Ciencia y Tecnología
Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación
CICY

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

"Diversidad genética en *Carludovica palmata* Ruiz & Pavón en México"

Tesis que presenta

LUCÍA DEL CARMEN CHI CHI

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS
(Ciencias Biológicas: UNIDAD DE BIOLOGÍA INTEGRATIVA)

Mérida, Yucatán, México

2025

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

CICY

RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Lucía del Carmen Chi Chi titulado **Diversidad genética en *Carludovica palmata* Ruiz & Pavón en México,** fue realizado en la Unidad de Biología integrativa, en la línea de investigación de Metabolismo integrativo, en el laboratorio 26 del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la Dirección del Dr. Gregorio del Carmen Godoy Hernández, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro y la Codirección de la Dr. Tomas Augusto González Estrada de la UNESCO

Atentamente

Dr. José Luis Hernández Stefanoni
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 15 de abril de 2025

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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

Firma: LUCÍA DEL CARMEN CHI CHI

Este trabajo se llevó a cabo en la **Unidad de Biología Integrativa**, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y forma parte del proyecto titulado “Diversidad genética en *Carludovica palmata* Ruiz & Pavón en México bajo la dirección del Dr. Gregorio Godoy Hernández y en Codirección con el Dr. Tomás Augusto González Estrada de la UNESCO.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, y a la Unidad de Biología Integrativa por darme la oportunidad de desarrollar satisfactoriamente este proyecto en sus instalaciones.

Al CONAHCYT por la beca otorgada, con matrícula de CVU: **861148**

Al Dr. Gregorio Godoy Hernández por darme la oportunidad de estar en su grupo de trabajo, por su paciencia, por permitirme ser líder del proyecto, por su forma de llamarme la atención cuando no estoy en lo correcto, y por siempre apoyarme en la parte técnica.

Igual por liderarme cuando me pongo mal y quiero dejar todo, siempre me decía apúrate y sonreía.

A la Dra. Miriam Ferrer, a ella mi especial agradecimiento por el giro que dio el proyecto, por su paciencia en la parte teórica, por su valiosa asesoría al momento de correr las muestras en los programas, por guiarme en todo momento para la interpretación de datos. Porque aún enferma, ocupada, incluso en vacaciones, me brindó las asesorías necesarias. ¡Gracias Dra.!

Al Dr. Tomás Estrada, por sus consejos sobre el proyecto, si bien la idea principal de hacer los estudios de la diversidad genética en *C*. *palmata* fue suya, por proponerme utilizar los marcadores SCoT e IRAP, por sus asesorías para el predoctoral, por sus observaciones para el documento de tesis y el artículo.

Al Dr. Luis Sáenz Carbonell, de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, por el apoyo técnico en la parte de datos moleculares al inicio del proyecto, y permitirme trabajar en su laboratorio, por su asesoría y su motivación constante, ¡Muchas gracias Dr.!

Agradezco al Mc. Iván Córdoba Lara, por brindarme asesoría en la parte técnica sobre la extracción del ADN en cocotero y en *C*. *palmata*, sobre sus aportaciones en la interpretación de los diferentes loci polimórfico, por sus ánimos hacia mi persona.

Al Dr. Felipe Vázquez, Dr. Muchas gracias por sus asesorías para el predoctoral, por sus sugerencias para el proyecto. Por adoptarme como su alumna y preocuparse por mí, por su constante motivación, no olvidaré sus palabras... ¡El doctorado es pesado, si no cualquiera lo haría!

Dr. Jaime Martínez, un especial agradecimiento por sus asesorías durante la redefinición del proyecto hacia los estudios las poblaciones en rizoma y a partir de semillas, por sus

observaciones para el trabajo.

A la MC. Elidé Avilés por el apoyo durante los muestreos del trabajo con *C. palmata* y por su valioso apoyo técnico en el laboratorio 26.

A la Dra. Renata Rivera Madrid, por preocuparse en el segundo predoctoral y darme asesoría en cuestiones de genética de poblaciones.

