colonización tipo *Paris*, las hifas de los hongos se enrollan en forma de coils dentro de las células de la raíz. En cambio, en la colonización tipo *Arum*, las hifas forman colonias que se expanden a lo largo de los canales de aire entre las células de la corteza de la raíz, principalmente por crecimiento lineal de las hifas dando lugar a los arbuscúlos. Existe también un tipo de colonización intermedia en el que están presentes ambas estructuras (Dickison, 2000). Es importante destacar que la morfología de la colonización depende de la combinación de las especies de plantas y hongos, y no es necesariamente consistente dentro de los géneros de plantas o HMA. Sin embargo, se ha observado una tendencia en la que una determinada especie de planta favorece una morfología de colonización específica (Feddermman *et al.*, 2010). Los arbuscúlos son la estructura más importante en la interacción con las plantas, ya que su principal función es proporcionar los nutrientes necesarios para un mejor desarrollo de la planta, en ausencia de estas estructuras se ha propuesto que los coils pueden cumplir esta función (Jakobsen *et al.*, 2003).

A pesar de la importancia de la asociación simbiótica entre las plantas y los HMA, todavía no se comprende completamente cómo las plantas reciben y perciben las señales de los HMA e interaccionan con ellos.

1.5.1. Señalización molecular en la simbiosis arbuscular

La interacción simbiótica entre la planta y el hongo está regulada de manera rigurosa por ambas partes, en diversos niveles, celular, molecular y genético, y está altamente influenciada por factores biológicos y ambientales (Ho-Plágaro y García-Garrido, 2022).

Durante la etapa presimbiótica, se produce una comunicación molecular cruzada entre la planta y el hongo, donde la planta secreta exudados de estrigolactonas para inducir la germinación de esporas fúngicas (Parniske, 2008; Bonfante y Genre, 2010). Después del reconocimiento, se establece un contacto físico mediante la formación de un hifopodio, una estructura especializada de hifa a menudo ramificada e hinchada, en la superficie de la raíz (Bonfante y Genre, 2010). Las raíces laterales (secundarias) de la planta son los sitios donde se forma el hifopodio, y este se adhiere firmemente a las células epidérmicas (Brundrett, 1996). Posteriormente, se produce un reordenamiento del citoplasma en las células epidérmicas para permitir la penetración de las hifas (Parniske *et al.*, 2008). A partir de aquí, los HMA invaden las células corticales a través de un aparato de prepenetración (PPA). Las hifas ramificadas desarrollan los arbuscúlos en las células corticales internas, donde se produce el intercambio de nutrientes (Parniske *et al.*, 2008; Ho-Plágaro) (Figura 1.5).

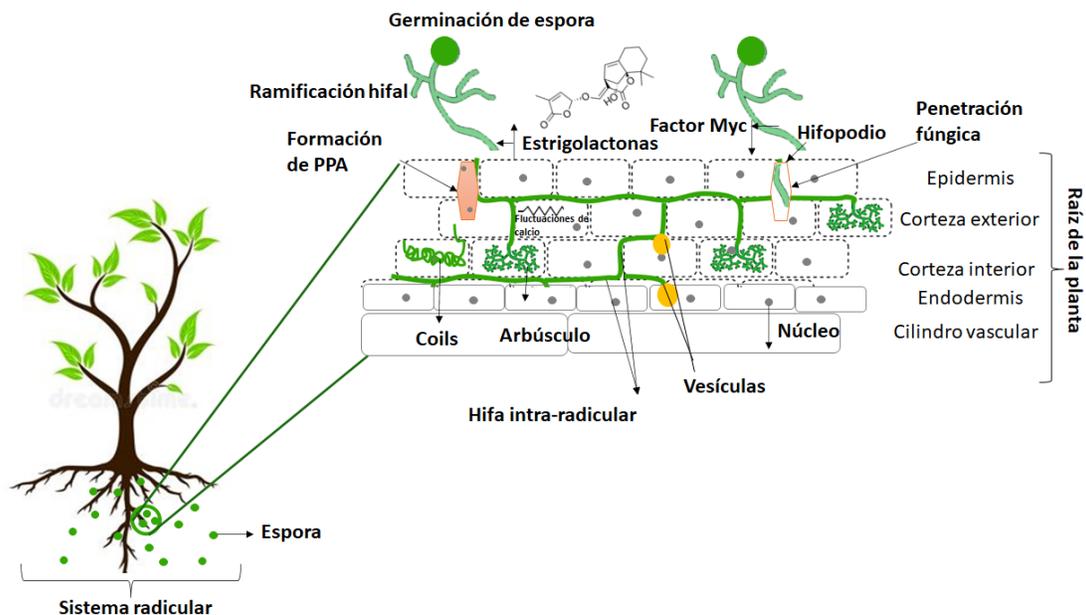


Figura 1.5. Desarrollo de la simbiosis de micorrízica arbuscular y su regulación molecular.

1.5.2. Metabolismo en la interfaz simbiótica arbuscular

Una vez que la simbiosis se ha establecido se genera una interfaz simbiótica, donde se lleva a cabo el intercambio de nutrientes entre la planta y el hongo (Brundrett *et al.*, 1996). La planta transporta el carbono a través de la membrana plasmática y la membrana periarbuscular vegetal (PAM) en la interfaz simbiótica. El carbono se libera primero en el espacio periarbuscular (PAS) en forma de sacarosa, luego se divide en hexosas y es absorbido por los hongos a través de la membrana plasmática. Dentro del citoplasma fúngico, las hexosas se convierten en gránulos de glucógeno y gotas de lípidos de triacilglicerol (TAG), que son transportados a larga distancia por medio de la red hifal.

Por su parte, los hongos adquieren los nutrientes del suelo al atravesar su membrana plasmática y los transportan a través de las hifas intrarradicales (IRH), arbusculos, hasta alcanzar el citoplasma de la planta. Principalmente, los hongos transportan fosfato y nitrógeno, aunque también hay evidencia de la transferencia de azufre, potasio y agua (Lanfranco *et al.*, 2018) (Figura 1.6).

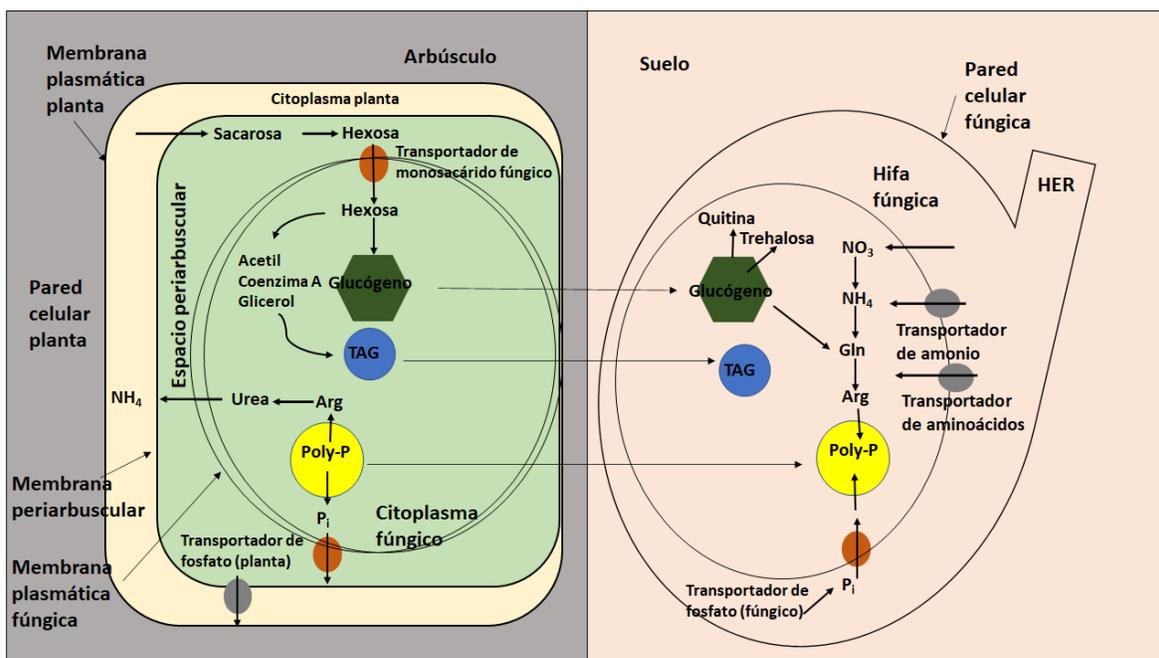


Figura 1.6. Flujos metabólicos en la micorrización arbuscular.

Este proceso da lugar a adaptaciones específicas a las condiciones ambientales sin comprometer el desarrollo y desempeño de las plantas. Algunos de los mecanismos

modificados o influenciados por la colonización de hongos micorrízicos ya se han estudiado en *Solanum lycopersicum*, *Lotus japonicus*, *Solanum tuberosum*, *Glycine max*, *Medicago truncatula*, *Helianthus annuus* y *Oryza sativa*. Estos modelos de estudio permiten elucidar que las variaciones fisiológicas están vinculadas a la activación o represión de diferentes genes, principalmente aquellos involucrados en la simbiosis arbuscular, por ejemplo, genes transportadores involucrados en la absorción de nutrientes (Anexo 1) (Sawers *et al.*, 2008; Courty *et al.*, 2016).

1.6. Hongos micorrízicos arbusculares en sistemas de micropropagación

El uso de HMA puede mejorar la calidad biológica de las plantas micropropagadas, ya que influye en su nutrición, desarrollo y sobrevivencia de manera directa o indirecta (Kapoor *et al.*, 2008). Los HMA se han inoculado indistintamente en plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, al parecer el grado de colonización es mayor en plantas dicotiledóneas (Anexo 2). Esta diferencia se puede explicar por la presencia de un aerénquima más extenso en las raíces gruesas de algunas monocotiledóneas, lo que les permite transportar oxígeno con mayor eficacia que las dicotiledóneas y explotar un mayor volumen del suelo (Cornwell *et al.*, 2001). En cuanto a la fuente de inoculación, algunos autores sugieren que el uso de especies exóticas de HMA puede alterar las comunidades nativas, mientras que el uso de HMA nativos tiene menos consecuencias ecológicas negativas, ya que están mejor adaptados a las condiciones edafoclimáticas del área favoreciendo el éxito de la simbiosis, el desarrollo de las plantas y la conservación de las comunidades nativas de HMA (Harikumar, 2013; Eman, 2016; Torres-Arias *et al.*, 2017). Adicionalmente, el uso de mezclas de HMA puede favorecer de mejor manera a las plantas, debido a que se puede generar una complementariedad funcional con cada una de las especies integradas (Crossay *et al.*, 2019).

1.7. Hongos micorrízicos arbusculares y su interacción en el cultivo de cocotero

Existen reportes de interacciones micorrízicas con plantas de cocotero propagadas por semilla, con la finalidad de conocer la diversidad micorrízica en las plantaciones (Karunasinghe *et al.*, 2009; Ambili *et al.*, 2012a; Rajeshkumar *et al.*, 2015; Nivedha *et al.*, 2019), encontrando una gran diversidad de especies que no se habían descrito en otros estudios y con un alto nivel de colonización, sugiriendo que la colonización por HMA está influenciada por los niveles de nutrientes en el suelo y el tipo de fertilizante aplicado a las

palmas. En otro estudio se encontró que las bacterias asociadas a las esporas tienen un efecto benéfico en el crecimiento y productividad de las plantas cuando se usan como co-inoculantes (Ambili *et al.*, 2012b). También se han realizado estudios sobre comunidades micorrízicas nativas en suelos de duna costera de Yucatán, México, con resultados prometedores como fuente de inóculo para las plantas (Ek-Chim, 2019). Un estudio reciente sobre comunidades de HMA en la rizosfera de cocotero en la Península de Yucatán, en las estaciones lluviosa y seca, identificaron diferentes especies con especial interés en *Septoglomus constrictum* y *Sclerocystis sinuosa* que podrían considerarse especies con potencial biotecnológico (Lara-Pérez *et al.*, 2020). Aunque la evidencia en el uso de HMA como inoculante en plantas de cocotero es limitada, Senarathne y Ilangamudali (2018) realizaron un estudio en vivero y campo, utilizando plantas de semilla donde inocularon un producto comercial de HMA mezclado con fertilizante y midieron su efecto en el crecimiento de las plantas, sus resultados mostraron que después de siete meses del trasplante, hubo un efecto significativo en el desarrollo radicular, circunferencia de tallo y área foliar.

JUSTIFICACIÓN

El cocotero es un cultivo de gran importancia económica en América Latina y el Caribe. Sin embargo, la productividad de las plantaciones ha disminuido severamente debido a la senilidad de las plantas y al aumento en la incidencia de plagas y enfermedades. Por lo tanto, es necesario realizar una replantación masiva del cultivo. Debido a que la propagación por semilla es un proceso muy lento y poco factible, en la actualidad una de las alternativas es el cultivo *in vitro*. El Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) ha desarrollado un protocolo de micropropagación en etapa semi-comercial a partir de diferentes explantes, teniendo mayor éxito en el uso de la plúmula a través de embriogénesis somática. Si bien es un proceso que sigue en continua mejora, las primeras etapas de inducción y desarrollo del proceso embriogénico ya se han estudiado a profundidad. Sin embargo, la etapa de aclimatización de las plantas requiere de más estudios. Durante esta etapa, las plantas cultivadas *in vitro* sufren diferentes tipos de estrés durante el trasplante y, en consecuencia, la tasa de sobrevivencia se ve afectada. A pesar de ello, se ha logrado una tasa de sobrevivencia alrededor del 80 %. Incrementar este valor sería benéfico en términos económicos y comerciales. El uso de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA), es una opción para mejorar la sobrevivencia. La incorporación de HMA en la etapa de aclimatización representa una solución biológica para mejorar el desarrollo radicular, la capacidad fotosintética, la asimilación nutricional, la protección contra patógenos, y la reducción del estrés biótico y abiótico. Los HMA pueden ser una herramienta adecuada para facilitar la adaptación de las plántulas a condiciones de campo. De hecho, las especies de HMA nativas representan una opción aún más viable en términos de mejor adaptabilidad al momento de su transferencia. En la presente investigación, se evaluó la capacidad de respuesta de plántulas de cocotero a la inoculación de HMA en la etapa de aclimatización en términos de sobrevivencia, parámetros fisiológicos y de crecimiento, así como el perfil de expresión de genes involucrados en la absorción de amonio, potasio, fosfato y transporte de agua (acuaporinas y deshidrinas).

HIPÓTESIS

La tasa de sobrevivencia de las plántulas micropropagadas de cocotero mejorará con los tratamientos de inoculación con HMA.

El crecimiento y desarrollo fisiológico de las plántulas micropropagadas de cocotero mejorará con los tratamientos de inoculación con HMA.

Los genes *AMT*, *HAK*, *PHT*, *PIP* y *LEA* modificarán su perfil de expresión en respuesta a los tratamientos de inoculación con HMA.

OBJETIVO GENERAL

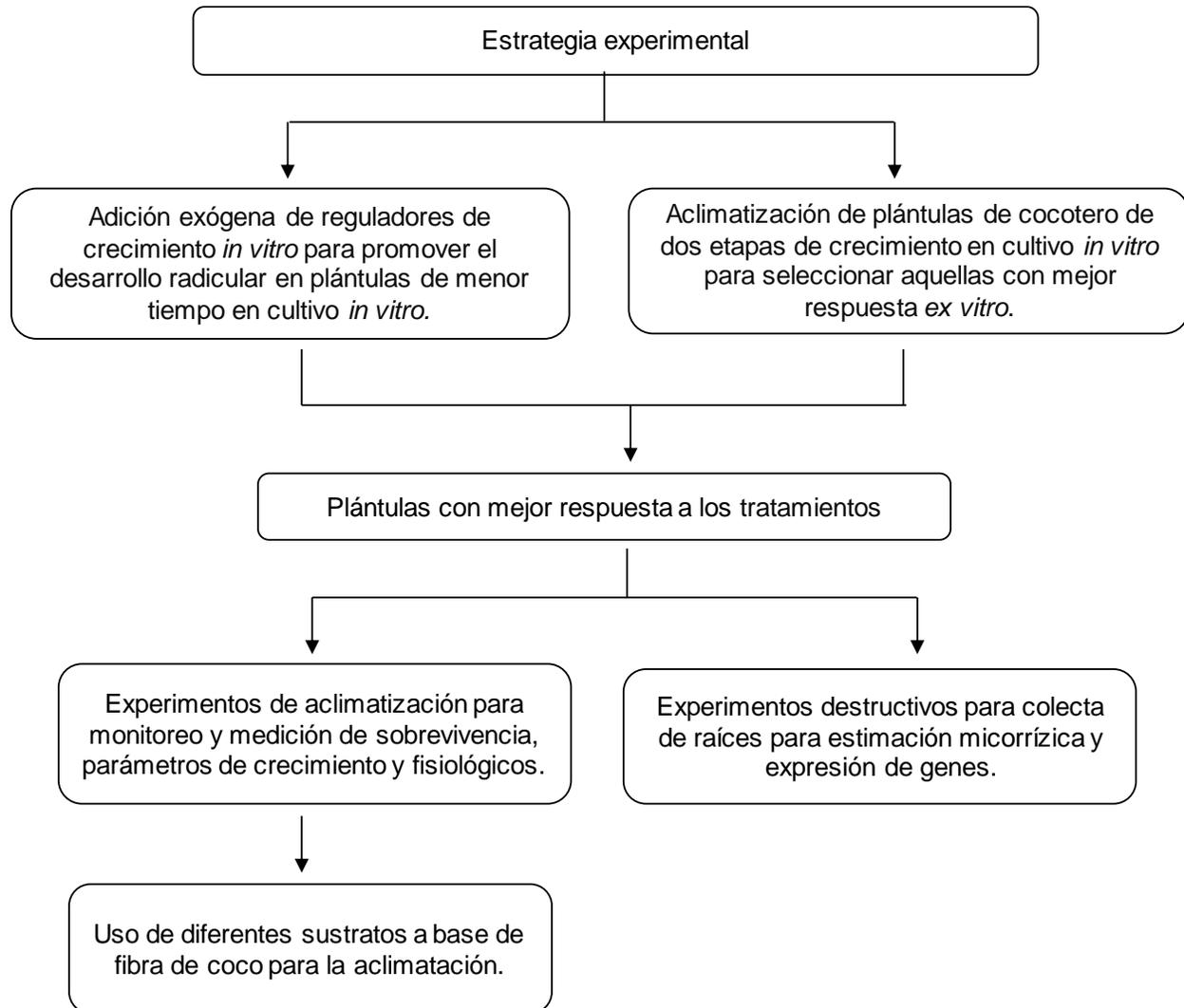
Evaluar el efecto de la inoculación de HMA nativos y comerciales en la sobrevivencia, desarrollo fisiológico y perfil de expresión de genes transportadores de nutrientes en plántulas de cocotero micropropagadas durante su aclimatización.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Identificar morfológicamente los inóculos de HMA empleados en la aclimatización de plántulas de cocotero, así como determinar el número de esporas y el porcentaje de colonización micorrízica.
- ii. Establecer un sistema de aclimatización utilizando HMA en plántulas de cocotero micropropagadas bajo condiciones de invernadero.
- iii. Determinar la sobrevivencia, crecimiento y desarrollo fisiológico de plántulas de cocotero inoculadas con HMA.
- iv. Evaluar la expresión de los genes *AMT*, *HAK*, *PHT*, *PIP* y *LEA* en respuesta a los tratamientos de inoculación con HMA.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El trabajo experimental se dividió en cinco etapas, las cuales se describen a continuación.



CAPITULO II

EFFECTO DE LA ADICIÓN EXÓGENA DE REGULADORES DE CRECIMIENTO *IN VITRO* EN PLÁNTULAS DE COCOTERO

2.1. INTRODUCCIÓN

La adición de reguladores de crecimiento es una práctica habitual en el cultivo *in vitro* de plantas (Gaspar *et al.*, 1996). Particularmente, en el cultivo *in vitro* de cocotero, se han utilizado diversos reguladores de crecimiento, como los brasinoesteroides, ácido gibérelico, 2,4-D, 6-BAP, poliaminas y ácido abscísico (Sáenz *et al.*, 2018). Sin embargo, hasta ahora no se han utilizado, para mejorar el desarrollo radicular de las plántulas. La iniciación de las raíces *in vitro* es muy importante en cualquier protocolo de micropropagación (Bandupriya *et al.*, 2016), ya que contribuye directamente en la sobrevivencia *ex vitro* de las plántulas. Una forma de mejorar el desarrollo radicular es la manipulación del medio de cultivo y sus componentes (Phillips y Garda, 2019). Por ejemplo, el papel de las auxinas en el desarrollo de raíces es un hecho conocido (Bandupriya *et al.*, 2016). El ácido α -naftalenoacético (NAA) es una de las auxinas más utilizadas en los cultivos de enraizamiento (Phillips y Garda, 2019). Según estudios previos, se ha encontrado que la adición de NAA en concentraciones de 100-300 μM estimula la elongación de raíces primarias de cocotero y la producción de raíces adventicias a 200 μM (Ashburner *et al.*, 1993). Vidhanaarachchi *et al.* (2016) observaron que la adición de NAA a 200 μM , favorece el crecimiento de raíces primarias de plántulas micropropagadas de cocotero del cultivar "Sri Lanka Red Dwarf".

Estudios recientes han demostrado que el nitroprusiato de sodio (SNP), donador de óxido nítrico también tiene efectos positivos en la organogénesis de raíces (Pagnussat *et al.*, 2002). Se ha demostrado que la acumulación de NO en las raíces media la formación de raíces laterales (secundarias) y el crecimiento de raíces adventicias en plantas de tomate (Correa-Aragunde *et al.*, 2004). En un estudio realizado por Pandey *et al.* (2020), se encontró que la suplementación del medio de cultivo con agua de coco (10 %) y SNP (15 μM) fue suficiente para producir un enraizamiento profuso en las plantas regeneradas *in vitro* de *Valeriana jatamansi*.

A pesar de que se ha estudiado el efecto del SNP sobre el desarrollo radicular en diferentes plantas no se han realizado estudios previos en cocotero y no hay suficiente información sobre los efectos de NAA en el desarrollo radicular de plántulas de cocotero micropropagadas. Por lo

anterior, el objetivo de esta investigación fue determinar la relación en la adición de NAA y SNP simple o en combinación, en el crecimiento de raíces primarias y secundarias de plántulas de cocotero micropropagadas.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Sitio experimental

Los experimentos se llevaron a cabo en el laboratorio de cocotero del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. durante el periodo comprendido de abril-noviembre 2021. La temperatura promedio del cuarto de cultivo fue de $27 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ y la humedad relativa fue 65-75 % con fotoperiodo de 16 h ($45\text{-}60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ PPF).

2.2.2. Material vegetal

Se utilizaron plántulas en desarrollo de la variedad Alto del Pacífico Mexicano, las cuales se seleccionaron considerando al menos una raíz primaria inicial y 1-2 hojas bífidias.

2.2.3. Preparación de medios de cultivo

Se utilizó medio Y3 como base para la integración de SNP y NAA, el medio se suplementó con 2.5 gL^{-1} de carbón activado y 5 % p/v de sacarosa (Cuadro 2.1). El pH se ajustó a 5.4, previo a la adición de sacarosa y carbón activado. Se utilizaron plántulas que previamente estaban en medio Y3 con gelrite, las cuales se subcultivaron en medio Y3 líquido (control), la aplicación exógena de los reguladores de crecimiento fue simple o en combinación, para ello, se adicionó NAA y SNP a 1 y $10 \mu\text{M}$, respectivamente al medio Y3, durante tres días como pretratamiento. Trascurrido el tiempo, las plantas se transfirieron a medio Y3 y se colocaron en el cuarto de cultivo, durante un periodo de seis meses. El NAA se esterilizó por filtración en una membrana PVDF ($0.22 \mu\text{m}$) y se adicionó al medio de cultivo ya esterilizado. El SNP se adicionó previo a la esterilización del medio de cultivo, las condiciones de esterilización fueron 121°C durante 20 minutos.

Cuadro 2.1. Componentes del medio de cultivo Y3.

Componente	Cantidad (gL⁻¹)
NH ₄ Cl	26.8
KNO ₃	101.2
KCl	149.6
H ₂ NaPO ₄	27.56
H ₃ BO ₃	0.3092
MgSO ₄ · 7H ₂ O	24.8
MnSO ₄	0.848
KI	0.832
CuSO ₄	0.0248
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.72
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.0024
CaCl ₂ ·2H ₂ O	29.4
CoCl ₂	0.024
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.024
C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ ·2H ₂ O	3.724
Fe ₂ SO ₄ ·7H ₂ O	1.5
Tiamina	0.1012
Piridoxina	0.1028
Ácido nicotínico	0.1
Mioinositol	10
L-Asparagina	8.8
L-Arginina	10
L-Glutamina	10

2.2.4. Evaluación del crecimiento de raíces

Cada 30 días, se monitoreó la formación de raíces primarias y secundarias, y se midió la longitud de raíz primaria. Se registró la presencia de raíces terciarias en su caso.

2.2.5. Diseño experimental

Se establecieron cinco tratamientos con cinco réplicas biológicas y tres repeticiones por pretratamiento, es decir 15 plántulas por cada pretratamiento. Los pretratamientos se describen a continuación:

T1: Control negativo (Medio Y3)

T2: Control con transferencia (Medio Y3)

T3: Medio Y3 + SNP (10 μ M)

T4: Medio Y3 + NAA (1 μ M)

T5: Medio Y3 + SNP (10 μ M) + NAA (1 μ M)

Como variables de respuesta se midió el desarrollo radicular de las plántulas con monitoreo mensual, durante un periodo de evaluación de seis meses.

2.2.6. Análisis estadístico

Los datos se analizaron con un análisis de varianza simple y se compararon las medias por una prueba de Dunnett.

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del efecto de la aplicación exógena del SNP y NAA en el desarrollo de raíces se presentan en Cuadro 2.2. Los resultados no mostraron diferencias significativas con la aplicación de los reguladores de crecimiento en el desarrollo de raíces primarias, secundarias y longitud de raíces primarias. Sin embargo, si hubo un incremento en el crecimiento de las raíces a los seis meses de evaluación en cultivo *in vitro* con respecto a los valores iniciales (Figura 2.2).