A la Dra. Georgina Estrada, por permitirme trabajar en su laboratorio en algunas pruebas de geles de agarosa de calidad.

A Rodolfo Pech por sus sugerencias y por el apoyo de doble conteo de loci polimórficos.

A la MC. Mildred Carrillo, agradezco su apoyo técnico para las pruebas moleculares y la estandarización de los cebadores IRAP y SCoT.

MC. Luis Carlos Gutiérrez, por brindarme su amistad y constante motivación, por alentarme a no rendirme.

Un especial agradecimiento al Dr. Ignacio Islas, por su orientación y por el apoyo en momentos de crisis, cuando estuvo de Coordinador de la opción BBMP, no era su trabajo hacerlo de psicólogo, pero sus consejos me funcionaron.

LISTA DE LOS PRODUCTOS GENERADOS

“Molecular assessment of genetic diversity in rhizome and seed-propagated plants of *Carludovica palmata* (Ruiz & Pavón) in México."

DEDICATORIAS

"Cuando siento rendirme recuerdo porque inicie"

A Dios, por darme la capacidad, fortaleza y resiliencia que pedía en momentos difíciles, por permitirme ser valiente para enfrentar las adversidades durante del posgrado. Gracias porque vencí cada miedo, estoy muy contenta y lista para lo que sigue. No hice el posgrado pensando que iba a ser Dra. en ciencias (científico). Lo que me inspiró fue quedarme más tiempo en el laboratorio, hacer cada experimento con pasión y lo logré…

A mi madre Lucía Candelaria Chi Chi, a ti por permitirme soñar despierta, por apoyarme siempre, por guiarme en todo momento, ¡Gracias madre!

A mis hermanas, va por ustedes hermanas mías, gracias por su apoyo incondicional. Hermana Victoria Chi, por ser mi soporte en momentos difíciles, Emma Chi, por estar siempre conmigo, Alexandra Ramírez, por tu respeto y admiración.

A mis sobrinos Karol, Regina y Daniel, gracias por llegar a alegrar mi vida, por su amor y cariño hacia a mí.

A mis compañeros de posgrado que veía admirada del como sabían, trabajaban y entendían mecanismos y modelos, ¡yo quería ser como ellos!

Tal vez nunca lo lea, pero la Dra. Teresa Hernández fue una fuente de inspiración; desde sus clases, presentaciones en seminarios, hasta que personalmente me reconociera como buena estudiante.

A la Dra. Luisa López, porque es una mujer científica que inspira con su conocimiento y su intelecto. Le dedico mucho de lo he aprendido en el posgrado.

A mis amigas: Dafne, Diana, Evelyn, Adriana, Fabiola, Nidia, Saraí y Gladys.

A mis amigos: Federico, Marcos, Jorge, Samuel, Roberto, Stefano, Diego y Gilberto.

ÍNDICE Pág.

RECONOCIMIENTO.....i

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD ii

AGRADECIMIENTOS.....iii

LISTA DE LOS PRODUCTOS GENERADOS.....iv

DEDICATORIAS.....v

RESUMEN..... 17

ABSTRACT..... 18

INTRODUCCIÓN..... 19

1. CAPÍTULO I..... 22

1.1 ANTECEDENTES..... 22

1.1.1 *Carludovica palmata* Ruiz & Pavón..... 22

1.1.2 Sistema de propagación de *C. palmata*..... 22

1.1.3 Reproducción sexual de *C. palmata* en Campeche..... 23

1.1.4 Propagación clonal..... 24

1.1.5 Desventajas de la propagación clonal..... 25

1.1.5.1 Propagación clonal de *C. palmata* en la región norte de Campeche 25

1.2. Usos de la palma jipi..... 25

1.2.1 Importancia económica y cultural de *C. palmata* 26

1.3. Distribución geográfica de *Carludovica* 26

1.4. Aspectos genéticos: diversidad genética y marcadores moleculares. 27

1.4.1 Estudio de la diversidad genética 27

1.4.2 Estimadores de la diversidad genética 28

1.4.2 Factores determinantes de una baja diversidad genética en plantas 28

1.4.3 Cuellos de botellas que afectan a la diversidad genética 29

1.4.4 Efecto fundador y cuellos de botella 29

1.4.5 La domesticación 30

1.4.6 Manejo agronómico en plantas de propagación clonal. 30

1.4.7 Depresión endogámica 30

1.4.7.1 Factores determinantes de la depresión endogámica 31

1.4.7.2 Mecanismo de purga de alelos 31

1.4.7.3 Persistencia de las especies en escenarios de depresión endogámica 31

1.5 Herramientas moleculares de la diversidad genética 33

1.5.1 Marcadores moleculares de Polimorfismo Amplificado de Inter-Retrotransposones (IRAP). 34

1.5.2 Características de los marcadores moleculares IRAP 34

1.5.3 Elementos Transponibles (ET) 35

1.5.4 Constituyentes de los retrotransposones 35

1.5.4. 1 Retroelementos en el genoma de plantas 36

1.6 Polimorfismo dirigido al Codón de Inicio de la Traducción (SCoT) 38

1.6.2 Características de marcadores SCoT 40

1.6.3 Aplicaciones de los SCoT 41

RESUMEN DEL CAPÍTULO I 42

JUSTIFICACIÓN..... 43

HIPÓTESIS..... 43

OBJETIVO GENERAL 44

OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 44

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL..... 45

DESCRIPCIÓN DE LA ESTRATEGIA EXPERIMENTAL. 46

RESUMEN DEL CAPÍTULO II 48

CAPÍTULO II..... 49

2. MATERIALES Y MÉTODOS..... 49

2.1. Sitio de estudio 49

2.2.1 Plantas propagadas por rizoma de *C. palmata*..... 50

2.2.2 Sitios del cultivo de plantas propagadas a partir de rizomas 51

2.2.3 Plantas propagadas a partir de semillas..... 52

2.3 Extracción de ADN genómico 54

2.4 Marcadores de Polimorfismo Amplificado Inter-Retrotransposones (IRAP). 55

2.5. Estandarización de los marcadores moleculares IRAP 55

2.6. Estandarización de los marcadores moleculares SCoT 56

2.6.1 Análisis de la diversidad genética 57

2.6.2 Estimadores de la diversidad genética 57

RESUMEN DEL CAPÍTULO III 59

3.1. RESULTADOS 60

3.1.2 Reproducibilidad de los marcadores moleculares IRAP y SCoT en *C. palmata* .. 60

3.2 Poder discriminatorio de los marcadores moleculares 61

3.3.1 Diversidad genética con los IRAP 62

3.3.2 Diversidad genética de Nei con los marcadores IRAP 62

3.3.3 Loci polimórfico con los marcadores moleculares SCoT 64

3.4 Escenarios del parentesco en *C. palmata* 66

3.4.1 Parentesco en plantas con autofecundación 66

CAPÍTULO IV 69

4.1 DISCUSIÓN 69

4.1.2 Reproducibilidad del marcador (IRAP-SCoT) 69

4.1.3 Diversidad genética con el Índice de Shannon y Nei 70

4.1.4 Parentesco en individuos de *C. palmata* 71

CONCLUSIONES GENERALES..... 74

PERSPECTIVAS 74

BIBLIOGRAFÍA..... 76

ANEXOS..... 89

ÍNDICE DE FIGURAS **PÁG**

Figura. 1. *Carludovica palmata* Ruiz & Pavón (Fayaz, 2011). 23

Figura. 2. Etapas de desarrollo de *C. palmata*. La numeración 1-11 son estadios de desarrollo de las infrutescencias, DDP: son días posteriores a la antesis. 24

Figura. 3. Distribución geográfica de *C. palmata* (modificado de Natural Resources Conservation Service, 2019). 26

Figura. 4. Factores que afectan a la diversidad genética (modificado de Carvalho et al., 2019). 29