2.3.1. Formación de raíces primarias

Las plantas iniciaron con 2 ± 1 raíces primarias, durante los primeros 60 días no hubo cambios, a partir del día 90, incrementó en al menos una raíz primaria en todos los tratamientos y se mantuvo sin mayores cambios hasta el final del periodo. Es posible que los reguladores no tengan efecto sobre la formación de raíces primarias, debido a que es más común que estos reguladores se asocien con raíces adventicias (Correa-Aragunde *et al.*, 2004; Rout, 2006). Sin embargo, esperábamos observar algún cambio en el crecimiento, como sucedió en el estudio de Arun *et al.* (2017), donde la adición de SNP a 1.67 μ M promovió el crecimiento de raíces en plantas de crisantemo; en contraste, otros autores afirman que la adición de SNP a 10 μ M tuvo

una mejor respuesta en la formación de raíces adventicias en plantas de pepino (Pagnussat *et al.*, 2002).

2.3.2. Formación de raíces secundarias

Las plántulas no presentaron raíces secundarias al momento del trasplante y continuó así hasta el día 30. A los 60 días hubo diferencias significativas entre los tratamientos en la formación de raíces secundarias, siendo más alto en el tratamiento con NAA (18 ± 4 raíces secundarias). Para el día 90, el incremento fue de 1-10 raíces secundarias en los diferentes tratamientos, periodo donde se observó mayor desarrollo de raíces secundarias. A los 120 días se observó un incremento de 1-2 raíces secundarias, sin embargo, en promedio hubo 17.2 ± 5.0 raíces secundarias, después de este periodo el incremento fue de 3-4 raíces secundarias en cada tratamiento sin cambio significativos al finalizar el tiempo de evaluación con un máximo de 26 ± 6.0 raíces secundarias. A pesar de no haber mayores cambios entre tratamientos, al parecer las raíces secundarias se ven favorecidas por el uso de ambos reguladores, esto podría explicarse considerando que estos reguladores están asociados al desarrollo de raíces laterales o secundarias.

2.3.3. Longitud de raíces primarias

La longitud de raíz primaria al inicio del experimento fue de 1 cm los primeros 30 días de desarrollo. Al día 60 hubo el mayor incremento en la longitud de las raíces primarias de las plántulas, particularmente en aquellas tratadas con los reguladores de crecimiento, sin embargo, a partir de los 90 días, se mantuvo sin mayores cambios, el incremento fue de 1-2 cm en todos los tratamientos.

2.4. CONCLUSIÓN

Las plántulas de cocotero bajo los diferentes tratamientos como promotores de crecimiento no promovieron el desarrollo radicular. Es posible que las concentraciones de cada promotor no sean adecuadas.

Cuadro 2.2. Perfil de crecimiento de raíces en plántulas de cocotero pre-tratadas con NAA y SNP.

Tiempo (días)	Raíces primarias							Raíces secundarias							Longitud de raíz						
	0	30	60	90	120	150	180	0	30	60	90	120	150	180	0	30	60	90	120	150	180
Control negativo	2±1	2±1	2±1	3±1	3±1	3±1	3±1	0±0	0±0	5±3	15±5	16±5	19±7	21±6	1±1	1±1	4±2	4±2	5±2	6±2	5±2
Control con transferencia (Medio Y3)	1±1	1±1	1±1	2±1	2±1	3±1	3±1	0±0	0±0	11±2	16±4	18±6	21±12	24±4	1±1	1±1	3±2	3±2	4±2	7±4	9±6
Medio Y3 + NAA 1 µM	1±1	1±1	2±1	2±1	2±1	3±2	4±2	0±0	0±0	18±4	19±5	18±6	22±12	25±8	1±1	1±1	5±2	6±3	5±1	5±3	6±4
Medio Y3 + SNP (1 µM)	2±1	2±1	2±1	2±1	3±1	3±2	3±1	0±0	0±0	15±6	17±4	18±5	22±8	26±6	1±1	1±1	4±1	4±2	4±2	6±3	6±3
Medio Y3 + SNP + NAA (1 µM)	1±1	1±1	2±1	2±1	3±1	3±1	3±1	0±0	0±0	9±3	16±4	16±3	20±9	24±3	1±1	1±1	4±2	4±2	4±2	4±2	4±2

Los valores expresados son la media de 5 réplicas biológicas con 3 repeticiones \pm D.E.

**Figura 2.1.** Crecimiento radicular de plántulas de cocotero micropropagadas después de 180 días.

CAPITULO III

ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO DE ACLIMATIZACIÓN CON HMA EN PLÁNTULAS DE COCOTERO

3.1. INTRODUCCIÓN

La aclimatación de las plántulas es una etapa previa a la transferencia a campo, durante esta etapa, las plantas terminan su desarrollo (Mahendra *et al.*, 2020). Comúnmente se sugiere que el proceso de aclimatación de plántulas de cocotero se lleve a cabo en invernadero por un periodo corto de tiempo (tres meses), luego, se transfieran a vivero o casa sombra por un periodo de 6 meses y finalmente se siembren en campo (Sáenz-Carbonell *et al.*, 2016). Sin embargo, el tiempo total desde el establecimiento de los explantes hasta la obtención de las plantas es superior a 2 años, sin embargo, sería ideal implementar un protocolo más eficiente en términos de menor tiempo de producción, esto sería una ventaja desde el punto de vista económico (menores gastos de producción y mano de obra). Por ello, se estableció un sistema experimental de aclimatación con plántulas de cocotero de menor crecimiento en cultivo *in vitro* comparado con plántulas más desarrolladas, es decir, aquellas que se consideran listas para su aclimatación. El objetivo fue conocer la capacidad de respuesta a las condiciones *ex vitro* y a la interacción micorrízica con HMA de ambos grupos de plantas. Estudios previos demuestran que el período de aclimatación de las plántulas micropropagadas puede acortarse mediante la aplicación de HMA (Kapoor *et al.*, 2008).

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Material biológico

Se utilizaron plántulas de cocotero de la variedad Alto de Pacífico Mexicano micropropagadas por embriogénesis somática seleccionadas por altura uniforme y número de hojas bífidas de cuatro y nueve meses en cultivo *in vitro* (Figura 3.1), la edad de las plántulas fue aproximada y se estableció a partir del desarrollo de las plántulas y sus posteriores subcultivos.

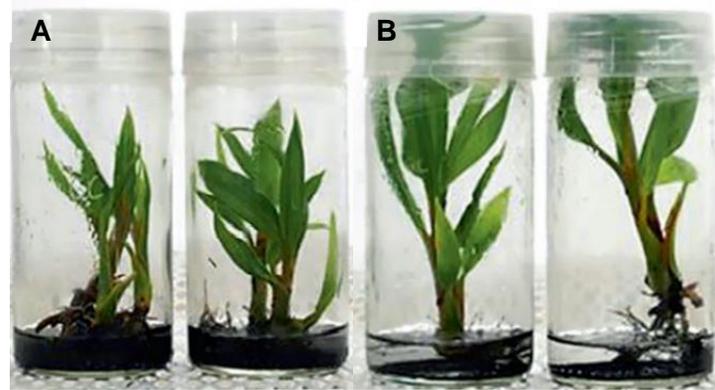


Figura 3.1. Plántulas utilizadas en los ensayos de aclimatación. A) Plántulas de cuatro meses en cultivo *in vitro*, B) Plántulas de nueve meses en cultivo *in vitro*.

Se utilizaron dos inóculos, HMA nativos y HMA comerciales (Endo Rhize Mini Plug®). El inóculo nativo fue aislado de duna costera de Yucatán a partir de la rizosfera de cocotero y propagado por cultivos trampa a partir de semillas de *Panicum maximun* (Ek-Chim, 2019; Lara-Pérez *et al.*, 2020). El inóculo nativo contenía 13 especies (*Dominikia aurea*, *Entrophospora infrequens*, *Glomus* aff. *glomerolatum*, *Claroideoglosum etunicatum*, *Acaulospora* sp. 1, *Glomus* sp. 1, *Acaulospora* sp. 2, *Acaulospora* sp 3, *Rhizoglosum aggregatum*, *Glomus* sp. 2, *Rhizoglosum* sp. 1, *Sclerocystis* sp. 1, *Racocetra gregaria*, *Septoglosum* sp. 1). Y el inóculo comercial estuvo integrado por *A. colombiana* y *G. intraradices*.

3.2.2. Aclimatización y tratamientos de inoculación con HMA

Las plántulas se transfirieron individualmente a bolsas de vivero de polietileno negro (21 x 35 cm, calibre 600) que contenían aproximadamente 2.5 kg de sustrato compuesto (arena de playa, suelo regional y turba de esfagno (Premier®) en relación 1:1:1, previamente esterilizado a 120°C durante 1 h tres veces sucesivas. Los inóculos se aplicaron al momento del trasplante (10-15 g) que contenían 240 ± 15 esporas. La mezcla de sustrato se regó con 0.5 L de agua un día antes de sembrar las plántulas. Las bolsas negras se perforaron con pequeños agujeros en la base para drenar el exceso de agua. Finalmente, se cubrió con una bolsa de polietileno transparente (calibre 400) con cortes de 1.5 cm/lado/centro, con 2 cm de distancia entre cada corte. Las plántulas se mantuvieron durante dos semanas sin riego, bajo una malla sombra y ventilación, luego, se retiró la bolsa superior transparente y partir de ese momento, las plántulas se regaron con un sistema de microaspersión automático cada tres días durante cinco minutos y se mantuvieron en invernadero durante seis meses bajo evaluación.

3.2.3. Evaluación del crecimiento y sobrevivencia de las plántulas

La sobrevivencia se monitoreó mensualmente por conteo directo, para evaluar el crecimiento de las plántulas se midió la altura de planta (cm), el diámetro del tallo (cm), el número de hojas, el área foliar (cm²), la capacidad fotosintética y la fluorescencia de la clorofila. Para medir la fotosíntesis se utilizó un sistema portátil de intercambio gaseoso (LICOR LI-6400XT) y la fluorescencia de la clorofila se cuantificó en un analizador de sistema modulado por fluorescencia (mPEA, Hansatech).

3.2.4. Estimación de la colonización micorrízica

Previamente, las raíces se colectaron en el invernadero y se conservaron en etanol (70 %), posteriormente, se clarearon y tiñeron de acuerdo con el método de Phillips y Hayman, (1970).

Se utilizaron raíces de 1 cm de longitud clareadas y teñidas, se montaron en un portaobjetos y se observaron en microscopio (Zeiss) a 40x, la presencia de las diferentes estructuras (arbusculos, vesículas, hifas y/o coils) de acuerdo al protocolo de McGonigle *et al.* (1990). Finalmente, se estimó el porcentaje de colonización de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de colonización de HMA} = \left(\frac{\text{Número de campos micorrizados}}{\text{Número total de campos observados}} \right) \times 100$$

3.2.5. Diseño experimental

Los experimentos se realizaron con un diseño experimental de medidas repetidas. Se consideraron tres tratamientos, a) Plántulas sin HMA (Control), b) Plántulas inoculadas con HMA nativos c) Plántulas inoculadas con HMA comerciales. Se utilizaron 15 plantas por cada tratamiento y se colocaron en el invernadero aleatoriamente. El análisis de resultados se evaluó por un ANOVA de medidas repetidas seguido de una prueba de Dunnett.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Sobrevivencia de plántulas

La sobrevivencia de las plántulas de cuatro meses inoculadas con HMA nativos fue de 5 %, mientras que, en las plántulas de nueve meses fue de 92 % (Figura 3.2A). Las plántulas tratadas con HMA comerciales de cuatro meses tuvieron una sobrevivencia de 5

% y para las de nueve meses fue 77 % (Figura 3.2B). En la Figura 3C muestra la sobrevivencia de las plantas consideradas como control, se encontró que a los 180 días las plantas de cuatro meses tienen una sobrevivencia inferior al 20 % y las plantas de nueve meses tuvieron una sobrevivencia del 77 %.

Con estos resultados se puede demostrar que los primeros dos meses de aclimatización, es la etapa más crítica en el acondicionamiento *ex vitro* de las plántulas, a partir de este momento no hubo más pérdidas significativas en las plantas, sin embargo, las plántulas de cuatro meses tuvieron una sobrevivencia inferior al 50 % al final de los 180 días. Todas las plantas de este grupo tuvieron de 3-4 cm de longitud de raíz y 1-2 raíces primarias al inicio del trasplante, esto podría explicar la baja sobrevivencia en estas plántulas. En cambio, las plántulas de nueve meses respondieron mejor a la etapa de aclimatización con y sin inoculación de HMA. Los mejores resultados se encontraron en las plántulas inoculadas con HMA nativos.

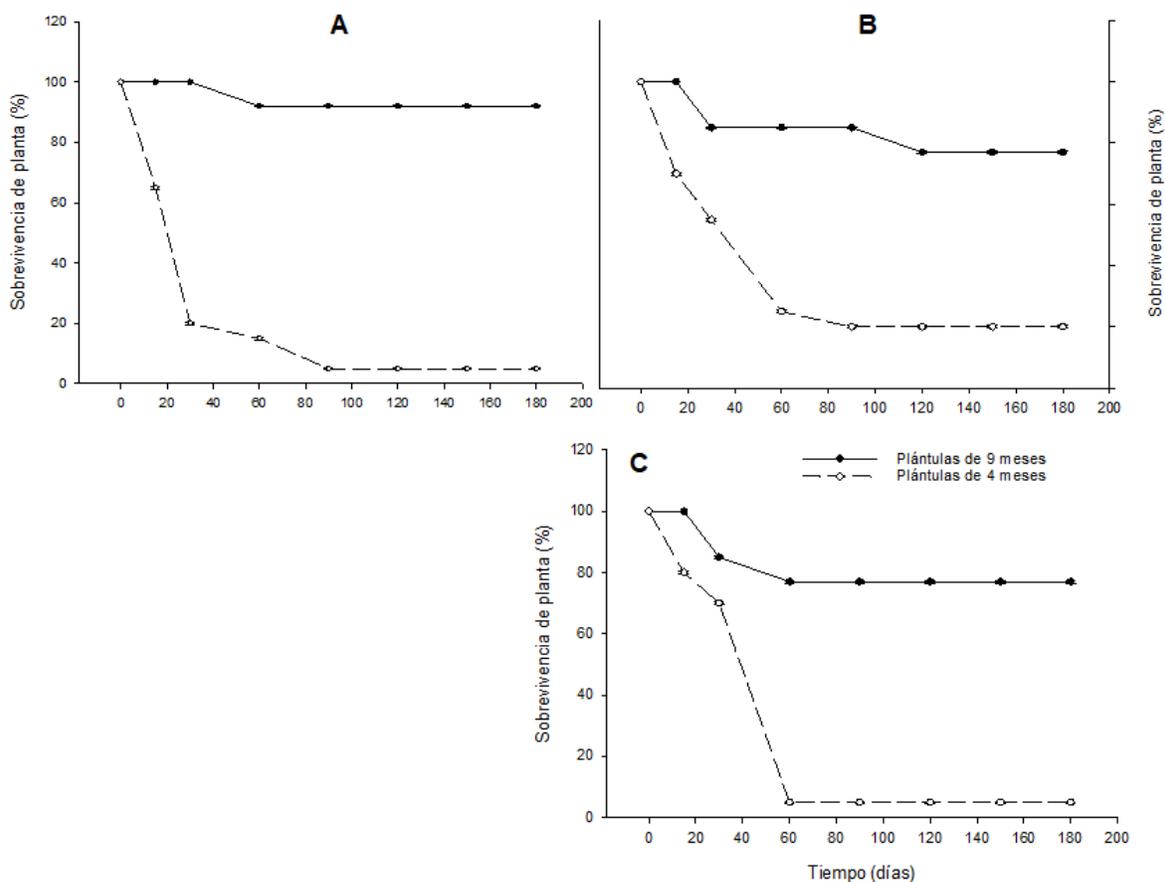


Figura 3.2. Supervivencia de plántulas de cocotero micropropagadas de cuatro y nueve meses de edad en cultivo *in vitro* aclimatadas en invernadero. A) Plántulas inoculadas con HMA nativos, B) Plántulas inoculadas con HMA comerciales, C) Plántulas sin HMA (control). Cada línea representa la media de 15-20 plantas por tratamiento \pm D.E.

De manera preliminar es evidente que los HMA nativos confieren una mejor respuesta a la supervivencia de las plántulas, esto podría estar relacionado con la fuente de aislamiento de los HMA, debido a que se aislaron a partir de plantaciones de cocotero.

3.3.2. Crecimiento de plántulas de cocotero aclimatadas en invernadero

De acuerdo con los datos obtenidos en las plántulas de cuatro meses, se observó que no hay diferencias en el crecimiento entre las plantas inoculadas y no inoculadas hasta los 180 días (Cuadro 3.1). Se obtuvo un incremento máximo en la altura de las plantas de 29 cm. El diámetro de las plantas incrementó 1.3 veces de su valor inicial. El área foliar de las plantas incrementó en promedio 133 cm² después de los 180 días de crecimiento, y el número de hojas aumentó 2 hojas por tratamiento.

Por su parte, las plántulas de nueve meses tuvieron una respuesta similar a las plántulas de 4 meses, no se encontraron diferencias significativas a los 180 días, sin embargo, de acuerdo con los resultados, se observa un mejor crecimiento en las plantas inoculadas con HMA comerciales. La altura máxima de las plantas fue de 37 cm, el diámetro del tallo incrementó 1.1 veces del valor inicial. El área foliar aumentó al doble del área foliar inicial, y el número de hojas incrementó en promedio a 6.3 hojas por planta (Cuadro 3.1).

Cuadro 3.1. Parámetros de crecimiento de plántulas de cocotero micropropagadas de cuatro y nueve meses después de un periodo de 180 días en invernadero.

Parámetros	Altura de planta (cm)		Diámetro de tallo (cm)		Área foliar (cm ²)		Número de hojas	
	0 días	180 días	0 días	180 días	0 días	180 días	0 días	180 días
<i>Plántulas de cuatro meses en cultivo in vitro</i>								
Plántulas sin HMA	13.4 ± 2.3	38 ± 0.0	0.94 ± 0.2	1.03 ± 0.0	24.7 ± 6.8	34.1 ± 8.2	3.9 ± 0.7	6.0 ± 0.0
Plántulas con HMA nativos	14.5 ± 2.4	28 ± 0.0	0.99 ± 0.2	1.01 ± 0.0	20.9 ± 5.7	33.1 ± 5.3	4.6 ± 1.0	4.0 ± 0.0
Plántulas con HMA comerciales	15.0 ± 3.2	34 ± 10	0.91 ± 0.1	1.35 ± 0.6	21.7 ± 7.9	46.7 ± 12.0	4.5 ± 1.5	5.5 ± 0.7
<i>Plántulas de nueve meses en cultivo in vitro</i>								
Plántulas sin HMA	20.8 ± 2.6	35.9 ± 5.4	1.32 ± 0.2	0.95 ± 0.1	37.3 ± 7.6	51.6 ± 6.9	5.9 ± 1.3	6.3 ± 1.3
Plántulas con HMA nativos	20.3 ± 2.0	34.8 ± 5.1	1.09 ± 0.2	1.30 ± 0.3	31.3 ± 6.0	50.2 ± 12.6	5.4 ± 1.9	6.3 ± 1.3
Plántulas con HMA comerciales	21.2 ± 2.7	37.3 ± 8.1	1.20 ± 0.2	1.19 ± 0.3	32.6 ± 5.6	70.5 ± 27.4	6.2 ± 0.3	6.4 ± 0.8

Los resultados obtenidos de ambos grupos de plántulas se muestran en el Cuadro 3.2.

Cuadro 3.2. Parámetros fisiológicos de plántulas de cocotero micropropagadas aclimatadas en invernadero.

Parámetros	Fotosíntesis ($\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)		F_v/F_m		$P_{i_{\text{abs}}}$	
	0 días	120 días	0 días	120 días	0 días	120 días
<i>Plántulas de cuatro meses en cultivo in vitro</i>						
Plántulas sin HMA	1.5 ± 0.2	3.51 ± 0.9	0.777 ± 0.1	0.749 ± 0.0	3.33 ± 0.5	3.49 ± 0.3
Plántulas con HMA nativos	1.4 ± 0.2	3.24 ± 0.0	0.715 ± 0.0	0.798 ± 0.0	3.16 ± 0.0	3.69 ± 0.0
Plántulas con HMA comerciales	1.7 ± 0.3	3.21 ± 0.5	0.790 ± 0.0	0.812 ± 0.1	3.48 ± 0.8	3.78 ± 0.1
<i>Plántulas de nueve meses en cultivo in vitro</i>						
Plántulas sin HMA	3.68 ± 0.4	6.24 ± 0.9	0.789 ± 0.0	0.800 ± 0.0	3.97 ± 0.6	4.56 ± 1.1
Plántulas con HMA nativos	4.04 ± 0.7	7.66 ± 1.1	0.788 ± 0.0	0.800 ± 0.0	3.69 ± 0.9	3.90 ± 1.7
Plántulas con HMA comerciales	3.43 ± 0.7	6.88 ± 0.6	0.763 ± 0.1	0.777 ± 0.0	3.66 ± 0.4	4.89 ± 2.1

F_v/F_m : Fluorescencia de la clorofila (fluorescencia variable y fluorescencia máxima; $P_{i_{\text{abs}}}$: Índice de rendimiento.

En general, la tasa de crecimiento fue mejor en las plantas de cuatro meses, sin embargo, la sobrevivencia de las plántulas inoculadas no fue superior al 20 %, esto podría indicar que las plántulas en esta etapa no están fisiológicamente bien desarrolladas para hacer frente al estrés post trasplante, es importante mencionar que las plántulas carecían de un sistema de raíces abundante. Es evidente que es necesario someter a las plántulas a un pre tratamiento para mejorar el desarrollo radicular y posteriormente, su aclimatización. En el caso de las plantas de nueve meses, su crecimiento fue más lento, y esto es comparable con estudios de aclimatización de cocotero que indican que esta especie es de crecimiento lento (Talavera *et al.*, 2015), sin embargo, se llevaron a cabo más experimentos por periodos más prolongados y en diferentes condiciones para validar el efecto de los HMA sobre el crecimiento, debido a que diferentes estudios mencionan que los cambios en el desarrollo de las plantas bajo tratamientos con HMA es más evidente en pruebas de campo (Berruti *et al.*, 2016).

En los parámetros de fluorescencia de la clorofila y fotosíntesis no se observaron cambios (Cuadro 3.2). Esto significa que a pesar de que no hubo un incremento en estos valores se

mantienen en buen estado las plantas, ya que estos parámetros son indicadores del estado de estrés de las plantas.

3.3.3. Colonización micorrízica de plántulas de cocotero inoculadas con HMA aclimatizadas en invernadero

En la siguiente figura (Figura 3.3), se muestran los resultados del porcentaje de colonización total de las plántulas inoculadas con HMA de nueve meses en cultivo *in vitro*, después de un periodo de seis meses en invernadero.

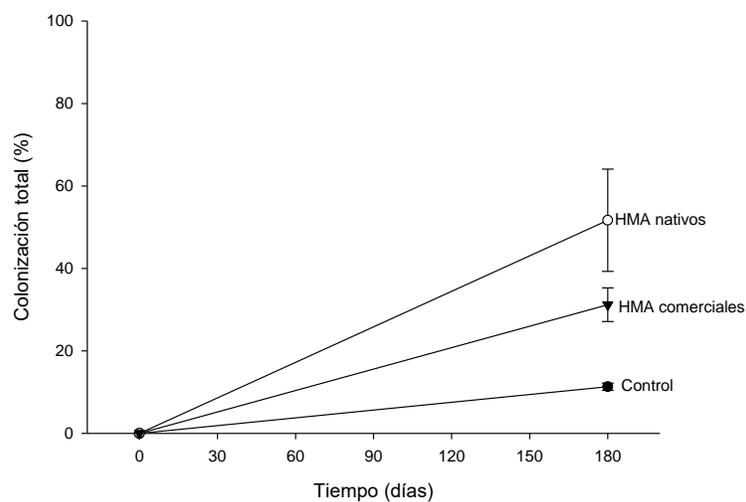


Figura 3.3. Porcentaje de colonización de hongos micorrízicos en plántulas micropropagadas de cocotero inoculadas con HMA y adaptadas en invernadero durante un periodo de 6 meses. n=3 réplicas biológicas.

Como se muestra en la Figura 3.3, las plántulas inoculadas con HMA nativos de nueve meses de edad tienen un porcentaje de colonización superior al 50 %, esta información sugiere la posible efectividad del inóculo. La colonización por HMA comerciales fue menor a la colonización de las plántulas micorrizadas con HMA nativos.

En el Cuadro 3.3, se muestran los resultados de colonización de estructuras micorrízicas observadas en las raíces de cocotero de plántulas de nueve meses.

Cuadro 3.3. Colonización por estructura de plantas micropropagadas de cocotero adaptadas en invernadero.

Tratamiento	Arbúsculos	Vesículas	Hifas	Coils
Control	0.0 ± 0.0	1.74 ± 0.0	9.57 ± 0.0	0.87 ± 0.0
HMA nativos	34.69 ± 5.1	2.7 ± 0.5	44.4 ± 2.1	6.15 ± 0.0
HMA comerciales	15.7 ± 4.6	4.1 ± 1.0	27.8 ± 0.4	3.2 ± 0.2

Valores medios de 3 réplicas biológicas por tratamiento, expresados en porcentaje.

Las estructuras micorrízicas con más presencia a los 180 días de crecimiento de las plántulas fueron las hifas, seguido de los arbúsculos (Figura 3.4).

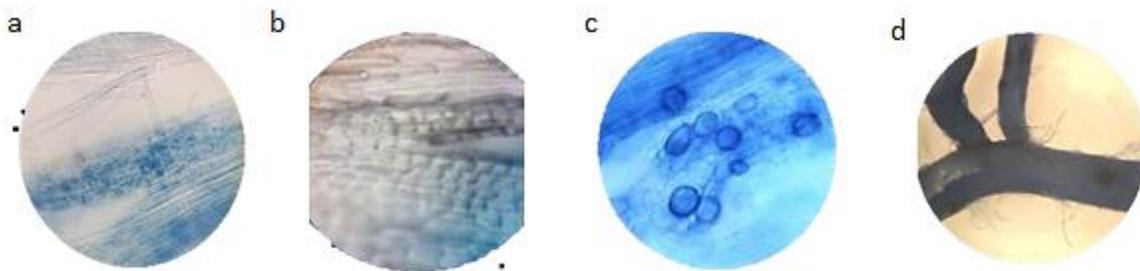


Figura 3. 4. Representación de estructuras micorrízicas encontradas en los diferentes tratamientos. A) arbúsculo, b) coils formando arbúsculos, c) vesículas, d) hifas.