Figura. 5. Estructura del retrotransposon LTR. Incluye al gen env, que en ocasiones está ausente en algunos retroelementos.. 36

Figura. 6. Secuencias de los retrotransposones en cebada en el locus Rar 1. Las líneas negras indican la dirección de los LTR (Shirasu et al., 2000). 37

Figura. 7. Disposición del cebador SCoT. (Tomado de Collard y Mackill, 2009). 39

Figura. 8. Diagrama de la técnica basado en los marcadores únicos SCoT (Modificado de Collard y Mackill, 2009). 40

Figura. 9. Esquema de estrategia experimental. 45

Figura. 10. Imagen satelital de los nueve sitios de muestreo de *C. palmata* en plantas por rizoma, en la región norte de Campeche, México 49

Figura. 11. Plantaciones en policultivo de *C. palmata* vía rizoma. 52

Figura. 12. Plantas a partir de semillas de *C. palmata* cultivadas en casa sombra. 54

Figura. 13. Identificación del polimorfismo en plantas de *C. palmata* a partir de semillas. Carriles (1-28), 11-A, son plantas a partir de semillas, amplificado con el marcador molecular SUKKULA. 60

Figura. 14. Identificación de polimorfismo en plantas provenientes de semillas de *C. palmata*. 61

Figura. 15. Variación genética de plantas de propagación por rizoma en el interior de la hacienda, con el marcador molecular SUKKULA. 99

Figura. 16. Variación genética de plantas de propagación por rizomas en el interior de la hacienda, con el marcador molecular 3'LTR.. 100

ÍNDICE DE CUADROS **PÁG**

Cuadro 1. Retrotransposones del contig 66 kb en el locus Rar-1 de *Hordeum vulgare*.... 37

Cuadro 2. Lista de marcadores SCoT diseñados, del codón de inicio ATG. (Tomado de Collard y Mackill 2009)..... 41

Cuadro 3. Características de plantas de *C*. *palmata* partir de rizoma en Campeche, México. 50

Cuadro 4. Registro de líneas a partir de semillas..... 53

Cuadro 5. Marcadores LTR, secuencia y orientación..... 55

Cuadro 6. Relación de la reacción de PCR (IRAP). 56

Cuadro 7. Relación de la reacción de PCR (SCoT). 56

Cuadro 8. Comparación de la estimación de la diversidad genética en *C*. *palmata* PIC y H'. (Marcadores dominantes mediante Índice de Contenido Polimórfico e Índice de Shannon Wiener)..... 62

Cuadro 9. Estimadores de la diversidad genética. (Lynch & Milligan method), cuando FIS = 0.25 y FIS = 0.5, en *Carludovica palmata*, empleando 22 loci de marcadores IRAP (SUKKULA, NIKITA, 3'LTR). Con el programa AFLP-SURV 1.0. (Vekemans V., 2002) en los dos grupos genéticos. 63

Cuadro 10. Estimadores de la diversidad genética. (Lynch & Milligan method), cuando FIS = 0.25 y FIS = 0.5, *Carludovica palmata*, empleando (26) loci de marcadores SCoT (SCoT-3, SCoT-5, SCoT-18) Con el programa AFLP-SURV 1.0. (Vekemans V., 2002) en los dos grupos genéticos. 65

Cuadro 11. Estimadores de la diversidad genética. (Lynch & Milligan method), cuando FIS =(0.25, 0.5 y 1) en *Carludovica palmata*, empleando 48 loci y utilizando tres marcadores IRAP (SUKKULA, NIKITA, 3'LTR), y cuatro marcadores SCoT (SCoT-3, SCoT-5, SCoT-18) computado con el programa AFLP-SURV 1.0. (Vekemans V., 2002)..... 67

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo.1. Protocolo de extracción de ADN de tejidos de cocotero e insecto utilizando el buffer CTAB. 89

Anexo. 2. Confirmación de ADN1 en muestras en *C. palmata* 90

Anexo 3. Estandarización de los marcadores IRAP 91

Anexo. 4. Estandarización de los marcadores SCoT 91

Anexo. 5. Identificación morfológica de líneas con polimorfismo 93

Anexo. 6. Identificación de líneas monomórficas 93

Anexo. 7. Características morfológicas en líneas de plantas de *C. palmata* con el marcador SUKKULA. 94

Anexo. 8. Confirmación del ADN en muestras en *C. palmata* vía rizoma 96

Anexo. 9. Cuadro comparativo de estudios realizados en *Carludovica.* 97

Anexo. 10. Clasificación taxonómica de *Carludovica* 97

ABREVIATURAS

dNTP	Desoxinucleótido Trifosfato
Taq pol	ADN polimerasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
EtBr	Bromuro de etidio
CTAB	Bromuro de cetiltrimetil amonio
SRAP	Polimorfismos relacionados con la secuencia
SSR	Repeticiones de secuencias simples o microsatélites (Simple Sequence Repeat)
H	Diversidad genética o diversidad de genes
H+	Diversidad genética total
NE	Número efectivo de alelos
HS	Diversidad genética de poblaciones
Nm	Flujo de genes
H'	Diversidad de Shannon
PIC	Información del contenido polimórfico
I	Diferenciación genética
LTR	Regiones terminales largas (Long Terminal Repeat)
ET	Elemento transponible
TIR	Repetición terminal invertida
SCoT	Polimorfismo dirigido al codón de inicio
IRAP	Polimorfismo amplificado inter-retrotransposones (Interrretrotransposon amplified polymorphism)
SCAR	Región amplificada caracterizada por una secuencia (Sequence-characterised amplified region)
LTR-RT	Retrotransposones de repetición terminal larga
RAPDS	Polimorfismo de ADN amplificado al azar (Random amplified polymorphic DNA)
PLE	Elementos tipo Penélope
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido (Single nucleotide polymorphism)
RFLP	Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (Restriction fragment length polymorphism)
AMOVA	Análisis de varianza molecular
FIS	Coeficiente de endogamia
Nei	Diversidad genética de NEI

RESUMEN

Carludovica palmata, es una especie cultivada en la región norte de Campeche, de importancia agro-artesanal por sus fibras flexibles y duraderas utilizadas para el trenzado de sombreros y otras artesanías. Presenta dos mecanismos de propagación, por rizoma y por semillas. En México, se desconoce la diversidad genética del cultivo. El objetivo principal del trabajo es determinar la diversidad genética en plantas con dos tipos de propagación a partir de i) rizoma y ii) semillas. La diversidad genética y la diferenciación genética se determinaron con el programa AFLP-V2.0, que estima frecuencias alélicas para marcadores dominantes asumiendo que las poblaciones están en equilibrio de Hardy-Weinberg o presentan diferentes niveles de endogamia. Nuestros resultados confirman la reproducibilidad de 48 loci polimórficos utilizando a los marcadores del Polimorfismo Amplificado de inter-retrotransposones denominados IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) y los dirigidos al codón de inicio de la traducción denominados SCoT (Start Codon Targeted). Los marcadores IRAP: NIKITA, SUKKULA y 3'LTR, resultaron con polimorfismo, indicando un contenido de información polimórfica (PIC), con SUKKULA, (PIC = 0.28) en plantas de rizoma y un (PIC = 0.24) en plantas a partir de semillas, los valores para el marcador SCoT-18 (PIC = 0.30) en plantas por semillas y un (PIC = 0.15) en rizomas. La diversidad genética de *C. palmata* es baja como lo demuestra el índice Shannon Wiener (H' = 0.986) en plantas propagas a partir rizomas y (H' = 0.981) en plantas propagadas a partir de semillas, con la estimación de NEI, se determinó que la heterocigosidad esperada (HE = 0.2892, en rizomas y HE = 0.27056, en plantas a partir de semillas) resultando una diversidad genética similar en ambos grupos de propagación, sin cambios significativos. Respecto a los diversos escenarios de apareamiento entre parientes cercanos, la diversidad genética fue similar a entre medios hermanos (FIS=0.25), hermanos completos (FIS=0.5) o inclusive cuando se considera autofecundación (FIS=1), aunque resultó en la disminución de heterocigosidad esperada. Por tanto, en la región norte de Campeche la diversidad genética en *C*. *palmata*, proviene de una base genética estrecha y con posibilidades de estar enfrentando escenarios de apareamientos con parientes cercanos, que causarían en algún momento pérdida de la diversidad genética, aumento de niveles de endogamia y riesgos para el cultivo como la pérdida de alelos de interés, infertilidad en semillas y ser propensos al ataque de patógenos.