Con respecto a las plántulas de cuatro meses de edad no se observó colonización micorrízica, esto podría estar relacionado con la escasez de raíces secundarias y terciarias en las plántulas al momento del trasplante. Se sabe que las micorrizas se desarrollan en raíces secundarias y terciarias (Dreyer *et al.*, 2010). La alta colonización de las plántulas inoculadas con HMA nativos podría explicar los resultados de la sobrevivencia de las plántulas.

3.4. CONCLUSIÓN

Se estableció un protocolo de aclimatización con la inoculación de HMA en plántulas de cocotero de cuatro y nueve meses en cultivo *in vitro*. La sobrevivencia de las plántulas de cuatro meses no fue exitosa. Las plántulas de nueve meses respondieron a la inoculación de los HMA, siendo significativamente mejor aquellas inoculadas con HMA nativos, esto es el primer ensayo que demuestra que las plántulas de cocotero no solo albergan especies de HMA nativos del entorno, sino que además promueven su sobrevivencia y desarrollo.

CAPITULO IV

LOS HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES AUMENTAN LA SOBREVIVENCIA Y EL CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS MICROPROPAGADAS DE COCOTERO (*Cocos nucifera* L.)

Gómez-Falcón N.^a, Sáenz-Carbonell L.A.^a, Andrade-Torres A.^b, Lara-Pérez L.A.^c, Narváez M.^a, Oropeza C.^{a*}

In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant. Artículo enviado (15 de diciembre 2022), aceptado (26 de marzo de 2023).

4.1. INTRODUCCIÓN

El cocotero (*Cocos nucifera* L.) es un cultivo de importancia económica en varios países, contribuyendo al aumento de la seguridad alimentaria y a la generación de empleos (Karandeep *et al.* 2019). En los últimos quince años, la demanda de productos del cocotero ha crecido de manera significativa (Prades *et al.*, 2016), en particular, el agua envasada, el aceite virgen, la leche, el azúcar, el biodiesel como aditivo y derivados de fibra (Roolant, 2014; Pham, 2016). Sin embargo, la producción de coco en la mayoría de las plantaciones está disminuyendo, principalmente debido a la senescencia de las palmas, a plagas y enfermedades. Específicamente, la enfermedad del amarillamiento letal (LY) asociada a fitoplasmas, ha ocasionado la pérdida de millones de palmas en varios países de la región del Caribe y África, así como, en países de Asia y el Pacífico sudoccidental (Gurr *et al.*, 2016; Oropeza *et al.*, 2020). En este sentido, para sostener el crecimiento de la industria del cocotero en beneficio de toda la comunidad cocotera, es necesario llevar a cabo una replantación extensiva en todo el mundo, la cual debe ser con genotipos seleccionados por su resistencia a LY y otras características como un alto rendimiento.

La detección de genotipos resistentes a LY comenzó en el siglo XX identificando ecotipos “enano malayo” y los ecotipos “alto del pacífico” (Been, 1991; Zizumbo-Villareal *et al.*, 2008) y aún se están investigando nuevos genotipos (Garavito-Guyot *et al.*, 2022; Castillo *et al.*, 2022). Entonces, es necesario la producción masiva de estas plántulas, sin embargo, es difícil lograrlo a través de la propagación por semilla, por lo que, el uso de la micropropagación a través de la embriogénesis somática se está convirtiendo en una alternativa importante (Kalaipandian *et al.*, 2021). Dicho proceso ya está disponible, puede producir miles de embriones somáticos a partir

de un solo explante de plúmula a través de la formación y multiplicación de callos embriogénicos, y la mayoría de estos embriones se convierten en plántulas (Pérez-Núñez *et al.* 2006; Oropeza *et al.* 2016). Sin embargo, es necesario mejorar el proceso para hacerlo más competitivo (Sáenz-Carbonell *et al.* 2016). Una de las mejoras que se necesitan es aumentar la sobrevivencia *ex vitro* de las plántulas después de la aclimatización, lo que facilitaría su adaptación cuando se transfieran a campo (Hazarika *et al.*, 2006).

Estudios previos evaluaron la supervivencia *ex vitro* de plántulas de coco que fueron producidas por germinación *in vitro* de embriones cigóticos reportando inicialmente bajos porcentajes. Sin embargo, después de varias estrategias, la sobrevivencia incremento significativamente a 90 % (Cuadro S1; Talavera *et al.*, 2005; Fuentes *et al.*, 2005; Pech-Aké *et al.*, 2007; Samosir y Adkins, 2014; Sisunandar *et al.*, 2018).

Algunos estudios en palmeras, como *Phoenix dactylifera* y *Elaeis guineensis* obtenidas por embriogénesis somática han logrado tasas de sobrevivencia entre 60-84 % y 58-63 %, respectivamente (Shoutlz, 2001; Al-Khayri y Naik, 2017). Hasta el momento no existen estudios previos de la micropropagación y aclimatización de cocotero mediante embriogénesis somática.

Durante la transferencia a condiciones *ex vitro*, las plántulas enfrentan un shock al trasplante, exposición a temperatura e intensidad de luz elevadas, así como, una fisiología y morfología alteradas (Chandra *et al.*, 2010; Kumar y Rao, 2012). Por lo tanto, una estrategia prometedora para la adaptación a las nuevas condiciones es el uso de HMA que contribuyen a mejorar la sobrevivencia de las plántulas producidas *in vitro*. Algunas características de los HMA es que promueven un crecimiento más vigoroso, una mejora en el sistema radicular, un aumento en la eficiencia fotosintética, mejora en la capacidad de conducción de agua, mejora en la absorción de nutrientes, previenen el ataque de patógenos transmitidos por el suelo y protegen del estrés ambiental durante la transición de condiciones *in vitro* a *ex vitro* (Kapoor *et al.*, 2008; Soumare *et al.*, 2021).

Diferentes reportes mencionan la importancia de utilizar HMA mixtos ya que se sugiere que algunos taxones de HMA están asociados a funciones específicas y permiten una complementariedad funcional que se refleja en un mejor beneficio para las plántulas a diferencia de los HMA exóticos (Crossay *et al.*, 2019). Además, el cocotero ha sido durante mucho tiempo una especie naturalizada, se espera que la asociación entre las plántulas de cocotero y los HMA nativos tenga un efecto positivo en la sobrevivencia, crecimiento y

desarrollo de las plántulas durante la aclimatización y, eventualmente, cuando se establezcan en campo. Por otro lado, las especies nativas de HMA podrían ser simbioses más efectivos que las especies comerciales debido a que se desarrollan en condiciones específicas (Guadarrama y Ramos-Zapata, 2020).

Hasta donde tenemos conocimiento, no existen reportes del uso de HMA en plántulas de cocotero producidas *in vitro*, sin embargo, existe evidencia en la efectividad en el uso de estos microorganismos, en *P. dactylifera* (El Kynani *et al.*, 2019) y en *Elaeis guineensis* (Schultz, 2001). Por lo tanto, este estudio reporta por primera vez la evaluación de plántulas de cocotero micropropagadas inoculadas con HMA nativos, aislados de la rizosfera de cocotero de diferentes sitios de la duna costera de Yucatán en México, comparados con HMA comerciales, para determinar su efecto sobre la sobrevivencia y comportamiento de las plántulas durante la etapa de aclimatización.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Sitio experimental y material vegetal

El presente estudio se llevó a cabo en el Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. México, en las instalaciones del invernadero 1 (temperatura y humedad fueron $27.6 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ y $51.7 \pm 3.1 \%$, respectivamente). Las plántulas de cocotero híbrido Alto de Pacífico Mexicano (ecotipos MxPT1 x MxPT2) se obtuvieron por micropropagación según Pérez-Nuñez *et al.* (2006) y Sáenz *et al.* (2018). Brevemente, la producción de plántulas se realizó a través de la embriogénesis somática, lo que implica la formación de callos embriogénicos y su multiplicación, seguida de la formación de callos embriogénicos somáticos. Finalmente, los embriones germinaron y se desarrollaron en plántulas. Al final del proceso se seleccionaron plántulas uniformemente de acuerdo a altura (20 ± 3 cm), 2-3 hojas bífidias y la presencia de raíces secundarias.

4.2.2. Hongos micorrízicos arbusculares utilizados

Se utilizaron dos diferentes mezclas de HMA nativos y comerciales. El primero corresponde a un HMA comercial (PHP® Endo Rhyze Mini Plug, México) que incluye dos especies (*Rhizoglyphus intraradices* y *Acaulospora colombiana*), con vermiculita como soporte inerte y propágulos infectivos (fragmentos de micelio y raíces micorrizadas). El segundo corresponde a

una mezcla de HMA nativos con 13 especies aisladas de suelo asociado con la rizosfera de cocotero.

Para la obtención de HMA nativos, se colectó suelo de seis sitios representativos de zonas cocoteras (Lara-Pérez *et al.*, 2020). Después de la recolección, los HMA se multiplicaron por cultivos trampa utilizando *Panicum maximum* como planta hospedante en condiciones de invernadero durante 6 meses, previamente, las semillas de *P. maximum* se desinfectaron con NaClO al 0.5 % durante 15 min y se sembraron en tierra y arena estéril (121 °C, 1 h, 3 veces). Las plantas fueron fertilizadas (solución de Hoagland al 15 %, sin fósforo) una vez por semana en los dos primeros meses y luego dos veces por semana. Los HMA nativos fueron una mezcla de arena y fragmentos de raíces colonizadas (60-80 %).

4.2.3. Identificación de HMA

Para la identificación a nivel de especies de los HMA nativos, las esporas se montaron en un portaobjetos usando polivinil-alcohol-lactoglicerol (PVLG) y una mezcla de PVLG más reactivo de Melzer y se examinaron bajo un microscopio (Zeiss Primo Star) de acuerdo con color, tamaño, forma, estructura de la pared, decoración, tipo de hifas, modo de germinación y diferentes estructuras subcelulares (Blaszkowski, 2012).

4.2.4. Cuantificación de esporas

Se cuantificó la abundancia de esporas de acuerdo con el protocolo de Genderman y Nicholson (1963) y Walker (1997). Para ello, se mezclaron 10 g de sustrato con 1 L de agua y, pasados 10 segundos, se tamizaron por diferentes tamices (1000, 500, 150, 73, 38 μ M). Luego, se recuperaron los sólidos del tamiz de 38 μ M y se centrifugó a 3000 rpm durante 3 min (centrífuga Eppendorf 5804R). A continuación, se descartó el sobrenadante y el sedimento se centrifugó a 1000 rpm durante 1 min en una solución de sacarosa con gradiente de 15 % y 60 % p/v. Luego se tamizó (38 μ M), y se lavó con agua para eliminar los restos de sacarosa. Finalmente, las esporas se contaron en un microscopio estereoscópico (Nikon SWZ800) a 40X. Se estimó el número de esporas por cada 10 g, utilizando cinco repeticiones.

4.2.5. Inoculación y aclimatación de plántulas de cocotero con HMA

Las plántulas se transfirieron individualmente desde condiciones *in vitro* a bolsas de vivero de polietileno negro con fuelle (21 x 35 cm, calibre 600) que contenían aproximadamente 2.5 kg de sustrato compuesto (arena de playa, suelo regional y turba de esfagno, relación 1:1:1)

esterilizado a 120°C durante 1 h tres veces consecutivas cada día. Los HMA nativos y comerciales se inocularon al momento del trasplante (10-15 g con 240 ± 15 esporas). La mezcla de sustrato se hidrató con 0.3 L de agua un día antes de sembrar las plántulas. Las bolsas negras tenían 12 pequeños orificios en la base para drenar el exceso de agua. Finalmente, este montaje con la plántula se cubrió con una bolsa de polietileno transparente (calibre 400) con cortes en los lados y en medio (Talavera *et al.*, 2005; Pech-Aké *et al.*, 2004). Las plántulas se colocaron aleatoriamente en el invernadero. Los experimentos y el seguimiento comenzaron en esta etapa después de que las plántulas se mantuvieran durante 2 semanas sin riego adicional, bajo una malla de sombra con ventilación en el invernadero. Luego se retiraron las bolsas superiores transparentes y las plántulas se mantuvieron en invernadero durante 6 meses, se regaron con un sistema de microaspersión automática cada 3 días durante 5 minutos.

4.2.6. Experimentos realizados

Hubo tres experimentos en este estudio con tres tratamientos en cada experimento: (a) plántulas no inoculadas (control), (b) plántulas inoculadas con HMA nativo y (c) plántulas inoculadas con HMA comercial. El experimento 1 comenzó en octubre de 2019 y se llevó a cabo para evaluar la tasa de supervivencia durante 6 meses después del trasplante con un seguimiento mensual. Se utilizaron quince plántulas para cada tratamiento. El experimento 2 comenzó en octubre de 2020 y se llevó a cabo para evaluar la tasa de supervivencia, el crecimiento y los parámetros fisiológicos durante 6 meses con seguimiento a los días 0, 30, 90 y 180 después del trasplante. Se utilizaron treinta plántulas para cada tratamiento. Finalmente, se llevó a cabo el experimento 3 para evaluar el crecimiento de raíces (longitud de raíces primarias y secundarias) y la colonización de raíces. Se utilizaron tres plántulas por cada tratamiento y los muestreos fueron a los 0, 15, 30, 60, 90 y 180 días.

4.2.7. Parámetros de crecimiento

Para determinar el crecimiento de las plántulas, se midió la altura de las plántulas (en cm) con un flexómetro ($\pm 1,2$ mm), el número de hojas por plántula por conteo directo, el diámetro del tallo (en cm, tomado 2 cm por encima del nivel de la superficie del sustrato) con un vernier ($\pm 0,0381$ mm), el área foliar (en cm^2) a partir de la hoja joven usando en ImageJ (EE.UU.), como medida de referencia se consideró la longitud de la hoja.

4.2.8. Parámetros fisiológicos

Las mediciones se tomaron entre las 12:00-14:00 h. La capacidad fotosintética se determinó a 30°C y 60 % de humedad relativa, 1000 $\mu\text{mol PPF}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidad de luz y 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de CO_2 como referencia, utilizando un sistema fotosintético portátil (LICOR LI-6400XT, Lincoln, Nebraska, EE. UU.) (Fuentes *et al.*, 2005). Esta evaluación se llevó a cabo colocando la hoja expandida más joven fijada sobre la cámara con la superficie adaxial hacia arriba. La fluorescencia de la clorofila se determinó a partir de la relación de fluorescencia variable/fluorescencia máxima (F_v/F_m) y el índice de rendimiento (PI_{ABS}) con un analizador de sistema modulado por fluorescencia (mPEA, Hansatech Norfolk, Reino Unido). Esta evaluación se realizó en la hoja expandida más joven, la cual se adaptó en oscuridad durante 20 min, con un pulso de saturación de 3000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 70 % de intensidad (Fuentes *et al.*, 2005; Talavera *et al.*, 2005).

4.2.9. Crecimiento de raíces y colonización

Para determinar el crecimiento de las raíces durante la aclimatización, se contaron manualmente las raíces primarias y secundarias y se midió la longitud de las raíces primarias. Para la colonización, muestras de raíces (20 segmentos de 1 cm por muestra) se clarearon con KOH al 10 % y H_2O_2 al 5 % a 120°C durante 20 min, luego se lavaron con agua de grifo y se acidificaron con HCl 0.1 N durante 10 min, se tiñeron con azul de tripano (0.05 %) a 120°C durante 20 min (Phillips y Hayman, 1970). Para identificar y contar las estructuras de los HMA dentro de la raíz, las raíces se montaron en un portaobjetos con PVLG. Los segmentos de raíces con estructuras micorrízicas (arbuscúlos, vesículas, hifas, coils) se estimaron según el método de McGonigle *et al.* (1990) utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Colonización de HMA} = \frac{(\text{Numero de segmentos con HMA})}{(\text{Numero total segmentos contadas})} \times 100$$

4.2.10. Análisis estadístico

El efecto de las variables de respuesta sobre los tratamientos de HMA se analizaron con un ANOVA de medidas repetidas seguido de una prueba de Dunnett con una $P \leq 0.05$. Se realizaron las pruebas de Lilliefors, Cochran y Bartlett para validar la normalidad y la homogeneidad de varianzas. Los datos porcentuales se transformaron con $\arcsen \sqrt{(x/100)}$ antes de las pruebas estadísticas. Todos los análisis se realizaron con Minitab® 17.1 (EE. UU.).

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Supervivencia de las plántulas

Los resultados de supervivencia de las plántulas después de la transferencia a condiciones *ex vitro* se muestran en la Figura 4.1. En el experimento 1 (Figura 1A) la tasa de supervivencia a los seis meses fue de 92 ± 0.3 % para las plántulas inoculadas con HMA nativos y de 77 ± 0.4 % tanto para las plántulas inoculadas con HMA comerciales, así como para el tratamiento control (sin inoculación) (Figura 1A) con diferencias significativas ($P \leq 0.05$). En el experimento 2 (Figura 1B), la tasa de supervivencia después de seis meses fue de 87 ± 0.2 % para las plántulas inoculadas con HMA nativo, 67 % para el inóculo comercial y 70 % para el control. La diferencia fue significativa entre el tratamiento con HMA nativos y los otros dos tratamientos, entre el tratamiento con HMA comerciales y control, no fue significativo. En ambos experimentos, la tasa de supervivencia con el tratamiento de HMA nativos fue mayor que con los otros dos tratamientos, 1.2 veces y 1.3 veces, en el experimento 1 y el experimento 2, respectivamente.

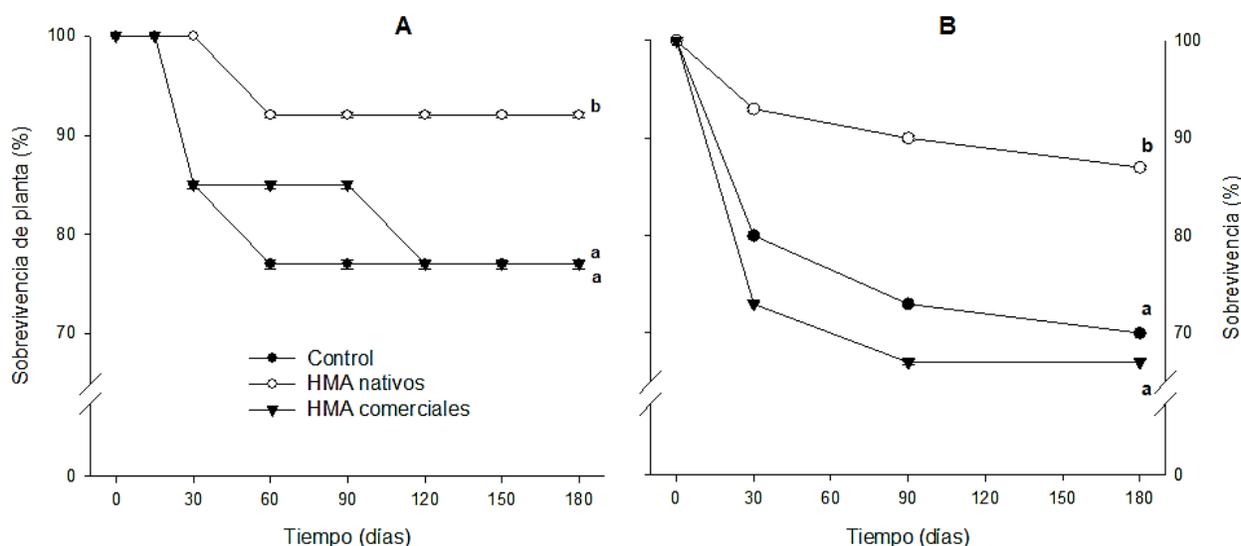


Figura 4.1. Supervivencia de plántulas de cocotero durante 180 días inoculadas con HMA. A) Experimento 1. B) Experimento 2. Letras diferentes en cada línea muestran diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre tratamientos con un test de Dunnett.

4.3.2. Altura de plántulas y diámetro de tallo

La respuesta de crecimiento en altura de las plántulas durante la aclimatización a los tratamientos HMA nativos, HMA comerciales y control (Figura 4.2A), no mostraron diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$). La altura de las plántulas aumentó a partir de los 90 días. En promedio aumentó de 19.5 a 34.4 cm durante los 180 días del experimento.

El patrón de respuesta para el crecimiento del diámetro del tallo de las plántulas fue muy similar a la altura y cuantitativamente con los tres tratamientos (Figura 4.2B). Mostró una ligera disminución a los 30 días; a partir de entonces aumentó constantemente durante el resto del experimento. Hubo diferencias cuantitativas entre tratamientos, particularmente a los 90 y 180 días, pero no fueron significativas ($P \leq 0.05$).

4.3.3. Número y área foliar de hojas

Con los diferentes tratamientos de HMA, el número de hojas (Figura 4.2C) por plántula no mostró una diferencia significativa. Aumentó en promedio una hoja por plántula al día 90, pero luego a los 180 días, disminuyó. Esto debe ser el resultado de la poda, que es una práctica regular que se debe hacer en estas plántulas durante la aclimatización.

En el área foliar de las plántulas, la respuesta fue similar en los tres tratamientos (Figura 4.2D). Hubo un aumento constante a lo largo del experimento, aproximadamente de 22.8 a 132.4 cm². Las diferencias dentro del primer período de 90 días fueron pequeñas y no significativas ($P \leq 0.05$) y se observó una mayor diferencia a los 180 días, con un área foliar de 145.3 cm² para plántulas bajo el tratamiento comercial de HMA y de 126.9 cm² para plántulas inoculadas con HMA nativos y 124.8 cm² para el control.

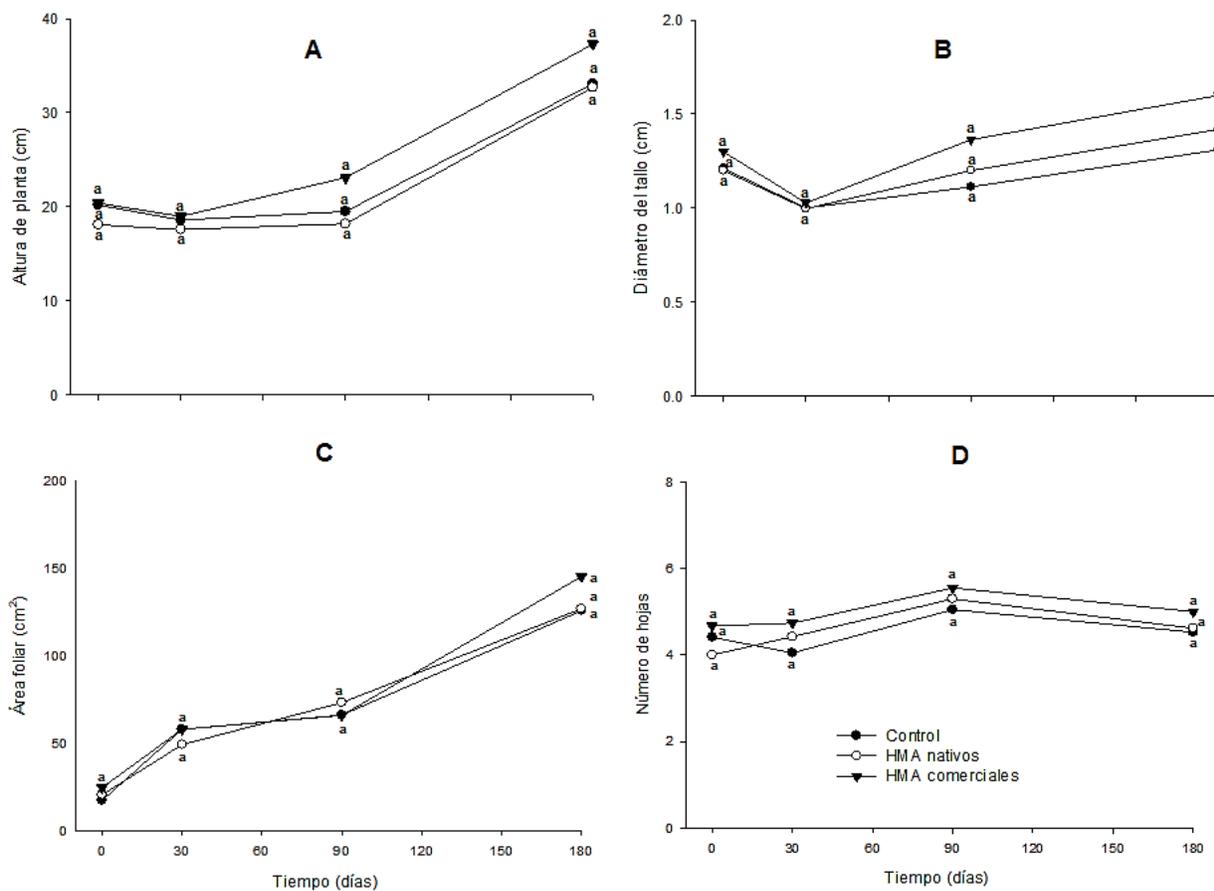


Figura 4.2. Parámetros de crecimiento en plántulas micropropagadas de cocotero durante la aclimatación, bajo tres tratamientos diferentes (HMA comercial, HMA nativo, control sin HMA). Cada línea representa la media de 30 plántulas por tratamiento \pm D.E. (error estándar) durante 180 días bajo condiciones de invernadero. A) Altura de planta, B) diámetro de tallo, C) número de hojas y D) área foliar. Letras diferentes en cada línea muestran diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$, test de Dunnett).

Las plántulas se mantuvieron durante más tiempo bajo resguardo, antes de transferirlas al campo. Esta situación permitió realizar una evaluación a los 360 días en altura de planta, diámetro de tallo y área foliar (Figura 4.3A). Los resultados mostraron que la altura de la planta y el diámetro del tallo fueron significativamente mayores ($P \leq 0.05$) en las plántulas inoculadas con HMA comerciales, en comparación con las plántulas de los otros dos tratamientos (Figura 4.3B). El área foliar fue significativamente mayor ($P \leq 0.05$) en las plántulas inoculadas con HMA comerciales y nativos en comparación con las plantas no inoculadas (Figura 4.3B).