ABSTRACT

Carludovica palmata, is a species cultivated in the northern region of Campeche, of agro-craft importance for its flexible and durable fibers used for braiding hats and other handicrafts. It has two propagation mechanisms, by rhizome and by seeds. In México, the genetic diversity of the crop is unknown. The main objective of this work is to determine the genetic diversity in plants with two types of propagation from i) rhizome and ii) seeds. Genetic diversity and genetic differentiation were determined with the AFLP-V2.0 program, which estimates allele frequencies for dominant markers assuming that populations are in Hardy-Weinberg equilibrium or present different levels of inbreeding. Our results confirm the reproducibility of 48 polymorphic loci using Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism (IRAP) and Start Codon Targeted (SCoT) markers. The IRAP markers: NIKITA, SUKKULA and 3'LTR, resulted with polymorphism, indicating a polymorphic information content (PIC), with SUKKULA, (PIC = 0.28) in rhizome plants and a (PIC = 0.24) in plants from seeds, the values for the SCoT-18 marker (PIC = 0.30) in plants from seeds and a (PIC = 0.15) in rhizomes. The genetic diversity of *C. palmata* is low as shown by the Shannon Wiener index (H' = 0.986) in plants propagated from rhizomes and (H' = 0.981) in plants propagated from seeds, with the NEI estimation, it was determined that the expected heterozygosity (HE = 0.2892, in rhizomes and HE = 0.27056, in plants from seeds) resulting in a similar genetic diversity in both propagation groups, without significant changes. Regarding the different mating scenarios between close relatives, genetic diversity was similar to that between half-siblings (FIS=0.25), full siblings (FIS=0.5) or even when considering self-fertilization (FIS=1), although it resulted in the expected decrease in heterozygosity. Therefore, in the northern region of Campeche, genetic diversity in *C. palmata* comes from a narrow genetic base and the possibility of facing mating scenarios with close relatives, which would cause at some point loss of genetic diversity, increased levels of inbreeding and risks for the crop such as loss of alleles of interest, seed infertility and being to pathogen attack.

INTRODUCCIÓN

La determinación de la diversidad genética, permite analizar estrategias para la conservación del germoplasma, selección de recursos genéticos con tolerancia a plagas y enfermedades (Carvalho et al., 2019; Govindaraj et al., 2015; Lombardi et al., 2014). El estudio de plantas de importancia comercial, con herramientas y enfoques ómicos permite obtener información a preguntas biológicas (Carvalho et al., 2019). Para especies cultivadas, es importante evaluar que tanta diversidad genética se puede encontrar en las poblaciones con distintos tipos de cultivo (Piñero et al., 2010). En los cultivos, la selección de pocos individuos o genotipos puede conducir una baja diversidad genética (como resultado del efecto fundador y la deriva genética) (Ahuja & Jain, 2015; Klimova et al., 2022). Adicionalmente, los cuellos de botella que ocasionan los desastres naturales o el abandono del cultivo, la propagación clonal y la endogamia, conducen a una baja diversidad de alelos (Khoury et al., 2022; Reif et al., 2005).