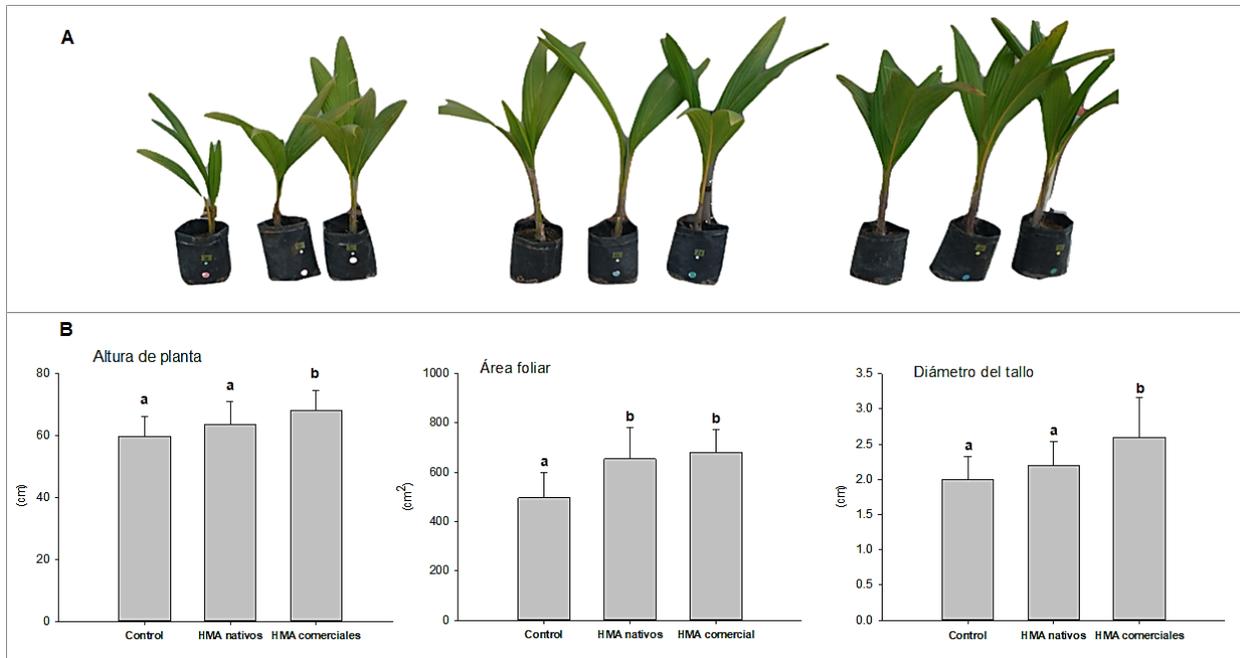


Figura 4.3. Crecimiento de plántulas de cocotero inoculadas con HMA 360 después del inicio de la aclimatización. A) Plántulas de cocotero con los diferentes tratamientos: inoculación con HMA nativo, con HMA comercial y control sin inoculación. B) Evaluación del crecimiento en altura de planta, diámetro de tallo y área foliar, de plántulas con los diferentes tratamientos. Cada barra representa la media de 30 plántulas por tratamiento \pm D.E. (error estándar). Letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$, test de Dunnett).

4.3.4. Fluorescencia de la clorofila

Durante la aclimatización, la fluorescencia de la clorofila (F_v/F_m) de las hojas, varió de 0.735 a 0.801 al momento del trasplante, luego disminuyó a los 30 días 0.739, luego aumentó a 0.753 a los 90 días para permanecer con muy pocos cambios después (Figura 4.4A). Hubo diferencias entre los tratamientos, pero no significativas ($P \leq 0.05$). El índice de rendimiento (PI_{ABS}) inicialmente osciló entre 3.95 y 4.32 y aumentó de 4.78 a 4.96 a los 180 días de aclimatización (Figura 4.4B). Las diferencias observadas entre tratamientos no fueron significativas ($P \leq 0.05$, prueba de Dunnett).

4.3.5. Capacidad fotosintética

En el caso de la capacidad fotosintética, los valores iniciales oscilaron entre 7.26 y 7.65 $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ para los tres tratamientos. Luego mostró un aumento a los 90 días que va desde 10.67 a 12.24 $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, con muy pocos cambios a los 180 días (Figura 4.4C). Las diferencias observadas entre tratamientos no fueron significativas ($P \leq 0.05$).

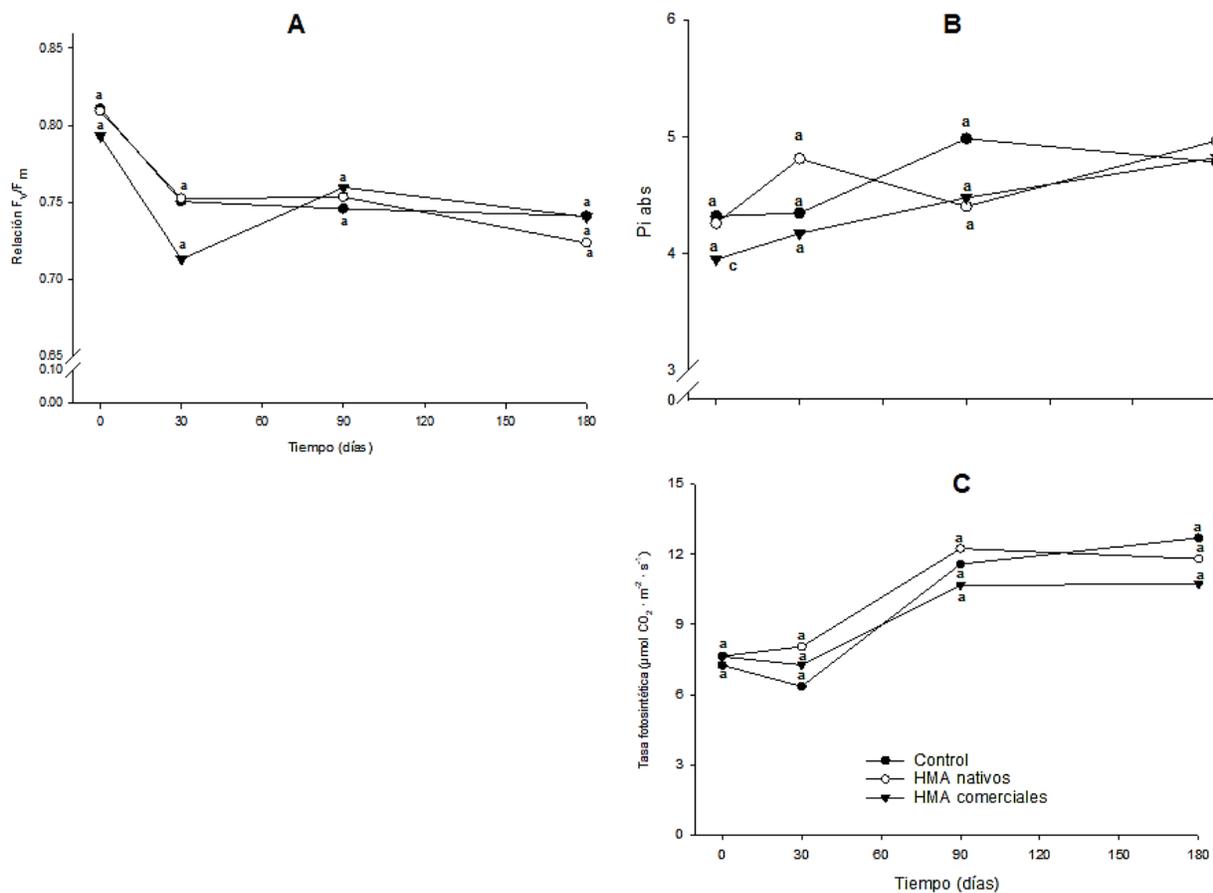


Figura 4.4. Parámetros fotosintéticos de plántulas de cocotero inoculadas con HMA. Cada línea representa la media de 30 repeticiones \pm D.E. (error estándar). A) Relación F_v/F_m . B) Índice de rendimiento (PI_{abs}) C) Capacidad fotosintética. Letras diferentes en cada línea muestran diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$ test de Dunnett).

4.3.6. Crecimiento de raíces

Durante la aclimatización, el número de raíces primarias en las plántulas de cocotero mostró muy pocos cambios en los diferentes tratamientos, al principio el número fue de 3 a 3.5 y al final del período de 180 días, varió de 3 a 4 (Figura 4.5A). Las diferencias entre tratamientos no fueron significativas.

En el caso de la longitud, se observó un incremento de raíces primarias en las plantas con los tres tratamientos. Varió de 3 a 4.5 cm al principio, y esto aumentó de 9 a 19 cm (Figura 4.5B). Hubo diferencias entre los tratamientos, pero no fueron significativas.

El número de raíces secundarias en las plantas no mostró incremento durante los primeros 60 días con los tres tratamientos. Pero, después de 90 días aumentó significativamente ($P \leq 0.05$). A 109 ± 14.1 en plantas bajo el tratamiento con HMA comerciales y 61.5 ± 4.13 para el tratamiento con HMA nativos en comparación con plantas no inoculadas con 38.3 ± 17.5 (Figura 4.5C). No se consideró la longitud de la raíz secundaria por presentar mucha variabilidad en su desarrollo.

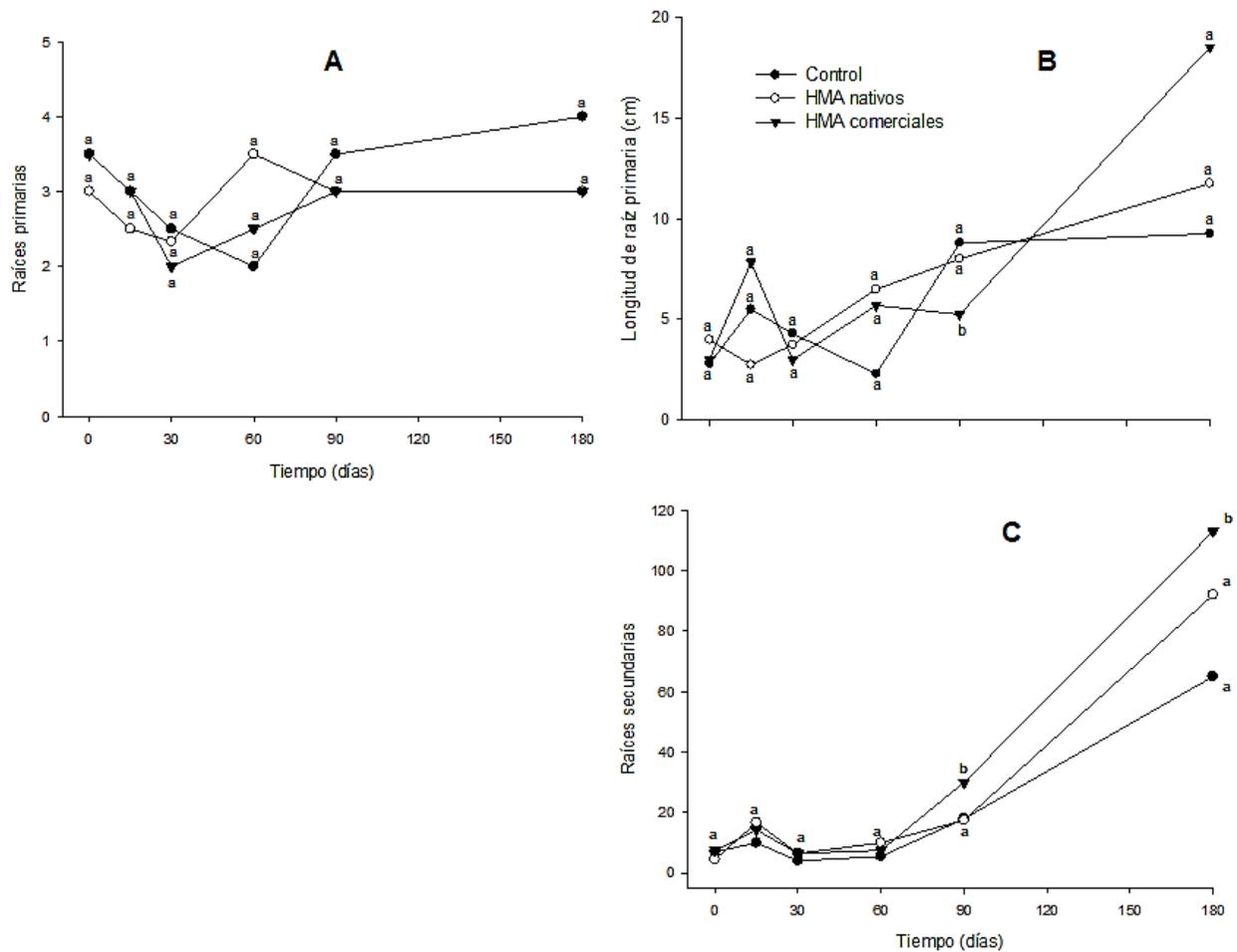


Figura 4.5. Parámetros de crecimiento de raíces de plántulas micropropagadas inoculadas con diferentes tratamientos de HMA. A) Número de raíces primarias, B) Longitud de la raíz primaria, C) Número de raíces secundarias. Cada valor representa la media de tres réplicas independientes \pm D.E. Letras diferentes en cada línea muestran diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre tratamientos con un test de Dunnett.

4.3.7. Identificación de especies de HMA nativos

Se identificaron 13 especies de HMA, enlistadas a continuación (Figura 4.6).



Figura 4.6. HMA nativos de la rizosfera de cocotero. 1) *Acaulospora* sp. 1, 2) *Acaulospora* sp. 2, 3) *Acaulospora* sp. 3, 4) *Claroideoglosum etunicatum* (W.N. Becker & Gerd.) C. Walker & A. Schüssler, 5) *Dominikia aurea* (Oehl & Sieverd.) Błaszcz., Chwat, G.A. Silva & Oehl, 6) *Entrophospora infrequens* (I.R. Hall) R.N. Ames & R.W. Schneid, 7) *Glomus* aff. *glomerolatum* Sieverd, 8) *Glomus* sp. 1, 9) *Glomus* sp. 2, 10) *Rhizoglosum aggregatum* (N.C. Schenck & G.S. Sm.) Sieverd., G.A. Silva & Oehl, 11) *Racocetra gregaria* (N.C. Schenck & T.H. Nicolson) Oehl, F.A. Souza & Sieverd, 12) *Sclerocystis* sp. 1, 13) *Septoglosum* sp. 1.

4.3.8. Colonización de raíces

La frecuencia de micorrización estimada en raíces de las plántulas inoculadas con HMA nativos se muestra en la Figura 4.7A. La colonización de HMA nativos comenzó a los 15 días con la formación de hifas (6.8 % de frecuencia). Luego disminuyó el día 30 al 1.2 % y volvió a aumentar al 10.4 % al día 60. Al día 90 volvió a disminuir y aumentó al 7.9 % al día 180. Hubo

formación de vesículas a los 30 días, alcanzando un máximo del 10.6 % al día 60 y disminuyó al día 90 a casi el 0.6 %. Finalmente, aumentó a 1.2 % a los 180 días. Los arbusculos aparecieron al día 60 con una frecuencia del 3.1 %, disminuyeron a casi el 0 % al día 90 y volvieron a aumentar al 1.8 % a los 180 días. En el caso de los coils, aparecieron al día 30 al 2.4 %, luego disminuyeron al 0.6 % al día 60, para volver a aumentar al 10.2 % al día 180.

La frecuencia de micorrización en raíces de plántulas inoculadas con HMA comerciales se muestra en la Figura 4.7B. La colonización comenzó con la formación de hifas con una frecuencia del 8.4 % al día 15, disminuyó alrededor del 5.9 % al día 30. Luego se duplicó al 18.3 % al día 90 y disminuyó ligeramente al 16.1 % al día 180. Las vesículas y los coils fueron casi inexistentes (≤ 1 %) a lo largo de los 180 días. Los arbusculos aparecieron al día 60 con una frecuencia del 12.1 % y disminuyeron al 4.1 % al día 90. Posteriormente aumentaron al 9 % a los 180 días. Por el contrario, las plántulas sin inoculación no mostraron colonización micorrízica.

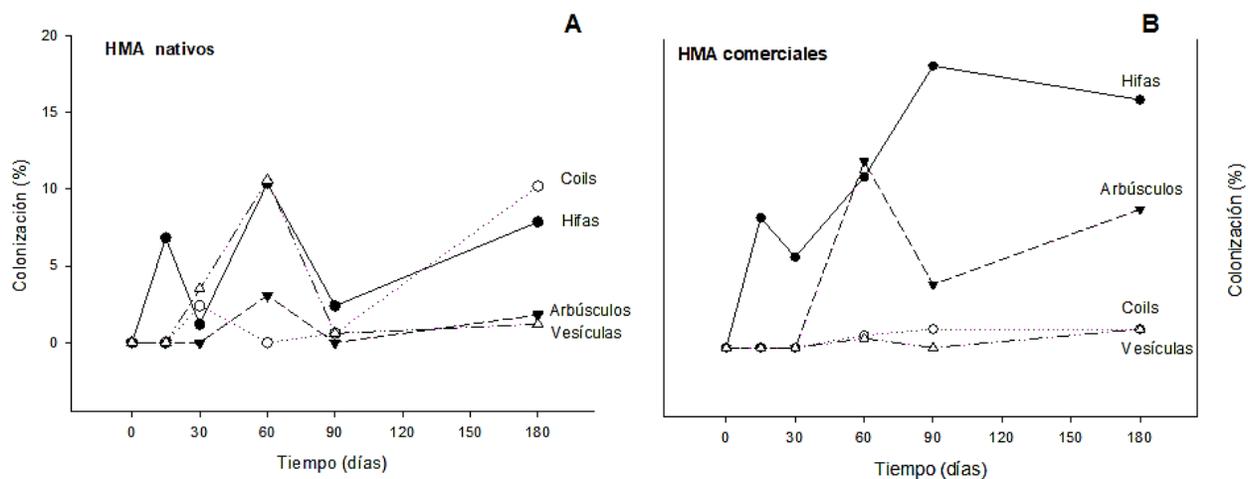


Figura 4.7. Formación de estructuras micorrízicas en raíces de plántulas de cocotero, 180 días posteriores al trasplante. Los valores son el promedio de tres réplicas independientes. A) Colonización con HMA nativos. B) Colonización con HMA comerciales.

4.4. DISCUSIÓN

La aclimatización de las plántulas micropropagadas es la última etapa antes de que estén listas para su establecimiento en el campo y es esencial para asegurar su sobrevivencia en condiciones *ex vitro*. En el caso de las plántulas micropropagadas de cocotero, no existen reportes en la literatura sobre su aclimatización, evaluaciones no publicadas de nuestro

laboratorio (Oropeza C, CICY) mostraron una sobrevivencia del 80 % para plántulas micropropagadas de cocotero (obtenidas mediante embriogénesis somática). Sin embargo, existen reportes para plántulas micropropagadas de otras especies de palmeras de 60 a 84 % para *P. dactylifera* (El Kinany *et al.*, 2019) y 55 % para *E. guineensis* (Schultz, 2001). Sin embargo, también descubrieron que estas respuestas podían mejorarse hasta en un 100 % cuando las plántulas se inoculaban con HMA. Por lo tanto, el presente estudio reporta el efecto de los HMA nativos y comerciales en el desempeño y sobrevivencia de plántulas de cocotero obtenidas por embriogénesis somática durante la aclimatización. Se realizaron dos experimentos, en los que se evaluó la sobrevivencia. En el primero, el porcentaje de sobrevivencia fue del 77 %, similar a las observaciones anteriores y cuando las plántulas se inocularon con HMA nativos, la sobrevivencia aumentó 1.19 veces. En el segundo experimento, la sobrevivencia fue menor (67 %), pero nuevamente cuando se trató con HMA nativos, aumentó 1.24 veces.

La sobrevivencia reducida en el segundo experimento podría deberse a que el experimento se llevó a cabo durante la pandemia y las condiciones de aclimatización no se pudieron mantener óptimas, particularmente con respecto a la frecuencia de riego, mientras que, para el primer experimento las condiciones fueron óptimas. Esto significaría que, incluso en condiciones subóptimas, el tratamiento con HMA nativos promueve la sobrevivencia. Sin embargo, en ambos experimentos, los HMA comerciales no aumentaron la sobrevivencia. Aunque no hay informes en la literatura que prueben comparativamente el uso de mezclas de HMA nativos y comerciales en plántulas micropropagadas, un informe sobre plántulas de yuca (*Munihot esculentu* Crantz) (Azcón-Aguilar *et al.*, 1997), mostró que la especie de HMA *Glomus deserticola* aumentó supervivencia del 75 % a más del 90 % durante la aclimatización, de manera similar a los presentes resultados.

El caso de los parámetros de crecimiento, se observaron patrones muy similares para los tres tratamientos sin diferencias significativas, pero la altura, el diámetro del tallo y el área foliar fueron ligeramente superiores en las plántulas tratadas con HMA comerciales. Entonces, para estos parámetros, hubo una evaluación adicional a los 360 días cuando las plántulas crecían en el vivero antes de ser transferidas al campo con valores significativamente mayores para las plántulas tratadas con HMA (comerciales o nativos) que en las no tratadas. De manera similar, en un estudio con plántulas de cocotero, el volumen y peso seco de raíces primarias, secundarias, terciarias y cuaternarias aumentaron después de 5 a 7 meses de crecimiento en vivero, con una tasa de producción de hojas y circunferencia del tallo significativamente más

altas después 12-18 meses en el campo (Senarathne e Ilangamudali, 2018). Cuando se evaluó el crecimiento en raíces, no hubo diferencia significativa en el número y longitud de raíces primarias entre tratamientos. Sin embargo, el número de raíces secundarias en el día 90 y el día 180 fue significativamente mayor en las plántulas tratadas con HMA comercial que con los otros tratamientos. Senarathne e Ilangamudali (2018) también reportaron un mayor crecimiento de raíces de plántulas de coco luego de 5-7 meses de aplicar un tratamiento comercial de HMA. Asimismo, El Kinany *et al.* (2019) observaron que después de doce meses de crecimiento, el número de raíces de las palmeras datileras mejoró significativamente después de la aplicación de HMA y compost.

En los parámetros fotosintéticos de las plantas, no hubo variaciones significativas cuando las plántulas fueron tratadas con HMA, sin embargo, no se observó un efecto negativo, lo que indica que las plantas no estaban estresadas (F_v/F_m) y que el rendimiento de los valores del índice PI_{ABS} fueron típicos. Se observaron resultados similares en palmeras datileras después de 3 a 4 meses de crecimiento en condiciones de aclimatización cuando se trataron con *Rhizoglyphus irregularis* y un consorcio nativo (Anli *et al.*, 2020a, 2020b). En el caso de la fotosíntesis, fue baja al principio, lo que se esperaba ya que las plántulas provenían de un ambiente *in vitro*.

En un tercer experimento que realizamos, se evaluó la colonización de raíces cuando las plántulas se trataron con HMA comerciales o nativos y hubo diferencias. Se encontró colonización en todas las raíces de las plántulas muestreadas. Había dos patrones de colonización claramente definidos, de acuerdo con las estructuras micorrízicas encontradas, se podría inferir que la morfología de las raíces de cocotero mostró una colonización de tipo intermedia entre los tipos *Arum* y *Paris*, similar a otras especies de palmeras (*Brahea armata*, *Chamaerops humilis* L., *Phoenix canariensis*, *Phoenix dactylifera* L.) (Dreyer *et al.*, 2010). Los patrones fueron diferentes en cantidad y tipo de estructuras, pero también hubo un incremento más temprano en todas las estructuras con HMA nativos. Dentro de este período de 60 días, hubo una caída en el porcentaje de plántulas sobrevivientes de alrededor del 10 % o menos con HMA nativos, pero fue del 20 % o más con HMA comerciales o sin tratamiento con HMA. Entonces, tratar las plántulas con HMA nativos ayudó a reducir el nivel de pérdida de plántulas durante la aclimatización y esto parece estar asociado con el patrón de colonización en los primeros 60 días de la etapa de aclimatización. Esta diferencia en la sobrevivencia asociada con los HMA nativos podría deberse al hecho de que las especies de HMA nativos están mejor adaptadas a las condiciones climáticas y del suelo locales, por lo tanto, es más probable que

sobrevivan y se propaguen mejor después del trasplante que los HMA comerciales (Davidson *et al.*, 2016). Se ha informado que varias especies de plantas mono y dicotiledóneas experimentan un aumento en su sobrevivencia cuando se tratan con HMA (nativos o comerciales), un promedio de 1.31 y 1.50 veces (Cuadro S2), siendo 1.26 veces en plántulas inoculadas con HMA nativos.

Estas diferencias podrían ser el resultado de las mezclas de especies de los HMA nativos o la mezcla de los HMA comerciales. Los HMA comerciales contienen *G. intraradices* y *E. colombiana*, estas especies han favorecido la altura de las plantas y el diámetro del tallo en diferentes plantas huésped (Vázquez-Hernández *et al.*, 2011; Vafadar *et al.*, 2014). Los HMA nativos contienen principalmente los géneros *Glomus* y *Acaulospora*, que son las especies más comunes y ricas, especialmente en la región Neotropical de México, donde existe una codominancia genérica (Polo-Marcial *et al.*, 2021), tanto en ambientes naturales como transformados por el hombre, capaces de adaptarse a una amplia gama de condiciones ambientales y de suelo, así como conferir un mejor efecto a sus huéspedes (Nobre *et al.*, 2018; Estrada *et al.*, 2013). Se ha demostrado que el uso de una mezcla de HMA nativos confiere una compatibilidad hongo-planta y complementariedad funcional, lo cual es esencial para la eficiencia simbiótica de las plantas hospedantes (Goetten *et al.*, 2016; Crossay *et al.*, 2019).