En México *C. palmata*, se cultiva en la región norte de Campeche y la materia prima que se utiliza son las hojas inmaduras, que tienen un interés agro-artesanal porque sus fibras son suaves, resistentes y de calidad, empleado para el trenzado de sombreros y de otras artesanías (Artesanías de Colombia, 2014; Escobar, 2001). *C. palmata* presenta dos tipos de propagación; la sexual, mediante la fusión de gametos en la formación de semillas y la asexual, mediante la formación de rizomas. En la región norte de Campeche *C. palmata*, se cultiva en sitios de traspatio y zonas de policultivo, dado que su propagación es exclusivamente clonal, por la siembra de rizomas esta es una alternativa para los agricultores porque permite una rápida multiplicación de hijuelos seleccionados por características deseables (Denham et al., 2020; McKey et al., 2010). Sin embargo, las clonas pudieron ser seleccionadas por una o por pocas características de interés en el cultivo, por ejemplo, una clona puede crecer rápido, pero produce una fibra dura; mientras que otra se desarrolla más lento, pero con fibra suave y de calidad. Dado que la propagación es clonal, los descendientes se propagan sin que ocurran eventos celulares meióticos y, por ello, sin recombinación sexual (White et al., 2023; Stuefer et al., 2002) lo que reduce la diversidad genotípica de *C. palmata*. Ante estas circunstancias en el cultivo de *C. palmata*, se desconoce si las semillas que se forman de una infrutescencia provienen de apareamientos por auto-fecundación o mediante fecundación cruzada. Sin embargo,

asumiendo que en un solar se cultivan una o pocas líneas clonales, muchos de los apareamientos podrían ser endogámicos, lo que resultaría en una baja variabilidad genética y poca diferenciación con las líneas clonales cultivadas derivando de un efecto fundador. Para estimar la diversidad de una especie, se utilizan estrategias moleculares como son los marcadores moleculares de ADN, que resultan ser funcionales para determinación de la diversidad genética. Estos segmentos de ADN, se encuentran en el genoma de diferentes organismos, principalmente en sitios donde no codifican para proteínas, por tanto, son llamados también "marcadores moleculares neutrales" (Collard et al., 2005). Los marcadores moleculares al tener secuencias cortas de ADN, logran hibridarse con la secuencia diana y brindar información sobre su diversidad (Nadeem et al., 2018; Collard et al., 2005). En organismos con genomas grandes, se conservan secuencias de ADN repetitivo, los llamados retrotransposones (Shirasu et al., 2000), se distinguen por tener repeticiones terminales largas (LTR) y pertenecen a los retrotransposones de clase I, estos se clasifican según el orden de genes para la transcriptasa inversa (RT), RNasaH e integrasa, y por la similitud de sus secuencias en los grupos Ty1-copia y Ty3-gypsy. Los marcadores moleculares basados en retrotransposones de ARN se pueden insertar por completo en el genoma de las plantas, y promover cambios y la expansión del genoma (Ferreira et al., 2023; Arvas et al., 2022). Los marcadores del polimorfismo amplificado de inter-retrotransposones, denominados IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism), pertenecen al tipo de Clase I, que son ideales para los estudios de la variabilidad genética, identificación de huellas genéticas en especies, y mapeo genético de plantas (Orozco-Arias et al., 2019). En cebada (*Hordeum vulgare*), fueron descritos por primera vez y permitieron la amplificación de fragmentos de 500-3000 pb (Kalendar et al., 2010; Shirasu et al., 2000). Otros marcadores son los diseñados a partir de secuencias conservadas de genes de plantas, el polimorfismo dirigido al codón de inicio de la traducción ATG, denominados SCoT (Start Codon Targeted), marcadores que generan fragmentos amplificados de aproximadamente 500-3000 pb (Khodaee et al., 2021; Collard & Mackill, 2009), y que son utilizados para estudios de diversidad genética, para la determinación de estrés en plantas y para mapeos de loci cuantitativos. Los marcadores IRAP y los SCoT, generan amplicones en el genoma y cuando encuentran al complemento del cebador (secuencia diana) puede presentar un polimorfismo, o al estar ausente de la secuencia diana, una mutación.