Además, las diferencias observadas en los patrones de colonización podrían estar relacionadas con el papel de las estructuras involucradas en el proceso de colonización. En este proceso, la red de hifas es un elemento clave en la interconexión de las raíces de las plantas en el suelo (Baslam *et al.*, 2014; da Silva *et al.*, 2021). En el caso de los arbuscúlos, se les considera el principal sitio de intercambio simbiótico con la planta huésped (Brundrett *et al.*, 1996), principalmente fósforo inorgánico que es captado por las hifas de los HMA y transferido a las estructuras fúngicas intraradicales (Wipf *et al.*, 2019). También se propone que los coils representan una gran superficie de una interfase intracelular similar a un arbuscúlo, entonces en ausencia de arbuscúlos la planta debe usar a los coils de manera similar a los arbuscúlos, y tienen una mayor vida que los arbuscúlos (Brundrett y Kendrick, 1988; Brundrett y Kendrick, 1988; Brundrett *et al.*, 1996; Jakobsen *et al.*, 2003; Feddermann *et al.*, 2010; Smith y Smith, 2011). Además, las vesículas son fundamentales en la generación de propágulos y reserva de nutrientes (Willis *et al.*, 2013). Klironomos (2003) proporcionaron evidencia que sugiere que las vesículas por sí solas son infectivas, sugiriendo que la presencia de vesículas puede favorecer la colonización exitosa de más raíces. Todas las respuestas reportadas aquí en plántulas de cocotero tratadas con HMA, son el resultado de la interacción HMA-planta, y según lo

informado por Bahadur *et al.* (2019), estas respuestas mediadas por las plantas incluyen la inducción de genes y la inducción de vías metabólicas y fisiológicas.

4.5. CONCLUSIONES

El presente estudio mostró que el uso de HMA nativos incrementó la sobrevivencia de las plántulas de cocotero producidas *in vitro* mediante embriogénesis somática, además los HMA comerciales mejoraron la altura de la planta, el área foliar, el diámetro del tallo y el número de raíces secundarias. Entonces, considerando este efecto diferencial de las mezclas de HMA nativas y comerciales probadas, será muy importante probar ambos tratamientos de HMA aplicados juntos de forma simultánea o secuencial, aplicando primero HMA nativa y luego HMA comercial, para evaluar si los efectos son aditivos. Además, será necesario determinar el comportamiento y la sobrevivencia de las plantas aclimatadas tratadas con HMA después de establecerlas en campo. Finalmente, otra área de investigación que debe considerarse es el estudio de los mecanismos subyacentes de la interacción de los HMA con las plántulas de coco, para comprenderlo mejor. Los resultados de ambos tipos de investigación, básica y aplicada, serán de utilidad para sentar las bases para la mejora del uso de HMA para la aclimatización y desempeño en campo de las plantas micropropagadas.

4. 6. AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue apoyada por CONACYT con el proyecto (No. 2018-2021, FORDECYT 296195), la beca CONACYT No. 733853. Los autores agradecen a Dr. Hassan Polo Marcial por su ayuda durante la identificación taxonómica de especies de HMA nativos.

4.7. MATERIAL SUPLEMENTARIO

Cuadro S1. Aclimatización de plántulas de cocotero micropropagadas bajo diferentes estrategias para mejorar la sobrevivencia *ex vitro* (Cuadro 1.1).

Cuadro S2. Sobrevivencia de diferentes plantas micropropagadas inoculadas con HMA (Anexo 1).

CAPITULO V

PERFIL DE EXPRESIÓN DE GENES TRANSPORTADORES INDUCIBLES EN LA SIMBIOSIS DE HMA Y PLÁNTULAS DE COCOTERO

5.1. INTRODUCCIÓN

La simbiosis entre las raíces de las plantas y los HMA produce un efecto favorable en el crecimiento de las plántulas al incrementar la disponibilidad de nutrientes (Saia *et al.*, 2015). Los HMA son capaces de mejorar la absorción de nutrientes minerales en las plantas, principalmente, en condiciones pobres de nutrientes, a través de transportadores de minerales. Las plantas poseen genes que codifican transportadores, los cuales ayudan a absorber los nutrientes del suelo, como, fosfato, nitrógeno, potasio, azufre, carbohidratos y agua cuando interactúan con los HMA (Lanfranco *et al.*, 2018; Sawers *et al.*, 2008; Berruti *et al.*, 2016; Courty *et al.*, 2016).

La adquisición de Pi en plantas está asegurada por miembros de la familia 1 de transportadores de Pi de la membrana plasmática (*PHT1*) (Kobae *et al.*, 2010). Diferentes análisis de expresión revelaron que los transportadores de fosfato (PT) son inducibles a la interacción con los HMA en diferentes plantas huésped, como *StPT3* en papa, *MtPT4* en *M. truncatula*, *OsPT11* en arroz y *LePT3*, *LePT4*, y *LePT5* en tomate (Harrison *et al.*, 2002; Nagy *et al.*, 2005; Javot *et al.*, 2007).

Dentro de las familias de transportadores de nitrógeno, los transportadores de amonio (*AMT*) inducidos por HMA en plantas han sido bien caracterizados en *Medicago truncatula* (Gomez *et al.*, 2009). Koegel *et al.* (2017) estudiaron el transporte de amonio de los genes *SbAMT3;1* y *SbAMT4*, estos se expresaron en las células corticales de la raíz.

Otro nutriente mineral importante para el crecimiento de las plantas es el potasio (Nieves-Cordones *et al.*, 2016). La familia HAK es una de las más numerosas y donde se localiza el principal transportador de K⁺ de alta afinidad involucrado en la absorción de K⁺ del suelo (Santa-María *et al.*, 2018). Liu *et al.* (2019), demostraron que la inoculación con *Rhizophagus irregularis* mejoró el crecimiento de las plantas de tomate y la adquisición de K⁺. De acuerdo con sus resultados identificaron un transportador de K⁺ de tomate específico de micorriza, *SIHAK10* (*Solanum lycopersicum High-affinity Potassium Transporter10*), que se expresaba exclusivamente en células que contenían arbusculos.

Entre los genes involucrados en el transporte de agua inducible por HMA a través de las raíces se localizan las acuaporinas (Kikuchi *et al.*, 2016). Se sabe que la simbiosis arbuscular altera la expresión de diferentes familias de las acuaporinas (Yadav *et al.*, 2017). La familia de las proteínas NIP están involucradas en el transporte de diversos solutos, sus genes se inducen para mejorar el transporte de agua, lo que resulta en un aumento de la conducción hidráulica de la raíz (Uehlein *et al.*, 2007).

Algunos estudios demostraron que los genes LEA involucrados en el proceso de desecación de semillas (Kumar *et al.*, 2019) aumentaron su expresión durante el estrés salino en plantas inoculadas con HMA, así como un mejor crecimiento y productividad de las plantas (Jahromi *et al.*, 2008; Saxena *et al.*, 2022).

Existe evidencia de la interacción *ex vitro* con hongos micorrízicos arbusculares y plántulas de cocotero para mejorar la sobrevivencia y el crecimiento de las plántulas de cocotero, y esto se asocia al patrón de colonización observado por los tipos de HMA (nativos o comerciales) (Gómez-Falcón *et al.*, 2023). Sin embargo, se requieren más estudios para profundizar los mecanismos bajo los cuales los HMA actúan en la interfaz hongo-planta. Por lo tanto, se seleccionaron genes asociados a transporte de nutrientes y agua inducibles en la interacción micorrízica y se midió su expresión, utilizando plántulas de cocotero inoculadas con HMA nativos y comerciales durante su aclimatización en invernadero.

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1. Material vegetal y tratamientos de inoculación con HMA

Se utilizaron plántulas de cocotero del híbrido Alto del Pacífico Mexicano (ecotipos MxPT1 x MxPT2) micropropagadas por embriogénesis somáticas, se seleccionaron plántulas de acuerdo con una altura uniforme, 2-3 hojas bífidas, 2-5 raíces primarias y presencia de raíces secundarias. Las plántulas se transfirieron individualmente a invernadero utilizando sustrato compuesto por arena, suelo y turba de esfagno (1:1:1), previamente, esterilizado a 120 °C durante 1 h tres veces sucesivas. Los HMA se aplicaron al momento del trasplante con 10-15 g (240 ±15 esporas). Los HMA nativos se obtuvieron a partir de suelo de la rizosfera de cocotero en Yucatán, México, y los HMA comerciales de PHP® Endo Rhyze Mini Plug, México. Se consideraron tres tratamientos: (a) plántulas no inoculadas (Control), (b) plántulas inoculadas con HMA nativos y (c) plántulas inoculadas con HMA comerciales. Todas las plántulas se

colocaron aleatoriamente en el invernadero. Se colectaron raíces de tres plántulas para cada tratamiento a los 0, 15, 30, 60, 90 y 180 días para el análisis de la expresión de genes.

5.2.2. Selección de genes inducibles a la interacción simbiótica

Para medir la intensidad de la micorrización de los HMA, se seleccionaron genes asociados a la captación de nutrientes, con base en la literatura y de acuerdo con el transportoma de simbiosis micorrízica, donde se han evaluado genes fúngicos y vegetales involucrados en el transporte de fosfato, sulfato, azúcar, potasio y agua, en *Lotus japonicus*, *Medicago truncatula*, *Oryza sativa*, *Glycine max* y *Lactuca sativa*. A partir de entonces se trabajó con cinco genes transportadores, fosfato (PHT), amonio (AMT), potasio (HAK) y agua (NIP y LEA).

Para ello, se realizó la búsqueda de las secuencias por familia de los genes (*NIP*, *PHT*, *AMT*, *HAK* y *LEA*) en un transcriptoma de plántulas *in vitro* de cocotero expuestas a SA, el cual se construyó mediante la tecnología de secuenciación Illumina RNA-Seq, donde se obtuvieron 150,486 transcritos con aproximadamente 809 pb de longitud (Datos no publicados). Luego, se compararon con el genoma de accesiones de otras arecáceas (*E. guineensis* y *P. dactylifera*), usando el software BLASTN (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_SPEC=GeoBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch, consulta el 17 de enero de 2020) (Anexo 3). Finalmente, la identificación de motivos conservados se realizó utilizando la herramienta ScanProsite del Portal de recursos de Expasy Bioinformatics (<https://prosite.expasy.org/scanprosite/>, consulta el 28 de enero de 2020) se descartaron aquellos bajo esta condición y sólo se consideró un gen por cada familia.

5.2.3. Análisis de expresión de genes

Se realizó un análisis de PCR en tiempo real (RT-qPCR) para evaluar la expresión de genes de plántulas micropropagadas de cocoteros en respuesta a la inoculación de HMA nativos y comerciales.

Para cada gen, se diseñaron dos pares de oligonucleótidos específicos (A y B) de los genes *NIP*, *PHT*, *AMT*, *HAK* y *LEA* en el software OligoPerfect Primer Designer, y se usaron para las reacciones de amplificación con Sybr Mix (Thermo Scientific, Luthuania). Para las amplificaciones de los genes se utilizó DNA genómico y cDNA de tejido de cocotero. Se evaluaron diferentes temperaturas de alineamiento para cada gen y se realizó una curva estándar en cada par de oligonucleótidos para determinar la eficiencia y especificidad de cada uno de éstos (Anexo 4-5), luego, se seleccionó en cada par aquel con el mejor CT, y éstos se

utilizaron en el análisis de expresión (Cuadro 5.1). Se incluyó una curva estándar del gen constitutivo 18S, como control interno.

Cuadro 5.1. Oligonucleótidos específicos de genes utilizados en el análisis de expresión de genes.

Gen	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>NIP1-A</i>	ATGTAAGTGATGGCGGGCAA	TCTTGCCCTCTGTGCAGAAG
<i>PHT1;5-B</i>	CAGAGACGGTGATGGCTACC	ACCATCATGTCCGAGTACGC
<i>AMT3;3-A</i>	GAATGCGGAGTTCAAAGCCC	GCGTACCAGGGGAGTAACAC
<i>HAK1;1-A</i>	AGCAGCGATGACAAGTGGAA	AATGCTGTTGGTATGGCGGA
<i>LEA1;4-B</i>	CCCACCCGCATCTCATAGTC	ACGACCAAGTTGGACATCCC
<i>18S</i>	CGGCTACCACATCCAAGGAA	GCTGGAATTACCGCGGCT

Para la extracción de RNA, se utilizó el kit de Plant/Fungi total RNA purification (Norgen, Canadá), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y la pureza del RNA total se determinaron utilizando un espectrofotómetro NanoDrop One (Thermo Scientific, EE. UU.). La integridad del RNA total se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % teñido con gel red. El extracto de ácido nucleicos se trató con TURBO DNase-free (Invitrogen, Luthuania) y la síntesis de cDNA se realizó con 1 µg de RNA total con el protocolo de Maxima H Minus Reverse Transcriptase (Thermo Scientific, Luitania) de acuerdo al protocolo del fabricante. Las amplificaciones se realizaron en un Rotor-GenQ (QUIAGEN) usando diferentes condiciones de amplificación (Cuadro 5.2). Todas las reacciones de PCR se realizaron por triplicado. Los resultados de RT-qPCR se analizaron mediante el método comparativo de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Schmittgen y Livak, 2008).

Cuadro 5.2. Programas de amplificación de genes.

Programa	Gen	Condiciones de amplificación
1	<i>NIP, LEA</i> <i>PHT</i>	2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C, 15 s a 95 °C (35 ciclos), 30 s a 61°C
2	<i>AMT, 18S</i>	2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C, 15 s a 95 °C (35 ciclos), 30 s a 55°C y 30 s a 72 °C
3	<i>HAK</i>	2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C, 15 s a 95 °C (35 ciclos), 30 s a 60 °C y 30 s a 72 °C

5.2.4. Análisis estadístico

Se utilizó una prueba T-student para comparar la expresión entre los dos tratamientos (HMA nativos y comerciales). El análisis estadístico de los datos se realizó con Minitab® 17.1 (EE. UU.). Se realizaron pruebas de Lilliefors, Cochran y Bartlett para normalidad y homogeneidad de varianzas.

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1. Perfiles de expresión de los genes *HAK*, *PHT*, *AMT*, *LEA* y *NIP* en respuesta a los tratamientos con HMA

Para determinar si los genes *HAK*, *PHT*, *AMT*, *LEA* y *NIP* respondían a la interacción con los HMA realizamos un análisis RT-qPCR. Los cinco genes respondieron a la inoculación de HMA nativos (Figura 5.1). En todos los casos el perfil de expresión de las plantas inoculadas con HMA nativos presentaron los niveles más altos a los 15 días después del trasplante. La expresión de *PHT*, *AMT* y *HAK* incrementó a 105.66, 139.7 y 359.5 veces, mientras que, los niveles de expresión de *LEA* y *NIP* aumentaron 9-22 veces respecto al control. Después la expresión de todos los genes disminuyó drásticamente. Al día 30, la expresión de *LEA* y *NIP* incrementó de 16-23 veces. En el caso de *HAK*, *AMT* y *PHT* incrementó hasta 10 veces. A los 60 días no hubo un cambio significativo en la expresión en los cinco genes con respecto al grupo control. Para el día 90, el nivel de expresión de *HAK* y *PHT* fue de 2-4 veces y en el caso de *AMT* no hubo cambios. En el caso *LEA* y *NIP*, su expresión incrementó 5 veces. A los 180 días, la expresión de los cinco genes disminuyó con respecto al control.

En el caso de las plantas inoculadas con hongos comerciales éstas presentaron un patrón diferente. Su expresión fue menor que el de los hongos nativos y se presentó a los 60 días de iniciado el trasplante. La expresión de *HAK* incrementó 2.8 veces, en *PHT* incrementó 2.2 veces, y, en *AMT* 4.2 veces. La respuesta a la inoculación de HMA comerciales en *LEA* y *NIP* fue de 5-7 veces. Después de este periodo la expresión de los cinco genes disminuyó por debajo del grupo control.

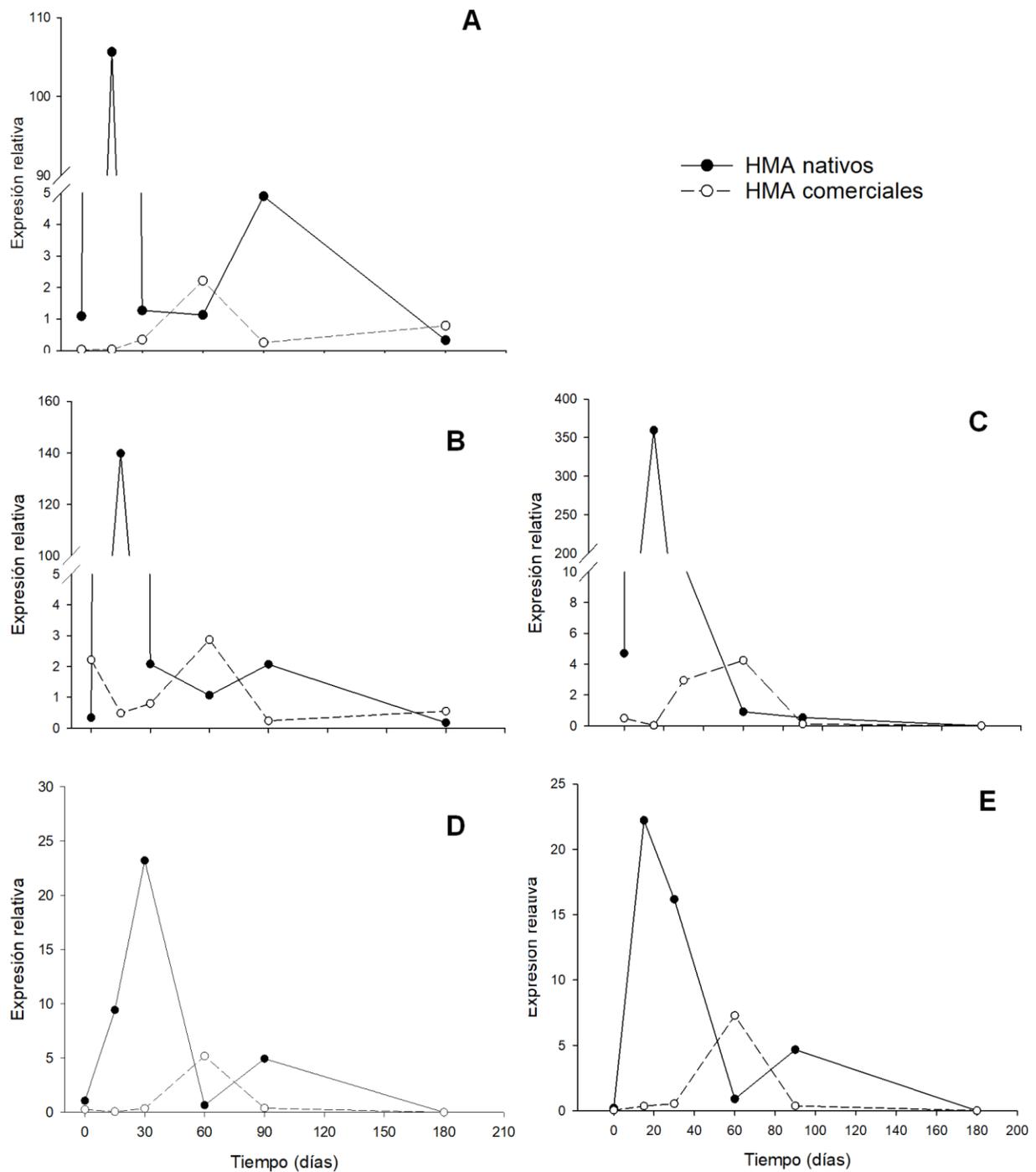


Figura 5.1. Perfil de expresión de los genes asociados a transporte de nutrientes. A) *PHT*, B) *HAK*, C) *AMT*, D) *LEA*, y E) *NIP* asociados a transporte de nutrientes y agua. El gen 18S ARNr se utilizó como gen de referencia para el análisis RT-qPCR. El nivel de expresión del tratamiento de control se fijó en uno. El valor de expresión relativa se calculó con tres réplicas independientes mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Schmittgen y Livak, 2008). La media de tres réplicas técnicas \pm D.E. se representa con líneas.

Nuestros resultados mostraron que la expresión relativa de los cinco genes, en plántulas inoculadas con HMA nativos, se incrementó a 15 días, mientras que, se induce más tarde en plántulas inoculadas con HMA comerciales (60 días). La expresión temprana, en plántulas tratadas con HMA nativos podría asociarse con el patrón de colonización en plantas con HMA nativos, donde durante los primeros 30 días hubo una mayor colonización asociado a una mayor (Figuras 5 y 6, capítulo IV). En el caso de la expresión de genes que interaccionaron con los HMA comerciales, respondieron hasta los 60 días coincidiendo también con los datos de colonización, lo que podría estar indicando que los HMA comerciales promueven cambios más tardíamente.

En estudios previos se ha encontrado una regulación positiva de los genes transportadores de fosfato, nitrógeno, sulfato, potasio y agua durante el proceso de colonización. De hecho, se ha correlacionado un crecimiento mejorado en diferentes especies de plantas (Saia *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2019) tras el incremento en la expresión de estos genes.

AMT es un gen detectado únicamente en células con arbusculos. La presencia de este transportador en el micelio intraradical sugiere que los HMA pueden proporcionar un mecanismo para la eliminación de cualquier exceso de NH_4^+ acumulado en el espacio periarbuscular y pueden compartimentarlo en estructuras como las vacuolas, neutralizando un posible efecto fitotóxico de este nutriente en la planta huésped (Calabrese *et al.*, 2016). En el caso de la expresión regulada positivamente de genes acuaporina, podría asociarse a que la planta aumenta su permeabilidad al agua y esto permite una mayor tasa de flujo de agua transcelular (Kikuchi *et al.*, 2016). Además, la expresión de *NIP* potencialmente puede actuar como un sistema de transporte de baja afinidad para el nitrógeno en forma de amonio o amoniaco (Uehlein *et al.*, 2007). Evaluar la expresión de los genes *LEA* permite determinar si la simbiosis con los HMA puede alterar el patrón de acumulación de estas proteínas bajo estrés por sequía y si tales alteraciones funcionan en la protección de las plantas huésped (Kumar *et al.*, 2019).

5.4. CONCLUSIÓN

Los genes *HAK*, *PHT*, *AMT*, *LEA* y *NIP* presentaron su pico de expresión a los 15 días de la inoculación con los HMA nativos, y en las plántulas tratadas con HMA comerciales presentaron el pico de expresión a los 60 días de aclimatización. Estos resultados sugieren que la simbiosis con los HMA mejora la absorción de nutrientes y transporte de agua y esto se traduce en un mejor desempeño en las plántulas y en una mejora en la sobrevivencia.

CAPÍTULO VI

ACLIMATIZACIÓN DE PLÁNTULAS DE COCOTERO CON DIFERENTES MEZCLAS DE SUSTRATO A BASE DE FIBRA DE COCO Y HMA

6.1. INTRODUCCIÓN

La etapa de aclimatación implica la transferencia de las plántulas a un ambiente de transición, donde un aumento en la luz o temperatura y bajos porcentajes de humedad provocan efectos adversos para los procesos fotosintéticos y de desarrollo de las plántulas (Kumar y Rao, 2012). Por lo que, un modo para disminuir estos efectos es la implementación de una etapa de pre-aclimatación utilizando un sustrato con alta capacidad de retención de humedad, es decir, primero un periodo de adaptación *ex vitro* seguido de un periodo de aclimatación (Pospíšilová *et al.*, 1999). El sustrato utilizado para la aclimatación de plántulas de cocotero micropropagadas está constituido por arena, suelo y turba (Sáenz-Carbonell *et al.*, 2016), y recientemente sustratos micorrízicos (Gómez-Falcón *et al.*, 2023), sin embargo, debido a que la turba es un recurso limitado, el uso de sustratos a base de coco (polvillo y fibra) está cobrando cada vez más importancia en la agricultura por sus múltiples ventajas, entre ellas, una mayor retención de agua, a diferencia de otros sustratos (Masquelier *et al.*, 2022). Este sustrato está hecho de cáscara y fibras cortas del mesocarpio de la nuez de *Cocos nucifera*, siendo un subproducto de la industria del cocotero (Mariotti *et al.*, 2020). Diferentes autores han comparado los sustratos de coco con otros sustratos (perlita, lana de roca, aserrín) utilizados en el cultivo de hortalizas en invernadero, encontrando mejores resultados en el rendimiento y productividad de los cultivos, así como, una mejora en la estructura del suelo, almacenamiento de agua y nutrientes (Mastouri *et al.*, 2005; Gómez-Bellot *et al.*, 2020). Existe evidencia que indica que el uso de diferentes mezclas de sustratos a base de fibra de coco también favorece la sobrevivencia, por ejemplo, en la aclimatación de *Elaeis guineensis Jacq.* se observaron mejores resultados con mezcla de un sustrato comercial a base de coco con vermiculita y turba comercial (Sparjanbabu *et al.*, 2020). Adicionalmente, los sustratos pueden verse favorecidos por el uso de microorganismos como mejoradores (Cortés-Patiño *et al.*, 2015). Entre los microorganismos del suelo, los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) establecen relaciones simbióticas con las plantas, mejoran las propiedades del suelo, promueven el desarrollo radicular, la adquisición de nutrientes y las propiedades fisiológicas de la planta, confiriendo incluso cierta tolerancia a la planta frente a estrés ambiental (Berutti *et al.*, 2016). Por lo tanto,

en este trabajo se evaluaron diferentes mezclas de sustratos a base de coco y HMA en el establecimiento de un sistema de pre-aclimatización de plántulas de cocotero en invernadero.

6.2. MATERIALES Y MÉTODOS

6.2.1. Sitio experimental

Los experimentos se llevaron a cabo en las instalaciones del invernadero 1 del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. en Mérida Yucatán y en el laboratorio de cocotero durante el periodo de noviembre 2021-enero 2023. La temperatura del invernadero fue de 30.4 ± 2.0 °C y la humedad relativa fue de 53.9 ± 17.2 % con picos de temperatura de hasta 45 °C y humedad inferior al 30 %. Para este experimento, se colocó una malla sombra en la parte lateral del invernadero. Las condiciones del cuarto de cultivo fueron, temperatura 27 ± 2.0 °C, humedad relativa (65-75 %) y fotoperiodo de 16 h ($45-60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPFD).

6.2.2. Material vegetal y biológico

Se utilizaron plántulas de cocotero de la variedad Alto de Pacífico Mexicano seleccionadas por altura uniforme (10-12 cm), 3-5 hojas bífidias y 2-5 raíces primarias con presencia de raíces secundarias.

Se utilizó un inóculo de HMA nativo de la rizosfera de cocotero.

Se utilizaron dos sustratos comerciales de coco (Hydroenvironment), el primero fue polvillo de coco al 100 % y el segundo fue fibra de coco (50% fibra, 50% polvillo) y un sustrato local compuesto por turba, arena y suelo.

6.2.3. Pre aclimatización de plántulas de cocotero

Experimento 1.

Se estableció un sistema de pre-aclimatización, durante 30 días en cuarto de cultivo bajo condiciones controladas, utilizando charolas forestales y polvillo de coco estéril (100 %), previamente hidratado en una solución mineral (Anexo 6) durante 20 minutos. Posteriormente, se transfirieron a bolsas de vivero utilizando un sustrato compuesto por arena, suelo y HMA.

Se utilizaron 20 plántulas en cada caso, para el grupo control, las plántulas se trasplantaron en charolas durante 30 días en condiciones de invernadero y luego se trasplantaron a bolsa de

vivero. Para la aclimatización de las plántulas se utilizó el procedimiento descrito en el capítulo III con algunas modificaciones; en este caso, no se realizaron los cortes a la bolsa que se coloca como cubierta, al momento del trasplante, se realizaron progresivamente y se mantuvieron cubiertas durante 3 semanas. El seguimiento al crecimiento y sobrevivencia de las plántulas se realizó durante seis meses.

6.2.4. Aclimatización de plántulas de cocotero con diferentes mezclas de sustratos a base de fibra de coco y HMA

Experimento 2.

Para este experimento, las plántulas se aclimatizaron directamente en el invernadero. Se utilizaron 10 plantas por cada tratamiento, donde se monitoreó el crecimiento y la sobrevivencia de las plántulas. Se consideraron cuatro tratamientos, 1) Sustrato compuesto, 2) Sustrato compuesto y fibra de coco (1:1), 3) Fibra de coco, sustrato compuesto y HMA y 4) Sustrato compuesto modificado (arena, suelo, fibra de coco). El seguimiento se realizó durante seis meses en invernadero.

6.2.5. Evaluación del crecimiento y sobrevivencia de las plántulas

La sobrevivencia se monitoreó mensualmente por conteo directo, y para el crecimiento de las plántulas se midió la altura de planta (cm), el diámetro del tallo (cm) y el área foliar (cm²).

6.2.6. Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron con un diseño experimental completamente aleatorio. El análisis de datos se evaluó por un ANOVA simple y análisis de medias por Fisher.

6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Previo a los resultados que se presentan en este capítulo, se realizaron tres experimentos para establecer las condiciones de aclimatación (establecimiento de trasplante en charola, riego, selección de mezclas de sustratos, entre otras variables) (datos no mostrados).

6.3.1. Efecto de la pre-aclimatización en la sobrevivencia y crecimiento de plántulas de cocotero

Los resultados de la sobrevivencia de las plántulas de cocotero pre-aclimatizadas se muestran en la Figura 6.1.

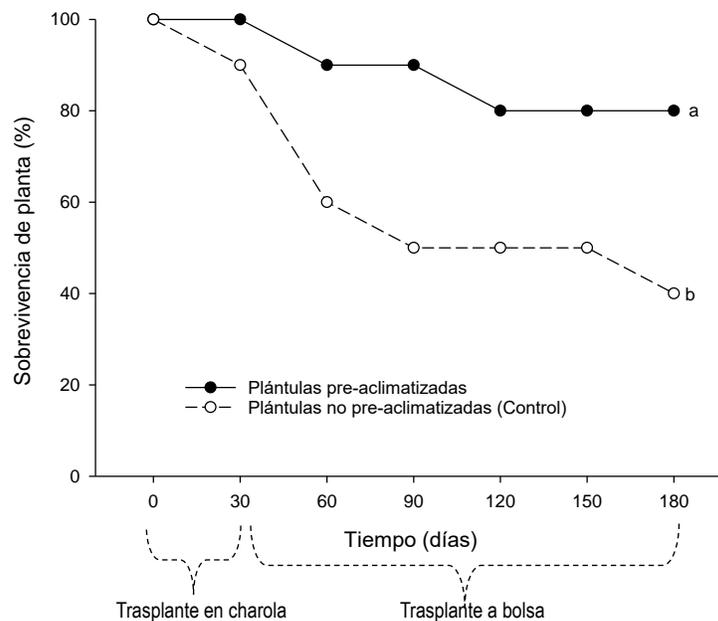


Figura 6.1. Sobrevivencia de plántulas después de 6 meses del trasplante. Cada línea representa la media de 20 plantas por tratamiento. Letras diferentes representan diferencias significativas. Ambos grupos de plántulas se colocaron en charola durante 30 días, un grupo bajo condiciones controladas y el otro grupo en el invernadero.

A los 30 días, las plántulas pre-aclimatizadas presentaron una sobrevivencia de 100 %, y las plántulas que no se pre-aclimatizaron tuvieron una sobrevivencia de 90 % (Figura 6.1). Reyes-López *et al.* (2016), reportaron resultados similares de sobrevivencia (93.6 %) en las plántulas de *vainilla planifolia* pre-aclimatizadas bajo condiciones controladas de luz, temperatura y humedad, sin embargo, durante la aclimatación, reportan una sobrevivencia de 88.18 %.

Durante la aclimatación (trasplante a bolsas de vivero), las plantas pre-aclimatizadas presentaron una sobrevivencia de 80 %, resultados similares se obtuvieron en otros experimentos de aclimatación donde se obtuvo una sobrevivencia de 80 % en el grupo control, sin embargo, se considera que esta etapa promueve una mejor robustez en las plantas y un rápido crecimiento de raíces (Figura 6.2). Las plántulas que no se pre-aclimatizaron

presentaron una sobrevivencia del 40 % después de cinco meses de aclimatización. Esta diferencia podría asociarse a las condiciones bajo las cuales se realizó el proceso de aclimatización, debido a que las plántulas primero se trasladaron en charola en invernadero, posteriormente, se trasladaron a bolsas de vivero, lo que pudo ocasionar algún tipo de estrés. Después del trasplante a bolsa, en las plántulas que se mantuvieron en charola durante 30 días en el invernadero se observaron hojas secas y marchitez, en contraste, las plántulas que se pre-aclimatizaron en charola bajo condiciones controladas se observaron con una mejor robustez y sin daño aparente.

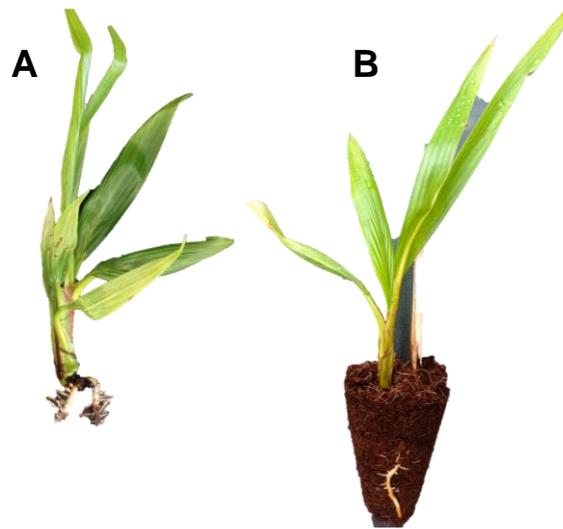


Figura 6.2. Plántulas de cocotero con raíces. A) Al momento del trasplante en charola. B) Crecimiento después 30 días de pre-aclimatización en charola utilizando polvillo de coco como sustrato.

Respecto al crecimiento de las plántulas, no hubo diferencias significativas en la altura y diámetro de las plantas. A los 180 días, las plántulas pre-aclimatizadas presentaron una altura de 25.9 ± 8.5 cm (Figura 6.3A) y un diámetro del tallo de 0.86 - 0.93 cm (Figura 6.3B). El área foliar, incrementó significativamente (69.0 ± 18.5 cm²) en las plántulas pre-aclimatizadas a diferencia de las plántulas que se mantuvieron en invernadero desde el día 0 (34.0 ± 13.2 cm²) (Figura 6.3C).

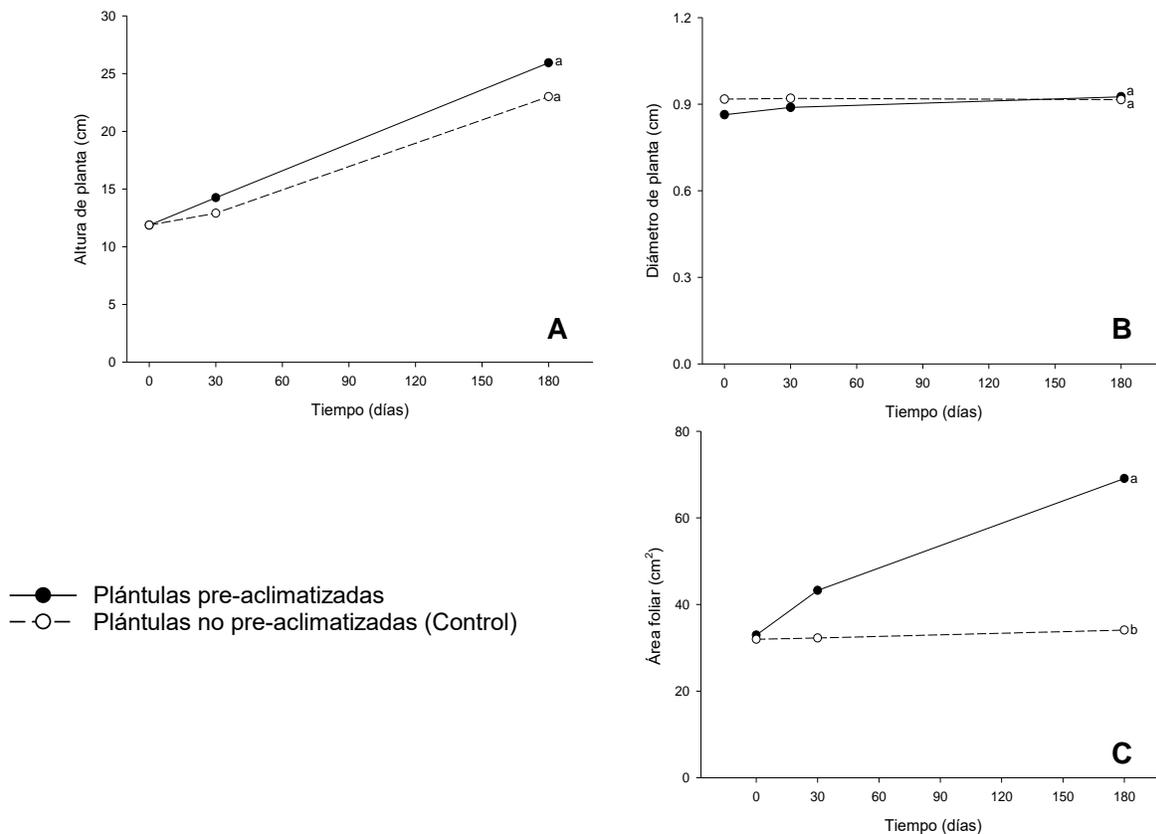


Figura 6.3. Evaluación de parámetros de crecimiento de las plántulas después de 180 días de trasplante. Cada línea representa la media de 20 plantas por tratamiento \pm D.E. A) Altura de planta, B) Diámetro de tallo, C) Área foliar. Letras diferentes representan diferencias significativas.

6.3.2. Efecto de las diferentes mezclas de sustrato de coco en la aclimatización de plántulas de cocotero

En las plántulas donde se utilizó sustrato compuesto (control) la sobrevivencia fue de 80 %, para el caso de las plantas con fibra de coco y sustrato compuesto la sobrevivencia fue de 90 %. La sobrevivencia de las plántulas donde se usó fibra de coco, sustrato compuesto y HMA fue 90 % y las plántulas con sustrato compuesto modificado fue de 80 % (Figura 6.4). Resultados similares de sobrevivencia se obtuvieron en otros experimentos donde se inocularon HMA (87-92 %), esto valida los resultados obtenidos cuando se utilizan HMA y se demuestra el efecto benéfico del uso de fibra de coco en la aclimatización de plántulas. Hernández-Meneses *et al.* (2018), reportaron resultados similares de sobrevivencia (93 %) en las plántulas de *Vriesea heliconioides* adicionando fibra de coco al sustrato. Sin embargo, en el grupo control (sustrato compuesto) se había reportado una sobrevivencia máxima de 67 a 77

%, a diferencia de este experimento, esto podría atribuirse a un mejor control de las plantas y de mantenimiento en las instalaciones del invernadero, debido a que se colocó una malla sombra en la parte lateral.

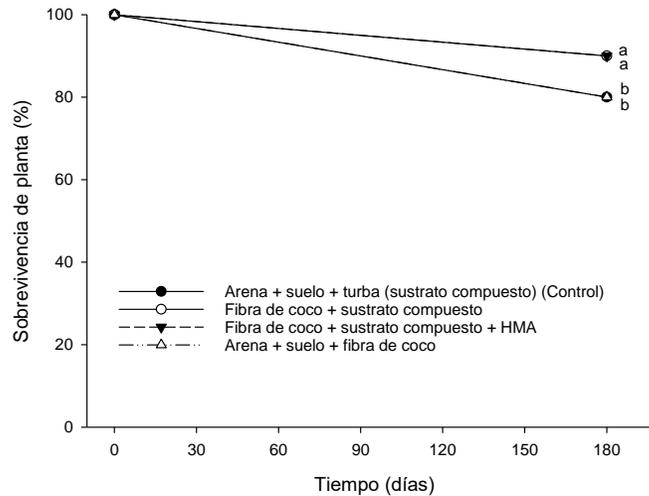


Figura 6.4. Sobrevivencia de plántulas de cocotero aclimatizadas en invernadero con diferentes mezclas de sustratos. Letras diferentes representan diferencias significativas. El sustrato compuesto se consideró el grupo control.

La altura de las plantas incrementó en promedio a 19.37 cm, siendo el sustrato compuesto (21.0 ± 3.98 cm) y la fibra de coco con sustrato compuesto (20.0 ± 5.01 cm) los mejores tratamientos (Figura 6.5A). El diámetro de tallo inicial fue de 0.87 cm e incrementó 1.23 veces durante los seis meses en invernadero, siendo el tratamiento de fibra de coco más sustrato compuesto el de mayor incremento (1.48 veces) (Figura 6.5B). El área foliar fue el parámetro con mejor respuesta respecto al valor inicial, en este caso, el tratamiento de fibra de coco más sustrato compuesto y fibra de coco más sustrato compuesto más HMA tuvieron un incremento superior a los otros tratamientos, 3.83 y 3.88 veces, respectivamente (Figura 6.5C).

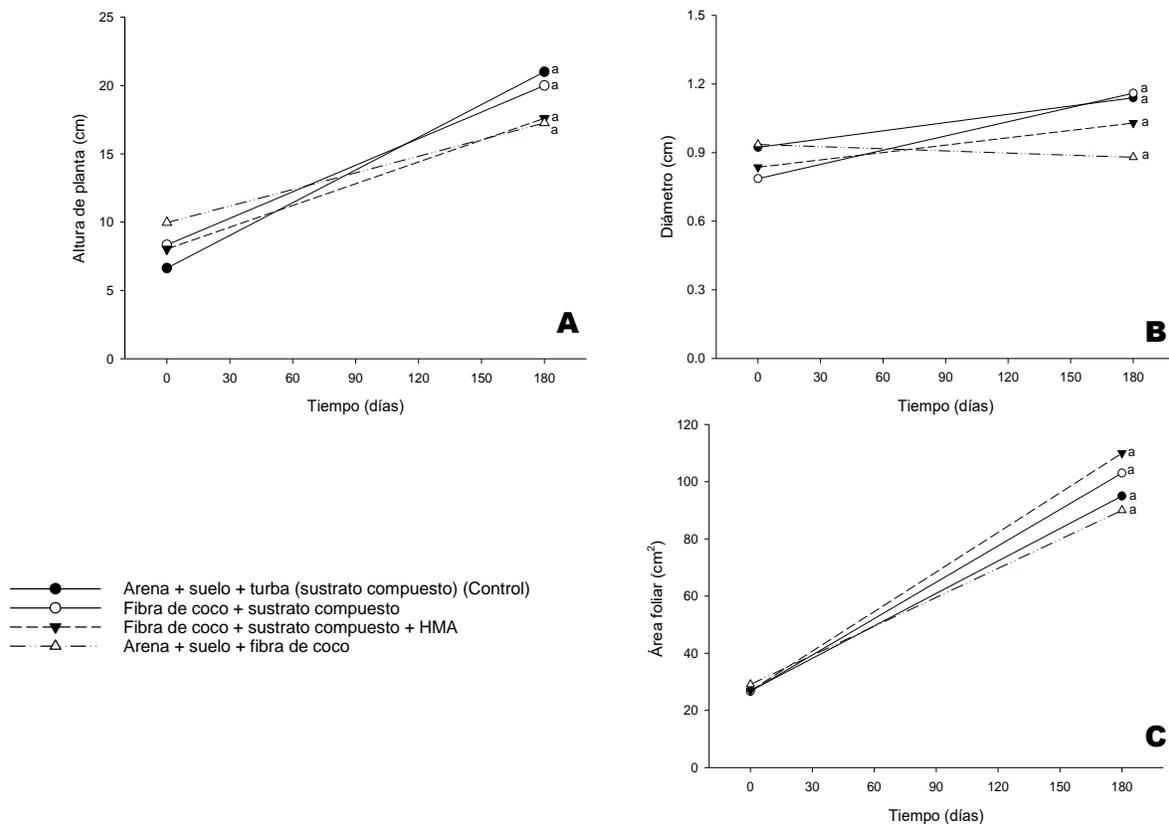


Figura 6.5. Parámetros de crecimiento de las plántulas después de 6 meses de aclimatización. Cada columna representa la media de 10 plantas por tratamiento \pm D.E. A) Altura de plantas, B) Diámetro de tallo, C) Área foliar.

Sparjanbabu *et al.* (2020) realizaron un estudio en *Elaeis guineensis* a partir de embriones cigóticos maduros, donde las plántulas fueron aclimatizadas utilizando ocho medios sin suelo y sus combinaciones, después de 60 días de crecimiento en el medio sin suelo (vermiculita, cocopeat y soilrite) no encontraron efectos significativos entre tratamientos, sin embargo, mostraron mejores resultados en términos de caracteres morfológicos de la planta como longitud del brote, longitud de la raíz, número de hojas, largo de hoja y ancho de hoja. En un estudio realizado por Gomes *et al.* (2015), evaluaron la sobrevivencia de plántulas de *Elaeis guineensis* obtenidas de embriones somáticos que carecían de raíces para mejorar los niveles de enraizamiento, las cuales aclimatizaron en una mezcla de sustrato comercial, constituido por fibra de coco y turba, suplementadas con ácido indol-3-butírico (IBA), en sistema bifásico de medio de cultivo y sin carbón activado obteniendo una sobrevivencia de 82.1 % similar a nuestros resultados. Rabeh *et al.* (2021) menciona un estudio de aclimatización en *Phoenix dactylifera*, bajo tres sistemas de cultivo, aspersión foliar y riego con sorbitol y ácido salicílico, usando como sustrato una mezcla de fibra de coco y tierra suave, la tasa de sobrevivencia fue

de 91 % después de 3 semanas, momento en el cual las plantas tenían hojas bien desarrolladas. En otro estudio donde utilizaron hongos micorrízicos y sustratos a base de fibra de coco y polvillo de coco, en plántulas de *Zingiber spectabile* Griff, midieron el potencial de HMA aislados y combinados *Glomus etunicatum* y la mezcla de *G. etunicatum* con *Gigaspora margarita*, demostrando que la sobrevivencia incremento después del periodo de aclimatización casi al 100 %, pero el desarrollo de las plántulas fue menor que el grupo control (Oliveira *et al.*, 2010).

6.4. CONCLUSIÓN

La etapa de pre-aclimatización en charola bajo condiciones controladas promovió 100 % de sobrevivencia en las plántulas de cocotero micropropagadas, después de 30 días y una mejor respuesta en el área foliar después de 180 días.

Las plántulas de cocotero que se aclimatizaron con las diferentes mezclas de sustratos tuvieron una sobrevivencia de 90 % en los tratamientos donde se integró fibra de coco y HMA, sin embargo, no hubo cambios significativos en el crecimiento de las plántulas.

CAPITULO VII

DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

7.1. DISCUSIÓN GENERAL

El objetivo de este trabajo fue evaluar un inóculo de HMA nativos (de duna costera de la península de Yucatán), compuesto por arena, raicillas y propágulos infectivos en el desarrollo de plántulas de cocotero en invernadero, comparado con un inóculo comercial (Endo Rhyze, Mini Pug, México). Con anterioridad se han realizado estudios para evaluar la sobrevivencia de plántulas de cocotero a partir de embriones cigóticos. En general, aunque se han hecho esfuerzos para aumentar la tasa de sobrevivencia, no se ha establecido un protocolo eficiente de aclimatización en términos económicos y comerciales. Por lo que, la inoculación de HMA durante la etapa de aclimatización incrementa la sobrevivencia y el acelera el crecimiento de las plántulas de cocotero, resultados similares han reportado en otras palmeras como *E. guineensis* y *P. dactylifera* (Schultz, 2001; El Kinany *et al.*, 2019).

En una primera etapa evaluamos la adición exógena de reguladores de crecimiento *in vitro* para la promover un mejor desarrollo de raíces en plántulas de cocotero con la finalidad de lograr una interacción funcional con los HMA. Los reguladores de crecimiento juegan un papel esencial en el crecimiento y desarrollo de raíces, principalmente en raíces laterales. Sin embargo, a pesar de que hubo una promoción en el crecimiento de raíces primarias y laterales, entre los tratamientos con NAA, SNP y controles, no sucedió un cambio significativo. Durante la discusión del capítulo II, sugerimos de acuerdo con otros estudios, que la concentración de ambos reguladores fue un factor que influyó en el desarrollo de las raíces, sin embargo, otros factores asociados a este proceso están relacionados con el pH del medio de cultivo, debido a que puede afectar la respuesta de enraizamiento, según Evans *et al.* (1980) y Pan y Staden (2002), el pH ácido promueve el alargamiento de las raíces. Por otro lado, los medios de cultivo en los que se subcultivan los diferentes tejidos durante el proceso de micropropagación, contienen otros reguladores de crecimiento (2,4-D, BA y GA₃) que son de utilidad en otras etapas, pero, pueden inhibir la formación de raíces, principalmente raíces laterales (Gou *et al.*, 2010; Mao *et al.*, 2020), este fenómeno se asocia a una liberación de estas sustancias aún en los medios libres de reguladores de crecimiento (Meijer *et al.*, 1999). Hasta ahora, se conoce que el NAA y el SNP promueven el crecimiento de raíces, sin embargo, aún no se ha elucidado la relación entre 2,4-D, BA, GA₃, - NAA y SNP en el crecimiento de raíces, entonces, es posible

que la liberación de estas sustancias haya interferido negativamente el efecto de los reguladores evaluados.

Previo a los experimentos de aclimatización, realizamos algunas evaluaciones a los HMA nativos que incluyeron la abundancia de especies, el potencial infectivo, porcentaje de colonización y la validación taxonómica de las especies.

El porcentaje de colonización de las raíces en los HMA nativos al momento de la aclimatización fue 60.6 ± 3.21 %, de acuerdo con Torres-Arias *et al.* (2017), se considera un valor alto cuando supera el 50 %. El tipo de morfología de colonización que se observó posiblemente esté asociado al tipo *Paris-Arum*, debido a que se encontraron pocas estructuras arbusculares y mayor presencia de coils, resultados similares se han reportado en otras especies de palmeras (Dreyer *et al.*, 2010).

Se encontraron 13 especies de HMA, *Dominikia aurea*, *Glomus glomerulatum*, *Rhizoglosum microaggregatum* y *Sclerocystis sinuosa* se consideran nuevos registros para el cultivo de cocotero y recientemente se reportaron por Lara-Pérez *et al.* (2020); particularmente, *G. glomerulatum* se considera una especie generalista debido a que se ha detectado en diferentes hospederos y condiciones ambientales (Torres-Arias *et al.*, 2018). Con anterioridad se han evaluado en diferentes cultivos (Quiñones-Aguilar *et al.*, 2016; Hibilik *et al.*, 2018). Las especies *Glomus aggregatum* y *Claroideoglosum etunicatum* son conocidas como especies generalistas, ampliamente distribuidas en sistemas de cultivo mixto, incluido cocotero (Rajeskumar *et al.*, 2012). *Entrophospora infrequens* y *Acaulospora alpina* también han sido reportadas en algunos ecosistemas (Polo-Marcial *et al.*, 2021). La diversidad especies encontradas podría atribuirse a la diferencia en hábitat, factores ambientales y fertilidad del suelo en cada sitio de muestreo. Esta variabilidad podría representar una ventaja desde el punto de vista agronómico debido a que la planta de cocotero tiene un sistema de raíz que carece de pelos de raíz y esto limita el transporte agua y nutrientes, principalmente fósforo, por lo que, la asociación con una mezcla de especies de HMA podría ser más efectivo para las plantas.

Con respecto a la abundancia de las especies, las esporas de *Entrophospora infrequens* y *Glomus* sp. fueron las especies con una mayor ocurrencia, con un 30 y 24 % respectivamente. Con anterioridad el género *Glomus* se ha reportado como una especie dominante para el cultivo de cocotero (Nivedha *et al.*, 2019). Las otras especies se encontraron con menor

frecuencia, por ejemplo, *Acaulospora* sp. con un 18 %, *Acaulospora alpina* con un 12 % y el resto de las especies se observó una frecuencia relativa menor al 6 %.

Por otro lado, utilizamos un inoculante comercial formulado por *R. intraradices* y *E. colombiana*, especies ampliamente distribuidas en diferentes ecosistemas y huéspedes (Polo-Marcial *et al.*, 2021), algunos autores mencionan que la interacción micorrízica en plantas invasivas o naturalizadas, como el cocotero, se genera principalmente con especies generalistas, tal es el caso de *R. intraradices* (Moora *et al.*, 2011). Además, se ha demostrado que esta especie es altamente infectiva, es decir, que tiene la capacidad de penetrar e invadir la raíz intensamente (Tapia-Goné *et al.*, 2010). Nava-Gutiérrez *et al.* (2011) realizaron un estudio en plantas de papaya bajo un sistema hidropónico en diferentes concentraciones de fósforo, encontrando resultados favorables en el uso de esta especie (*R. intraradices*).

Posteriormente, realizamos diferentes estudios de aclimatización en invernadero donde evaluamos diferentes etapas de crecimiento de las plántulas y el efecto de la inoculación por HMA, así como el uso de diferentes mezclas de sustratos; monitoreamos la sobrevivencia y crecimiento de las plántulas hasta por 12 meses, bajo condiciones de invernadero. De acuerdo con los resultados de aclimatización utilizando plántulas en dos etapas de crecimiento, encontramos que las plántulas de menor tiempo en cultivo *in vitro*, no tuvimos éxito, aún con la inoculación de los HMA, debido a que carecen de un sistema de raíces bien desarrollado, esta ausencia de raíces secundarias y terciarias, no permitió la interacción con los HMA, se conoce que la simbiosis de los HMA se origina en las células corticales de las raíces laterales principalmente.

Las plántulas utilizadas para los experimentos de aclimatización fueron seleccionadas previamente con base en altura de planta y el número de raíces, características similares reportaron Pech-Aké *et al.* (2004), estos autores observaron que el éxito en la sobrevivencia está directamente relacionado con la cantidad de hojas bífidas y número y longitud de raíces al momento del trasplante. En nuestro caso, la sobrevivencia más alta se observó en las plantas inoculadas con HMA nativos (87-92 %) y en los tratamientos donde se adicionó fibra de coco y HMA en el sustrato compuesto (90 %), a diferencia de los HMA comerciales (67-77 %), estos resultados son consistentes con los patrones de colonización.

Estudios previos han demostrado que los beneficios de los HMA dependen de la combinación de taxones de plantas, taxones fúngicos y condiciones ambientales, por lo que, se ha hecho

énfasis en los HMA nativos, ya que se ha reportado que confieren mejores beneficios que las especies exóticas o introducidas y ayudan a la restauración de especies de plantas nativas (Emam, 2016). Con base en lo anterior, en este trabajo se encontró que las plantas inoculadas con HMA nativos además de mejoran significativamente la sobrevivencia, tienen un efecto en el crecimiento similar o igual a las plantas inoculadas con los HMA comerciales, en términos de altura, diámetro y área foliar después de 12 meses de inoculación.

De forma general los parámetros de crecimiento evaluados en este trabajo no aumentaron en las primeras etapas de crecimiento (1-3 meses en invernadero), su desarrollo se observó en las etapas posteriores de crecimiento (a partir de los seis meses), esto se explica si se considera que el cocotero es un cultivar de crecimiento lento (Talavera *et al.*, 2005). Senarathne e llangamudali (2018), realizaron un estudio con plantas de cocotero inoculadas con HMA comerciales y encontraron un patrón similar en el crecimiento de las plantas, hubo un efecto significativo después de 7 meses del establecimiento de las plantas.

Evaluamos dos parámetros fotosintéticos (fluorescencia de la clorofila y fotosíntesis). La clorofila juega un papel importante como indicador de la calidad de las plantas durante la aclimatización (Matysiak y Gabryszewska, 2016), y durante la aclimatización las plántulas micropropagadas desarrollan una maquinaria fotosintética funcional (Kapoor *et al.*, 2008). Nuestros resultados de fotosíntesis no mostraron diferencias significativas, en promedio se obtuvo $12.1 \pm 2.8 \mu\text{mol}\cdot\text{CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a los 180 días de aclimatización, sin embargo, estos resultados son superiores al estudio de Talavera *et al.* (2005) en plantas de cocotero aclimatizadas en invernadero bajo diferentes condiciones de luz y temperatura. Fuentes *et al.* (2005) realizaron un estudio en plántulas de cocotero con diferentes concentraciones de sacarosa y obtuvieron $7 \mu\text{mol}\cdot\text{CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ después de 60 días. Es importante mencionar que la fluorescencia de la clorofila se utiliza para determinar la eficiencia fotoquímica de las plantas ante diferentes condiciones ambientales (Rodríguez-Torressi *et al.*, 2014). Existen dos indicadores indirectos del fotosistema II (PSII) y su relación con la fotosíntesis neta (F_v/F_m y PI_{abs}), de acuerdo con los datos obtenidos hasta 180 días, el índice de potencial fotosintético (PI_{abs}) fue de 4.9. El PI_{abs} , proporciona información sobre estado del aparato fotosintético, en sus tres procesos, eficiencia fotoquímica primaria (F_v/F_m), eficiencia de conversión de energía en la fase oscura de la fotosíntesis y densidad de los centros de reacción activos en la clorofila (Ceacero *et al.*, 2012). Por otro lado, la relación F_v/F_m permite reconocer plantas no estresadas cuando su valor se encuentra entre 0.7 y 0.8, nuestros resultados estuvieron al margen de este rango (0.735), comparado con los resultados obtenidos por Talavera *et al.* (2005), son

ligeramente más altos, ya que indican que después de los 60 días se obtienen valores inferiores a 0.790 en plantas aclimatizadas de cocotero, siendo un indicativo de algún tipo de estrés, una vez establecidas en el invernadero.

Establecimos un experimento para relacionar la expresión de genes inducibles a la absorción de nutrientes y agua, los resultados mostraron dos patrones entre los dos tratamientos de HMA, por un lado, la expresión de los genes en el tratamiento con los HMA nativos mostró un aumento importante desde los primeros días de la aclimatización (15 días), que disminuyó drásticamente en los periodos subsecuentes, mientras que, en la expresión de los genes ante la inoculación de los HMA comerciales fue más lenta, estos resultados se asocian con los patrones de colonización de los HMA observados en el capítulo IV, y es consistente con los resultados obtenidos de la sobrevivencia de las plántulas bajo la inoculación de los HMA nativos. Es posible que debido a la diversidad de especies en los HMA nativos permita que algunas especies colonicen más rápido, mientras que, el resto requiera más tiempo para establecer una simbiosis funcional, sin embargo, el producto comercial está constituido por una especie altamente infectiva, que al parecer permite un mejor crecimiento en etapas más avanzadas del desarrollo de las plántulas.

Finalmente, evaluamos una etapa de pre-aclimatización en plántulas de cocotero bajo condiciones controladas de luz, temperatura, y humedad, seguido de la aclimatización en invernadero. Esto debido a que en las primeras dos semanas de adaptación, las plantas sufren diferentes cambios (necrosis de hojas, hojas secas, contaminación por hongos, marchitez) (datos no mostrados), es posible que sea parte del cambio drástico de condiciones de asepsia *in vitro* al trasplantar a *ex vitro*, sin embargo, no siempre es letal, debido a que las plántulas están provistas por una bolsa transparente con orificios durante los primeros días, Orense *et al.* (2011) mencionan que es una estrategia adecuada para la adaptación de las plantas, sin embargo, al retirar la bolsa, las plantas se someten a un estrés ambiental mayor, por lo que, consideramos que la implementación de una etapa de pre-aclimatización disminuiría el daño en las plantas. Entonces, después de esta etapa las plántulas alcanzaron una sobrevivencia del 100 %, un mejor crecimiento de raíces y se observaron más robustas y sin daño. Después de la aclimatización, la sobrevivencia fue de 80 %, similar a los resultados obtenidos en otros experimentos y un efecto en el crecimiento.

Además, evaluamos el uso de diferentes mezclas de sustratos a base de fibra de coco, en la aclimatización, encontramos una respuesta similar en la sobrevivencia de las plántulas.

Nuestros resultados son similares a Sparjanbabu *et al.* (2020) donde utilizaron mezclas de sustratos con fibra de coco en palma aceitera.

7.2. CONCLUSIONES

En este estudio pudimos validar que la aplicación de los HMA nativos y comerciales tuvo un efecto benéfico en la aclimatización y el desarrollo de plántulas micropropagadas de cocotero bajo condiciones de invernadero.

El patrón de colonización y la expresión de los genes asociados a la absorción de nutrientes sugieren que la simbiosis con los HMA nativos puede mejorar la absorción de nutrientes y transporte de agua y esto se traduce en un mejor desempeño en las plántulas y en una mejora en la sobrevivencia.

7.3. PERSPECTIVAS

Se sugiere realizar más ensayos que incluyan evaluaciones en campo, estudios con diferentes etapas de crecimiento de las plántulas y la inoculación de especies monospóricas para asociar la especie o especies que están colonizando más rápidamente y mejorando la sobrevivencia de las plántulas.

Es recomendable que se considere previo a la aclimatización de las plántulas un pre-tratamiento con los promotores de crecimiento evaluados (NAA y SNP) en las concentraciones y combinaciones adecuadas para promover un mejor desarrollo radicular en plántulas menos desarrolladas y la implementación de la etapa de pre-aclimatización bajo condiciones controladas utilizando una mezcla de sustrato compuesto, fibra de coco y HMA nativos, como parte del protocolo de aclimatización ya establecido, para promover una mejor respuesta de las plántulas fuera del cultivo *in vitro*.

BIBLIOGRAFÍA

- Al-Khayri, J.M., Naik, P.M. (2017). Date palm micropropagation: Advances and applications. *Ciência e Agrotecnologia*, 41, 347–358.
- Ambili, K., Thomas, G. V., Indu, P., Gopal, M., Gupta, A. (2012a). Distribution of arbuscular mycorrhizae associated with coconut and arecanut based cropping systems. *Agricultural Research*, 1, 338-345.
- Ambili, K., Thomas, G. V., Indu, P., Viji, M. V., Gopal, M., Gupta, A. (2012b). Isolation and identification of spore associated bacteria (SAB) from *Glomus* and *Gigaspora* spp. in coconut and arecanut based cropping systems. *Journal of Plantation Crops, Journal of Plantation Crops*, 40, 88-93.
- Anli, M., Baslam, M., Tahiri, A., Raklami, A., Symanczik, S., Boutasknit, A., Ait-El-Mokhtar, M., Ben-Laouane, R., Ben-Laouane, R., Ait Rahou, Y., Ait Chitt, M., Oufdou, K., Mitsui, T., Hafidi, M., Meddich, A. (2020a). Biofertilizers as strategies to improve photosynthetic apparatus, growth, and drought stress tolerance in the date palm. *Frontiers Plant Science*, 11, 516818.
- Anli, M., Symanczik, S., El Abbassi, A., Ait-El-Mokhtara, M., Boutasknita, A., Ben-Laouane, R., Baslam, M., Mäder, P., Hafidi, M., Meddich, A. (2020b). Use of arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizoglyphus irregulare* and compost to improve growth and physiological responses of *Phoenix dactylifera* 'Boufgouss.' Plant Biosystems. *International Journal of Plant Biology*, 155, 763–771.
- Arun, M., Naing, A.H., Jeon, S.M., Ai, T.N., Aye, T., Kim, C.K. (2017). Sodium nitroprusside stimulates growth and shoot regeneration in chrysanthemum. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 58, 78-84.
- Ashburner, G.R., Thompson, W.K., Burch, J.M. (1993). Effect of α -naphthaleneacetic acid and sucrose levels on the development of cultured embryos of coconut. *Plant cell, tissue and organ culture*, 35, 157-163.
- Azcón-Aguilar, C., Cantos, M.I., Troncoso, A.I., Barea, J.M. (1997). Beneficial effect of arbuscular mycorrhizas on acclimatization of micropropagated cassava plantlets. *Scientia Horticulturae*, 72, 63-71.

- Bahadur, A., Batool, A., Nasir, F., Jiang, S., Mingsen, Q., Zhang, Q., Pan, J., Liu, J., Feng, H. (2019). Mechanistic insights into arbuscular mycorrhizal fungi-mediated drought stress tolerance in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 4199.
- Bandupriya, H.D.D., Fernando, S.C., Vidhanaarachchil, Y.R.M. (2016). Micropropagation and androgenesis in coconut: an assessment of Sri Lankan implication. *Cocos*, 22, 31-47.
- Baslam, M., Qaddoury, A., Goicoechea, N. (2014). Role of native and exotic mycorrhizal symbiosis to develop morphological, physiological and biochemical responses coping with water drought of date palm, *Phoenix dactylifera*. *Trees*, 28, 161-172.
- Been, B.O. (1991). Observations on field resistance to lethal yellowing in coconut varieties and hybrids in Jamaica. *Oléagineux*, 36, 9-11.
- Berruti, A., Lumini, E., Balestrini, R., Bianciotto, V., (2016). Arbuscular Mycorrhizal Fungi as Natural Biofertilizers: Let's Benefit from Past Successes. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1559.
- Blaszkowski, J. (2012). Glomeromycota. W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, Kraków, pp.303
- Bonfante, P., Genre, A. (2010). Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications*, 27,1–11.
- Brundrett, M., Bougher, N., Dell, B., Grove, T., Malajczuk, N. (1996). Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. Canberra: *Australian Centre for International Agricultural Research*, Gdttingen, pp. 32-374.
- Brundrett, M.C., Kendrick, W.B. (1988). The mycorrhizal status, root anatomy, and phenology of plants in a sugar maple forest. *Canadian Journal of Botany*, 66, 1153–1173.
- Brundrett, M.C., Piche, Y., Peterson, R.L. (1985). A developmental study of the early stages in vesicular–arbuscular mycorrhiza formation. *Canadian Journal of Botany*, 63, 184-194.
- Calabrese, S., Pérez-Tienda, J., Ellerbeck, M., Arnould, C., Chatagnier, O., Boller, T., Schüßler, T., Brachmann, A., Wipf, D. Ferrol, N. Courty, P. E. (2016). GintAMT3—a low-affinity ammonium transporter of the arbuscular mycorrhizal *Rhizophagus irregularis*. *Frontiers in plant science*, 7, 679.

-
- Castillo, R., Ortiz, C.F., Narváez, M., Fernández, M., Torres, N., Enríquez, R., Vázquez M., Luis-Pantoja M., Paredes-Tomas, C., Wayne, M., Oropeza, C. (2022). Resistance trials of plants of coconut varieties naturally exposed to palm lethal yellowing phytoplasmas in Tabasco and Yucatán. *Phytopathogenic Mollicutes*, 12, 77-77.
- Ceacero, C.J., Díaz-Hernández, J.L., del Campo, A.D., Navarro-Cerrillo, R.M. (2012). Early assessment of forest restoration techniques using chlorophyll fluorescence and diagnosis of oak (*Quercus ilex* sub. *ballota*) seedlings vitality. *Revista Bosque*, 33, 191-202.
- Chandra, S., Bandopadhyay, R., Kumar, V., Chandra, R. (2010). Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. *Biotechnology letters*, 32, 1199-1205.
- Cornwell, W.K., Bedford, B.L., Chapin, C.T. (2001). Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in a phosphorus-poor wetland and mycorrhizal response to phosphorus fertilization. *American Journal of Botany*, 88, 1824-1829.
- Correa-Aragunde, N., Graziano, M., Lamattina, L. (2004). Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Plant*, 218, 900-905.
- Cortés-Patiño, S.L., Vesga-Ayala, N.P., Sigarroat-Rieche, A.K., Moreno-Rozo, L., Cárdenas-Caro, D. (2015). Sustratos inoculados con microorganismos para el desarrollo de plantas de cacao (*Theobroma cacao* L.) en etapa de vivero. *Bioagro*, 27, 151-158.
- Courty, P.E., Doidy, J., Garcia, K., Wipf, D., Zimmermann, S.D. (2016). The transportome of mycorrhizal systems. *Molecular mycorrhizal symbiosis*, en: *Molecular Mycorrhizal Symbiosis*, Francis, M. (Ed.). India, 239-256.
- Crossay, T., Majorel, C., Redecker, D., Gensous, S., Medevielle, V., Durrieu, G., Cavaloc, Y., Amir, H. (2019). Is a mixture of arbuscular mycorrhizal fungi better for plant growth than single-species inoculants? *Mycorrhiza*, 29, 325-339.
- da Silva Maia, R., Vasconcelos, S.S., Viana-Junior, A.B., Castellani, D.C., Kato, O.R. (2021). Oil palm (*Elaeis guineensis*) shows higher mycorrhizal colonization when planted in agroforestry than in monoculture. *Agroforestry Systems*, 95: 731-740.

- Davidson, B.E., Novak, S.J., Serpe, M.D. (2016). Consequences of inoculation with native arbuscular mycorrhizal fungi for root colonization and survival of *Artemisia tridentata* ssp. *wyomingensis* seedlings after transplanting. *Mycorrhiza*, 26: 595-608.
- Dickison, W. C. (2000). Integrative plant anatomy. Academic press, Florida, pp. 535.
- Dreyer, B., Morte, A., López, J.Á., Honrubia, M. (2010). Comparative study of mycorrhizal susceptibility and anatomy of four palm species. *Mycorrhiza*. 20, 103-115.
- Ek-Chim, J.L.E. (2019). Establecimiento de la producción de hongos micorrízicos arbusculares asociados a cocotero a través de cultivos trampa. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., México. pp. 113.
- El Kinany, S., Achbani, E., Faggroud, M., Ouahmane, L., El Hilali, R., Haggoud, A., Bouamri, R. (2019). Effect of organic fertilizer and commercial arbuscular mycorrhizal fungi on the growth of micropropagated date palm cv. Feggouss. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 18, 411–417.
- Emam, T. (2016). Local soil, but not commercial AMF inoculum, increases native and non-native grass growth at a mine restoration site: Soil inoculum type and method affect restoration. *Restoration Ecology*, 24, 35–44.
- Estrada, B., Aroca, R., Barea, J.M., Ruiz-Lozano, J.M. (2013). Native arbuscular mycorrhizal fungi isolated from a saline habitat improved maize antioxidant systems and plant tolerance to salinity. *Plant Science Journal*, 201, 42–51.
- Evans, M. L., Mulkey, T. J., Vesper, M. J. (1980). Auxin action on proton influx in corn roots and its correlation with growth. *Planta*, 148, 510-512.
- FAOSTAT (2021). "Crops"- Countries – Production Quantity; Items – Coconuts; Years – 2021. [Acceso 27 Abril 2023].
- Ledermann, N., Finlay, R., Boller, T., Elfstrand, M. (2010). Functional diversity in arbuscular mycorrhiza—the role of gene expression, phosphorous nutrition and symbiotic efficiency. *Fungal Ecology* 3, 1-8.
- Fuentes, G., Talavera, C., Oropeza, C., Desjardins, Y., Santamaría, J.M. (2005). Exogenous sucrose can decrease *in vitro* photosynthesis but improve field survival and growth of

coconut (*Cocos nucifera* L.) *in vitro* plantlets. *In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 41, 69–76.

Garavito-Guyot, A., Rivallan, R., Bocs, S., Baudouin, L., Ndede, E.Y. (2022). Genomic screening for tolerance of coconut populations differentially exposed to coconut's lethal yellowing in Ghana using genotyping by sequencing. *Phytopathogenic Mollicutes*, 12, 70.

Gaspar, T., Kevers, C., Penel, C., Greppin, H., Reid, D. M., Thorpe, T. A. (1996). Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 32, 272-289.

Gerdemann, J.W., Nicolson, Y.H., (1963). Spores of Mycorrhiza Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society*, 46, 235–244.

Gomes, H.T., Bartos, P.M.C., Scherwinski-Pereira, J.E. (2015). Optimizing rooting and survival of oil palm (*Elaeis guineensis*) plantlets derived from somatic embryos. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 51, 111-117.

Gomez, S.K., Javot, H., Deewatthanawong, P., Torres-Jerez, I., Tang, Y., Blancaflor, E. B., Udvardi, M.K., Harrison, M. J. (2009). *Medicago truncatula* and *Glomus intraradices* gene expression in cortical cells harboring arbuscules in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *BMC plant biology*, 9, 1-19.

Gómez-Bellot, M.J., Lorente, B., Sánchez-Blanco, M.J., Ortuño, M.F., Nortes, P.A., Alarcón, J.J. (2020). Influence of mixed substrate and arbuscular mycorrhizal fungi on photosynthetic efficiency, nutrient and water status and yield in tomato plants irrigated with saline reclaimed waters. *Water*, 12, 438.

Gómez-Falcón N., Sáenz-Carbonell L., Andrade-Torres A., Lara-Pérez L.A., Narváez M., Oropeza C. (2023). Arbuscular mycorrhizal fungi increase the survival and growth of micropropagated coconut (*Cocos nucifera* L.) plantlets. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*.

- Gou, J., Strauss, S.H., Tsai, C.J., Fang, K., Chen, Y., Jiang, X., Busov, V.B. (2010). Gibberellins regulate lateral root formation in *Populus* through interactions with auxin and other hormones. *Plant Cell*, 22, 623-639.
- Guadarrama, M.P.C., Ramos-Zapata, J.A. (2020). Importancia de las micorrizas como estrategia de restauración en la duna costera de Yucatán. *Bioagrociencias*, 13, 39-47.
- Gunn, Bee F., Luc Baudouin, Kenneth M. Olsen. (2011). Independent Origins of Cultivated Coconut (*Cocos nucifera* L.) in the Old World Tropics. *PLoS ONE*, 6, e21143.
- Gurr, G.M., Johnson, A.C., Ash, G.J., Wilson, B.A.L., Ero, M.M., Pilotti, C.A., Dewhurst, C.F. You, M.S. (2016). Coconut Lethal Yellowing Diseases: A Phytoplasma Threat to Palms of Global Economic and Social Significance. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1521.
- Harikumar, V. S. (2013). Symbiotic response of sesame (*Sesamum indicum* L.) to different indigenous arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) from rice fallows of Kerala, India. *Journal of Agricultural Technology*, 9, 1631-1640.
- Harrison, M.J., Dewbre, G.R., Liu, J. (2002). A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *The Plant Cell*, 14, 2413-2429.
- Hazarika, B.N. (2006). Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae*, 108, 105-120.
- Hibilik, N., Selmaoui, K., Msairi, S., Touati, J., Chliyeh, M., Mouria, A., Artib, M., Touhami, A.O., Benkirane, R. Douira, A. (2018). Study of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Diversity and Its Effect on Growth and Development of Leek Plants (*Allium porrum* L.). *Annual Research & Review in Biology*, 24, 1-14.
- Ho-Plágaro, T., García-Garrido, J.M. (2022). Molecular regulation of arbuscular mycorrhizal symbiosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 5960.
- Jahromi, F., Aroca, R., Porcel, R., Ruiz-Lozano, J.M. (2008). Influence of salinity on the *in vitro* development of *Glomus intraradices* and on the *in vivo* physiological and molecular responses of mycorrhizal lettuce plants. *Microbial Ecology*, 55, 45-53.

- Jakobsen, I., Smith, S.E., Smith, F.A. (2003). Function and diversity of arbuscular mycorrhizae in carbon and mineral nutrition, en: Mycorrhizal ecology, van der Heijden, M.G.A., Sanders, I.R. (Ed.). *Ecological Studies*, Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 75-92.
- Kalaipandian, S., Mu, Z., Kong, E. Y.Y., Biddle, J., Cave, R., Bazrafshan, A., Wijayabandara, K., Beveridge, F.C., Nguyen, Q., Adkins, S.W. (2021). Cloning Coconut via Somatic Embryogenesis: A Review of the Current Status and Future Prospects. *Plants*, 10, 2050.
- Kapoor, R., Sharma, D., Bhatnagar, A.K. (2008). Arbuscular mycorrhizae in micropropagation systems and their potential applications. *Scientia Horticulturae*, 116, 227-239.
- Karandeep, K., Navnidhi, C., Poorva, S., Garg, M.K., Anil, P. (2019). Coconut meal: Nutraceutical importance and food industry application. *Foods and Raw Materials*, 7, 419-427.
- Karunasinghe, T.G., Fernando, W.C., Jayasekera, L.R. (2009). The effect of poultry manure and inorganic fertilizer on the arbuscular mycorrhiza in coconut. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, 37, 277-279.
- Kikuchi, Y., Hijikata, N., Ohtomo, R., Handa, Y., Kawaguchi, M., Saito, K., Masuta, C., Ezawa, T. (2016). Aquaporin-mediated long-distance polyphosphate translocation directed towards the host in arbuscular mycorrhizal symbiosis: application of virus-induced gene silencing. *New Phytologist*, 211, 1202-1208.
- Klironomos, J.N. (2003). Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology*, 84, 2292-2301.
- Kobae, Y., Hata, S. (2010). Dynamics of periarbuscular membranes visualized with a fluorescent phosphate transporter in arbuscular mycorrhizal roots of rice. *Plant and Cell Physiology*, 51, 341-353.
- Koegel, S., Ait Lahmidi, N., Arnould, C., Chatagnier, O., Walder, F., Ineichen, K., Boller, T., Wipf, D., Wiemken, A., Courty, P.E. (2013). The family of ammonium transporters (AMT) in *Sorghum bicolor*: two AMT members are induced locally, but not systemically in roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 198, 853–865.

- Kumar, K., Rao, I. U. (2012). Morphophysiological problems in acclimatization of micropropagated plants *in-ex vitro* conditions-A Reviews. *Journal of Ornamental and Horticultural Plants*, 2, 271-283.
- Lanfranco, L., Fiorilli, V., Gutjahr, C. (2018). Partner communication and role of nutrients in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*, 220, 1031-1046.
- Lara-Pérez, L.A., Oros-Ortega, I., Córdova-Lara, I., Estrada-Medina, H., O'Connor-Sánchez, A., Góngora-Castillo, E., Sáenz-Carbonell, L., (2020). Seasonal shifts of arbuscular mycorrhizal fungi in *Cocos nucifera* roots in Yucatán, Mexico. *Mycorrhiza*, 30, 269–283.
- Liu, J., Liu, J., Liu, J., Cui, M., Huang, Y., Tian, Y., Chen, A., Xu, G. (2019). The potassium transporter SIHAK10 is involved in mycorrhizal potassium uptake. *Plant Physiology*, 180, 465-479.
- Luginbuehl, Leonie H., y Giles E.D. Oldroyd. (2017). Understanding the Arbuscule at the Heart of Endomycorrhizal Symbioses in Plants. *Current Biology*, 27, R952–63.
- Mahendra, R., Chauhan, N., Sharma, J. B., Rana, K., Bakshi, M. (2020). *Ex-vitro* establishment of tissue cultured plants in fruit crops-A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 9, 3321-3329.
- Mao, J., Niu, C., Li, K., Mobeen Tahir, M., Khan, A., Wang, H., Zhang, D. (2020). Exogenous 6-benzyladenine application affects root morphology by altering hormone status and gene expression of developing lateral roots in *Malus hupehensis*. *Plant Biology*, 22, 1150-1159.
- Mariotti, B., Martini, S., Raddi, S., Tani, A., Jacobs, D. F., Oliet, J. A., Maltoni, A. (2020). Coconut coir as a sustainable nursery growing media for seedling production of the ecologically diverse *Quercus* species. *Forests*, 11, 522.
- Masquelier, S., Sozzi, T., Bouvet, J.C., Bésiers, J., Deogratias, J.M. (2022). Conception and Development of Recycled Raw Materials (Coconut Fiber and Bagasse)-Based Substrates Enriched with Soil Microorganisms (Arbuscular Mycorrhizal Fungi, *Trichoderma* spp. and *Pseudomonas* spp.) for the Soilless Cultivation of Tomato (*S. lycopersicum*). *Agronomy*, 12, 767.

- Mastouri, F., Hassandokht, M. R., Dehkaei, M.P. (2005). The effect of application of agricultural waste compost on growing media and greenhouse lettuce yield. *Acta Horticulturae*, 697, 153.
- Matysiak, B., Gabryszewska, E. (2016). The effect of *in vitro* culture conditions on the pattern of maximum photochemical efficiency of photosystem II during acclimatisation of *Helleborus niger* plantlets to ex vitro conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 125, 585-593.
- McGonigle, T.P., Miller, M.H., Evans, D.G., Fairchild, G.L., Swan, J.A. (1990). A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 115: 495-501.
- Meijer, E. A., De Vries, S. C., Mordhorst, A. P. (1999). Co-culture with *Daucus carota* somatic embryos reveals high 2, 4-D uptake and release rates of *Arabidopsis thaliana* cultured cells. *Plant Cell Reports*, 18, 656-663.
- Moora, M., Berger, S., Davison, J., Öpik, M., Bommarco, R., Bruelheide, H., Kühn, I., Kunin, E.W., Metsis, M., Rortais A., Vanatoa A., Vanatoa, E., Stout, J.C., Trussa, M., Westphal, C., Zobel, M., Walther, G.R. (2011). Alien plants associate with widespread generalist arbuscular mycorrhizal fungal taxa: evidence from a continental-scale study using massively parallel 454 sequencing. *Journal of Biogeography*, 38, 1305-1317.
- Nagy, R., Karandashov, V., Chague, V., Kalinkevich, K., Tamasloukht, M. B., Xu, G., Jakobsen, I., Levy, A.A., Amrhein, N., Bucher, M. (2005). The characterization of novel mycorrhiza-specific phosphate transporters from *Lycopersicon esculentum* and *Solanum tuberosum* uncovers functional redundancy in symbiotic phosphate transport in solanaceous species. *The Plant Journal*, 42, 236-250.
- Nava-Gutiérrez, Y., Ferrera-Cerrato, R., Santamaría, J. M. (2011). *Glomus intraradices* attenuates the negative effect of low Pi supply on photosynthesis and growth of papaya Maradol plants. *Journal of Botany*, 8.
- Nieves-Cordones, M., Ródenas, R., Chavanieu, A., Rivero, R. M., Martínez, V., Gaillard, I., Rubio, F. (2016). Uneven HAK/KUP/KT protein diversity among angiosperms: species distribution and perspectives. *Frontiers in plant science*, 7, 127.

- Nivedha, I. D. (2019). Exploration of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in the rhizosphere of five varieties of *Cocos nucifera* L. During summer season in pollachi taluk, coimbatore district, tamilnadu, india. *Foldscope and its applications*, 194-200.
- Nobre, C.P., Costa, M.G. da, Goto, B.T., Gehring, C. (2018). Arbuscular mycorrhizal fungi associated with the babassu palm (*Attalea speciosa*) in the eastern periphery of Amazonia, Brazil. *Acta Amazonica*, 48, 321–329.
- Oliveira, J.R.G.D., Moraes, T.A.D.L., Melo, N.F.D., Yano-Melo, A.M. (2010). Fungos micorrízicos arbusculares e rizobactérias promotoras de crescimento na aclimatização de zingiber spectabile. *Bragantia*, 69, 687-694.
- Orense, O. D. (2011). Rapid and cost-effective embryo culture technique for commercial production of Makapuno seedlings. *CORD*, 27, 22-22.
- Oropeza-Salín, C., Sáenz, L., Narváez, M., Nic-Matos, G., Córdova, I., Myrie, W., Ortíz, F.C., Ramos, E. (2020). Dealing with Lethal Yellowing and Related Diseases in Coconut, en: Coconut Biotechnology: Towards the Sustainability of the 'Tree of Life', Adkins, S., Foale, M., Bourdeix, R., Nguyen, Q., Biddle, J. (Ed). Springer, Cham, pp. 169-197.
- Pagnussat, G.C., Simontacchi, M., Puntarulo, S., Lamattina, L. (2002). Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant physiology*, 129, 954-956.
- Pan, M., Van Staden, J. (2002). The effect of activated charcoal and auxins on root formation by hypocotyl segments of *Daucus carota*. *South African journal of botany*, 68, 349-356.
- Pandey, S., Sundararajan, S., Ramalingam, S., Pant, B. (2020). Effects of sodium nitroprusside and growth regulators on callus, multiple shoot induction and tissue browning in commercially important *Valeriana jatamansi* Jones. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 142, 653-660.
- Parniske, M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 6, 763-775.
- Pech-Aké, A., Maust, B., Orozco-Segovia, A., Oropeza, C. (2007). The effect of gibberellic acid on the *in vitro* germination of coconut zygotic embryos and their conversion into plantlets. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 43, 247-253.

- Pech-Aké, A., Souza, R., Maust, B., Santamaría, J.M., Oropeza, C. (2004). Enhanced aerobic respiration improves *in vitro* coconut embryo germination and culture. *In vitro Cell Dev Biol Plant*, 40, 90-94.
- Pérez-Núñez, M. T., Chan, J.L., Sáenz, L., González, T., Verdeil, J.L., Oropeza, C. (2006). Improved somatic embryogenesis from *Cocos nucifera* (L.) plumule explants. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 42, 37-43.
- Pham, L.J. (2016). Coconut (*Cocos nucifera*), en: Industrial oil crops, McKeon, A.T. Hayes, D.G., Weselake R.J. (Ed.). AOCS Press, London, pp.231-242.
- Phillips, G.C., Garda, M. (2019). Plant tissue culture media and practices: an overview. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 55, 242-257.
- Phillips, J.M., Hayman, D.S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55, 158-IN18.
- Polo-Marcial, M.H., Lara-Pérez, L.A., Goto, B.T., Margarito-Vista X., Andrade-Torres, A. (2021). Glomeromycota in Mexico, a country with very high richness. *Sydowia*, 74, 33-63.
- Pospóšilová, J., Tichá, I., Kadleček, P., Haisel, D., Plzáková, Š. (1999). Acclimatization of micropropagated plants to ex vitro conditions. *Biologia plantarum*, 42, 481-497.
- Prades, A., Salum, U.N., Pioch, D. (2016). New era for the coconut sector. What prospects for research?. *OCL*, 23, 1-4.
- Quiñones-Aguilar, E.E., Montoya-Martínez, A.C., Rincón-Enriquez, G., Lobit, P., López-Pérez, L. (2016). Effectiveness of native arbuscular mycorrhizal consortia on the growth of *Agave inaequidens*. *Journal of soil science and plant nutrition*, 16, 1052-1064.
- Rabeh, M.R.M., Gadalla, E.G., Ahmed, S.A., Shehata, M.S. (2021). Primitive effects of culture system, sorbitol and salicylic acid on growth of tissue culture derived date palm plants (*Phoenix dactylifera* L.) Amri cv. during acclimatization stage. *Menoufia Journal of Plant Production*, 6, 221-233.

- Rajeshkumar, P.P., George V. Thomas, Alka Gupta, Murali Gopal. (2015). Diversity, Richness and Degree of Colonization of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Coconut Cultivated along with Intercrops in High Productive Zone of Kerala, India. *Symbiosis*, 65, 125–41.
- Reyes-López D. (2016). Aclimatación de híbridos intraespecíficos de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews, obtenidos *in vitro*. *Agro productividad*, 9, 72-77.
- Rodriguez-Torressi, A.O., Yonny, M., Nazareno, M., Galmarini, C., Bouzo, C.A. (2014). Eficiencia fotoquímica máxima e índice de potencial fotosintético en plantas de melón (*Cucumis melo*) tratadas con bajas temperaturas. *Fave. Sección ciencias agrarias*, 13, 1-8.
- Roolant, L. (2014). Why coconut water is now a one billion industry. <https://transferwise.com/blog/2014-05/why-coconut-water-is-now-a-1-billion-industry/> [Acceso 02 noviembre 2019].
- Rout, G.R. (2006). Effect of auxins on adventitious root development from single node cuttings of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze and associated biochemical changes. *Plant growth regulation*, 48, 111-117.
- Sáenz, L., Chan, J. L., Narváez, M., Oropeza, C. (2018). Protocol for the micropropagation of coconut from plumule explants, en: *Plant cell culture protocols*, Loyola-Vargas V.M. y Ochoa-Alejo N. (Ed.). Springer, New York, pp. 161-170.
- Sáenz-Carbonell, L., Montero-Cortés, M., Pérez-Nuñez, T., Azpeitia-Morales, A. Andrade-Torres, A. Córdova-Lara I., Chan-Rodríguez, J.L. Sandoval-Cancino, G. Rivera-Solis, G. Oropeza-Salín C. (2016). Somatic Embryogenesis in *Cocos nucifera* L, en: *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications*, Loyola-Vargas V.M. y Ochoa-Alejo, N. (Ed.). Springer, Cham, pp. 297–318.
- Saia, S., Rappa, V., Ruisi, P., Abenavoli, M. R., Sunseri, F., Giambalvo, D., Frenda A.S., Martinelli, F. (2015). Soil inoculation with symbiotic microorganisms promotes plant growth and nutrient transporter genes expression in durum wheat. *Frontiers in plant science*, 6, 815.

- Samosir, Y., Adkins, S. (2014). Improving acclimatization through the photoautotrophic culture of coconut (*Cocos nucifera*) seedlings: an *in vitro* system for the efficient exchange of germplasm. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 50, 493-501.
- Santa-María, G.E., Oliferuk, S., Moriconi, J.I. (2018). KT-HAK-KUP transporters in major terrestrial photosynthetic organisms: A twenty years tale. *Journal of Plant Physiology*, 226, 77-90.
- Sawers J.H.R., Yang S., Gutjahr C., Paszkowski U. (2008). The molecular components of nutrient exchange in arbuscular mycorrhizal interactions, en: *Mycorrhizae: sustainable agriculture and forestry*, Siddiqui, Z.A., y Futai, K. (Ed.). Springer, Dordrecht, pp. 37-59.
- Saxena, B., Sharma, K., Kapoor, R., Wu, Q.S., Giri, B. (2022). Insights into the molecular aspects of salt stress tolerance in mycorrhizal plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38, 253.
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols*, 3, 1101-1108.
- Schultz, C. (2001). Effect of (vesicular-) arbuscular mycorrhiza on survival and post *in vitro* development of micropropagated oil palms (*Elaeis guineensis* Jacq.). Tesis de doctorado. Niedersächsische Staats-und Universitätsbibliothek, Göttingen. pp. 160.
- Secretaria de agricultura y Desarrollo rural. (2023). Producción de copra y coco en México. [https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/produccion-de-copra-y-coco-en-mexico?idiom=es#:~:text=La %20producci %C3 %B3n %20nacional %20fue %20de,este %20producto %20todo %20el %20a %C3 %B1o](https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/produccion-de-copra-y-coco-en-mexico?idiom=es#:~:text=La%20producci%C3%B3n%20nacional%20fue%20de,este%20producto%20todo%20el%20a%C3%B1o) [Acceso 09 marzo 2022].
- Senarathne, S.H.S., Ilangamudali, I.M.P.S. (2018). Effect of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Based Biofertilizer on Coconut Seedlings Growth in Nursery. *CORD*, 34, 30-41.
- Sisunandar, Husin, A., Julianto, T., Yuniaty, A., Rival, A., Adkins, S.W. (2018). *Ex vitro* rooting using a mini growth chamber increases root induction and accelerates acclimatization of Kopyor coconut (*Cocos nucifera* L.) embryo culture-derived seedlings. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 54, 508-517.

- Smith, S.E., Smith, F.A. (2011). Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annual Review of Plant Biology*, 62, 227-250.
- Souza, T. (2015). Handbook of arbuscular mycorrhizal fungi. Springer, Cham, pp.153.
- Sparjanbabu, D.S., Naveenkumar, P., Krishna, M.S.R., Ramajayam, D., Prasanna, B.S.H. (2020). Optimizing The Acclimatization Process of Oil Palm (*Elaeis Guineensis* Jacq.) *In vitro* Plantlets Derived from The Mature Zygotic Embryos. *Plant cell biotechnology and molecular biology*, 21, 128-134.
- Talavera, C., Contreras, F., Espadas, F., Fuentes, G., Santamaría, J.M. (2005). Cultivating *in vitro* coconut palms (*Cocos nucifera*) under glasshouse conditions with natural light, improves *in vitro* photosynthesis nursery survival and growth. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 83, 287–292.
- Tapia-Goné, J.J., Ferrera-Cerrato, R., Varela-Fregoso, L., Rodriguez-Ortiz, J.C., Soria-Colunga, J.C., Tiscareño-Iracheta, M.Á., Loredó-Osti, C., Alcalá-Jáuregui, J., Villar-Morales, C. (2010). Infectividad y efectividad de hongos micorrízicos arbusculares nativos de suelos salinos en el cultivo de lechuga (*Lactuca sativa*). *Revista Mexicana de micología*, 31, 69-74.
- Torres-Arias, Y., Fors, R.O., Nobre, C., Gómez, E.F., Berbara, R.L.L. (2017). Production of native arbuscular mycorrhizal fungi inoculum under different environmental conditions. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48, 87–94.
- Uehlein, N., Fileschi, K., Eckert, M., Bienert, G.P., Bertl, A., Kaldenhoff, R. (2007). Arbuscular mycorrhizal symbiosis and plant aquaporin expression. *Phytochemistry*, 68, 122–129.
- Vafadar, F., Amooaghaie, R., Otroshy, M. (2014). Effects of plant-growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungus on plant growth, stevioside, NPK, and chlorophyll content of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Plant Interactions*, 9, 128-136.
- Vázquez-Hernández, M.V., Arévalo-Galarza, L., Jaen-Contreras, D., Escamilla-García, J.L, Mora-Aguilera, A., Hernández-Castro, E., Cibrián-Tovar, J., Téliz-Ortiz, D. (2011). Effect of *Glomus mosseae* and *Entrophospora colombiana* on plant growth, production,

and fruit quality of 'Maradol'papaya (*Carica papaya* L.). *Scientia Horticulturae*, 128, 255-260.

Vidhanaarachchi, V.R.M., Suranjith, W.C., Gunathilake, T.R. (2016). Effect of genotype, embryo maturity and culture medium on in vitro embryo germination of Sri Lankan coconut (*Cocos nucifera* L.) varieties. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, 44, 274-278.

Walker, C. (1997). Spore extraction by centrifugation -sugar flotation. Internatiocnal document, Biological Research and imaging laboratory. New Milton, Hampshire: UK.

Willis, A., Rodrigues, B.F., Harris, P.J. (2013). The ecology of arbuscular mycorrhizal fungi. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 32, 1-20.

Wipf, D., Krajinski, F., van Tuinen, D., Recorbet, G., Courty, P.E. (2019). Trading on the arbuscular mycorrhiza market: from arbuscules to common mycorrhizal networks. *New Phytologist*, 223, 1127-1142.

Yadav, R. S., Mahatma, M. K., Thirumalaisamy, P. P., Meena, H. N., Bhaduri, D., Arora, S., Panwar, J. (2017). Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) for sustainable soil and plant health in salt-affected soils. *Bioremediation of salt affected soils: an Indian perspective*, 133-156.

Zizumbo-Villarreal D., Ruiz-Rodriguez M., Harries H., Colunga-García M.P. (2006). Population genetics, lethal yellowing disease, and relationships among Mexican and imported coconut ecotypes. *Crop Science*, 46, 2509-2516.

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

ANEXOS

Anexo 1. Genes inducibles en la simbiosis micorrizica arbuscular.

Nutriente	Especie	Gen inducible	
		Fúngico	Vegetal
Fosfato	<i>Hordeum vulgare</i>		<i>HvPT8</i>
	<i>Lotus japonicus</i>		<i>LjPT3</i>
	<i>Lycopersicon esculentum</i>		<i>LePT4</i>
	<i>Medicago truncatula</i>		<i>MtPT4</i>
	<i>Oryza sativa</i>		<i>OsPT11</i>
	<i>Solanum tuberosum</i>		<i>StPT3</i>
	<i>Zea mays</i>		<i>ZmPT6</i>
	<i>Glomus versiforme</i>	<i>GvPT</i>	
<i>Glomus intraradices</i>	<i>GiPT</i>		
Nitrógeno en forma de amonio y nitrato	<i>Medicago truncatula</i>		<i>MtAMT1;1</i>
	<i>Oryza sativa</i>		<i>OsAMT3;1</i>
	<i>Glomus intraradices</i>	<i>GintAMT1</i>	
	<i>Lycopersicon esculentum</i>		<i>LeNRT2;3</i>
	<i>Medicago truncatula</i>		Nitrato no caracterizado
	<i>Lotus japonicus</i>		<i>LjAMT2;2</i>
	<i>Glycine max</i>		<i>GmAMT3;1,</i> <i>GmAMT4;4,</i> <i>GmAMT4;1,</i> <i>GmAMT1;4</i>
	<i>Sorghum bicolor</i>		<i>SbAMT3;1</i>
<i>Oryza sativa</i>		<i>OsPTR2</i>	
Potasio	<i>Medicago truncatula</i>		Intercambiador catiónico/H+
	<i>Solanum lycopersicum</i>		<i>SIHAK10</i>
	<i>Lotus japonicus</i>		<i>LjKUP</i>
	<i>Rhizophagus intraradices</i>	<i>RiHAK</i>	
Agua (acuaporinas)	<i>Glycine max</i>		<i>GmPIP1; GmPIP2</i>
	<i>Lactuca sativa</i>		<i>LsPIP1; LsPIP2</i>
	<i>Lycopersicon esculentum</i>		<i>Nramp2</i>
	<i>Medicago truncatula</i>		<i>MtNIP1</i>
	<i>Oryza sativa</i>		<i>NIP</i> no caracterizado
	<i>Petroselinum crispum</i>		<i>PcRb7</i>
	<i>Phaseolus vulgaris</i>		<i>PvPIP1;2</i>
	<i>Petroselinum crispum</i>		<i>PcTIP</i>
	<i>Medicago truncatula</i>		<i>MtTIP</i>
	<i>Nicotiana tabacum</i>		<i>NtAQP1</i>
<i>Rhizophagus intraradices</i>	<i>GintAQP1/2</i>		
Agua (dehidrinas)	<i>Glycine max</i>		<i>gmlea8</i>

	<i>Glycine max</i>	<i>gmlea10</i>
	<i>Lactuca sativa</i>	<i>lsla1</i>
	<i>Lactuca sativa</i>	<i>LsLea</i>
Azufre en forma de sulfato	<i>Medicago truncatula</i>	<i>MtSULTRs</i>
	<i>Medicago truncatula</i>	<i>MtSUT1-1/2/4-1;</i>
		<i>MtSt1; MtHext1</i>
Carbohidratos	<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>SISUT2</i>
	<i>Rhizophagus intraradices</i>	<i>RiMST2</i>
		<i>RiSUC1</i>

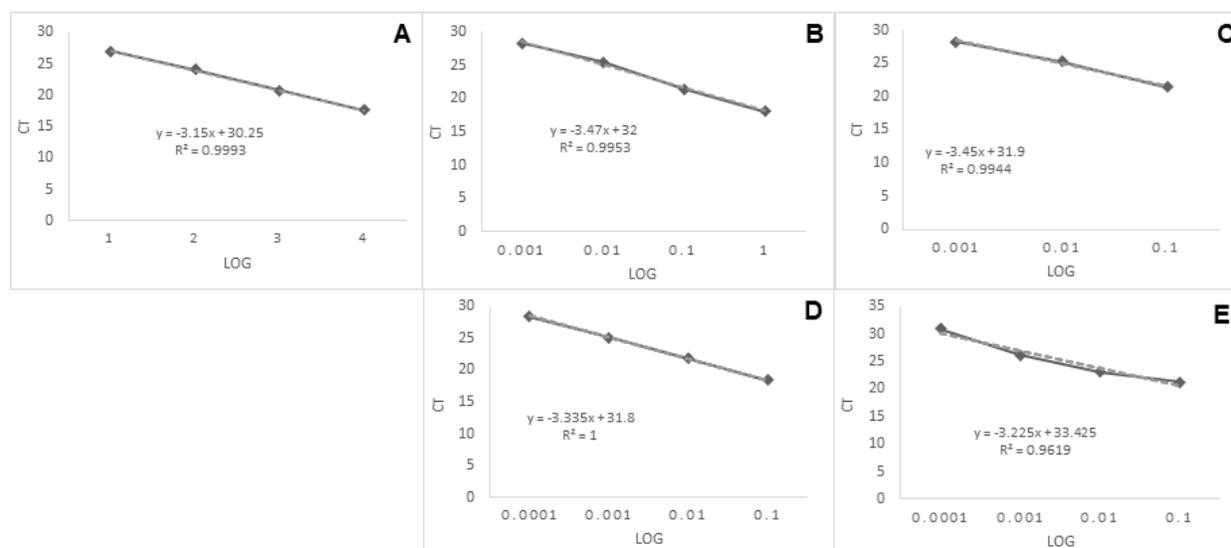
Anexo 2. Efecto de la inoculación de HMA en la aclimatización de plantas micropropagadas mono y dicotiledóneas.

Huésped	Control	Con HMA	Nivel de incremento	Especies de HMA	Fuente de inóculo	Reference
Monocotiledóneas:						
<i>Kalopanax septemlobus</i>	75	82	1.09	<i>Glomus and Acaulospora,</i>	Nativos	Aggangan <i>et al.</i> , 2013
<i>Arundo donax</i>	85	100	1.17	<i>R. intraradices</i>	Comerciales	Tauler <i>et al.</i> , 2015
<i>Gloriosa superba</i> L.	76.6	91.1	1.18	<i>A. laevis, G. mosseae</i>	Nativos	Yadav <i>et al.</i> , 2013
<i>Agave grijalvensis</i>	80	100	1.25	<i>G. fasciculatum</i>	Comerciales	Santiz-Gomez <i>et al.</i> , 2019
<i>Chrysanthemum dendranthemum</i>	59.6	83.2	1.39	<i>A. laevis, A. scrobiculata, G. fasciculatum</i>	Comerciales	Hashem <i>et al.</i> , 2014
<i>Etlingera elatior</i> (Jack)	40	85	2.12	<i>C. etunicatum, G. albida</i>	Cultivo puro	Da Silva <i>et al.</i> , 2017
Dicotiledóneas:						
<i>Coffea canephora</i>	92.5	97.7	1.05	<i>G. fasciculatum, G. clarum</i>	Cultivo puro	Gonzalez <i>et al.</i> , 2004
<i>Melia volkensii</i>	89.7	100	1.11	<i>G. margarita, A. scrobiculata, G. mosseae, G. etunicatum, G. intraradices</i>	Nativos y comerciales	Dushimimana <i>et al.</i> , 2022
<i>Cynara cardunculus</i> L. var. <i>scolymus</i>	75	87.5	1.16	<i>G. viscosum, Rhizophagus intraradices, G. viscosum cultivos puros, G. intraradices</i>	Comerciales	Trinchera <i>et al.</i> , 2015
<i>Tetraclinis articulata</i>	40	60	1.5	<i>Glomus fasciculatum</i>	Cultivo puro	Morte <i>et al.</i> , 1996
<i>Capsicum annuum</i>	60	100	1.66	<i>G. albidum G. claroides, G. diaphanum, A. laevis, A. scrobiculata, E. colombiana, G. gigantea, G. manihotis, S. heterogama, G. manihotis, G. mosseae, G. gigantea</i>	Nativos	Estrada-Luna <i>et al.</i> , 2003
<i>Vitis vinifera</i> L.	45.3	85.6	1.88	<i>G. mosseae, A. laevis, G. manihotis</i>	Cultivo puro	Krishna <i>et al.</i> , 2005
<i>Punica granatum</i> L.	40	87	2.17	<i>G. mosseae, A. laevis, G. manihotis</i>	Cultivo puro	Singh <i>et al.</i> , 2012

Anexo 3. Similitud de secuencias de nucleótidos de los diferentes genes con otras especies en GenBank.

Nombre	Tamaño (pb)	Especies con similitud en accesiones GenBank	Query cover (%)	Identidad (%)
<i>NIP1</i>	1372	<i>Phoenix dactylifera</i> NEP1-interacting protein 1-like (LOC103714528), mRNA	30	88.64
<i>PHT1;5</i>	294	<i>Elaeis guineensis</i> inorganic phosphate transporter 1-4 (LOC105055581), mRNA	100	94.56
<i>AMT3;3</i>	625	<i>Elaeis guineensis</i> ammonium transporter 3 member 1 (LOC105046176), mRNA	100	95.70
<i>HAK1;1</i>	3489	<i>Elaeis guineensis</i> probable potassium transporter 11 (LOC105059880), transcript variant X1, misc_RNA	91	94.60
<i>LEA1;4</i>	742	<i>Elaeis guineensis</i> late embryogenesis abundant protein Lea14-A (LOC105040787), mRNA	91	92.14

Anexo 4. Curvas estándar de genes utilizados para las reacciones de qt-PCR.



Anexo 5. Eficiencia de los oligonucleótidos diseñados.

Oligonucleótido	Intercepto m	Eficiencia (%)
<i>NIP1</i>	-3.15	107.71
<i>AMT3;3</i>	-3.45	94.91
<i>LEA1;4</i>	-3.47	94.17
<i>PHT1;5</i>	-3.335	99.45
<i>HAK1;1</i>	-3.225	104.46

Anexo 6. Solución mineral para hidratación de polvillo de coco.

Químico	Cantidad (g/L)
NH ₄ Cl	26.8
KNO ₃	101.2
KCl	149.6
H ₂ NaPO ₄	27.56
H ₃ BO ₃	0.3092
MgSO ₄ – 7H ₂ O	24.8
MnSO ₄	0.848
KI	0.832
CuSO ₄	0.0248
ZnSO ₄ – 7H ₂ O	0.72
NiCl ₂ -6H ₂ O	0.0024
CaCl ₂ -2H ₂ O	29.4
CoCl ₂	0.024
Na ₂ MoO ₄ -2H ₂ O	0.024
C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ -2H ₂ O	3.724
Fe ₂ SO ₄ -7H ₂ O	1.5

Tiamina	0.1012
Piridoxina	0.1028
1.-Ácido nicótico	0.1
1.-Mio- Inositol	10
1.-Asparragina	8.8
Arginina	10
Glutamina	10