Los marcadores moleculares son de naturaleza dominante y no se pueden emplear para evaluar la frecuencia de individuos heterocigotos, y realizar los cálculos de heterocigosidad para evaluar la diversidad y la estructura genética. Para ello, existen alternativas utilizando a estos marcadores dominantes, el primero está relacionado con la capacidad que tienen para distinguir el polimorfismo y su reproducibilidad. El empleo de los marcadores moleculares requiere que sean reproducibles, es decir, que puedan ser amplificados obteniendo los mismos alelos (p. ej. amplicones del mismo peso molecular) y que sean polimórfico (que tengan al menos dos alelos y el alelo más común tenga una frecuencia menor del 95-99%). Los estimadores más usados para valorar el poder discriminatorio de los marcadores moleculares son el Contenido de Información Polimórfica (PIC), y el Índice de Shannon Wiener (Serrote et al., 2020; Botstein et al., 1980). Una segunda opción es el empleo de métodos Bayesianos, que emplean como prioris los coeficientes de endogamia, ya sea que se conozcan por la estimación de marcadores co-dominantes o se infieran de la biología de la especie (Vekemans, 2002).

En este trabajo se utilizaron dos aproximaciones antes descritas para los marcadores dominantes (IRAP y SCoT) y para la estimación de la diversidad genética en plantas de *C. palmata* propagadas i) por rizoma y ii) por semillas. Hasta el momento en México no hay estudios de la diversidad genética. Debido a esto, es probable que las poblaciones establecidas provengan de pocos genotipos o de genotipos emparentados, derivando de un efecto fundador, para ello se realizaron las estimaciones para determinar la diversidad genética y se asumió escenarios en la región norte de Campeche, que pudieran sugerir apareamientos entre parentales cercanos (FIS =0.25, 0.5 y 1). Donde los siguientes escenarios: incluyen a las 28 líneas de plantas propagadas a partir de semillas que provienen de una inflorescencia distinta, por lo que, si el polen que las fecundó proviene de diferentes padres, todas las semillas son medias hermanas (FIS=0.25), si el polen proviene de una planta diferente a la de la inflorescencia, todas las semillas son hermanas completas (FIS =0.5) y si el polen es de la misma planta que produjo la inflorescencia todas las semillas son de auto-fecundación (FIS=1).

1. CAPÍTULO I

1.1 ANTECEDENTES

1.1.1 *Carludovica palmata* Ruiz & Pavón

Carludovica palmata, es una planta monocotiledónea que pertenece al género *Carludovica,* uno de los 12 géneros de la familia Cyclanthaceae (Teichert, 2008), se encuentra dentro de la subfamilia *Carludovicoidae* que incluye cuatro especies: *C. palmata*, C. *rotundifolia*, *C. drudei* y *C. sulcata* (Harling, 1958). Se conoce comúnmente como palma jipi, jipi japa, y palma toquilla (Duke, 1986; Bristol, 1961). La importancia de la especie es por la fibra, suave, flexible y duradera, que es utilizada para el trenzado del "sombrero de Panamá" y para la confección de diferentes artesanías como: bolsos, productos de limpieza, carrieles, alpargatas, sombrillas, cinturones, bandejas y productos de decoración (Artesanías de Colombia, 2014; Escobar, 2001).

1.1.2 Sistema de propagación de *C. palmata*

En *C. palmata*, se presentan dos tipos de propagación; la sexual mediante la fusión de gametos en la formación de semillas y la asexual, mediante la formación de rizomas en poblaciones silvestres (Bacab-Caamal, 2020; Ortega Haas, 2013). La biología reproductiva de *C. palmata* ha sido poco estudiada y se basa en la descripción morfológica de inflorescencias e infrutescencias (Bacab-Caamal, 2020; Franz, 2007; Wilder, 1988). En la región norte del estado de Campeche, el manejo de los productores promueve la propagación clonal por medio del trasplante de hijuelos. Durante la etapa reproductiva de *C. palmata* que abarca los meses de octubre a junio regularmente los productores eliminan las inflorescencias limitando la propagación por semilla de la especie en la región (Bacab-Caamal, 2020; Muñoz y Tuberquia, 1999).

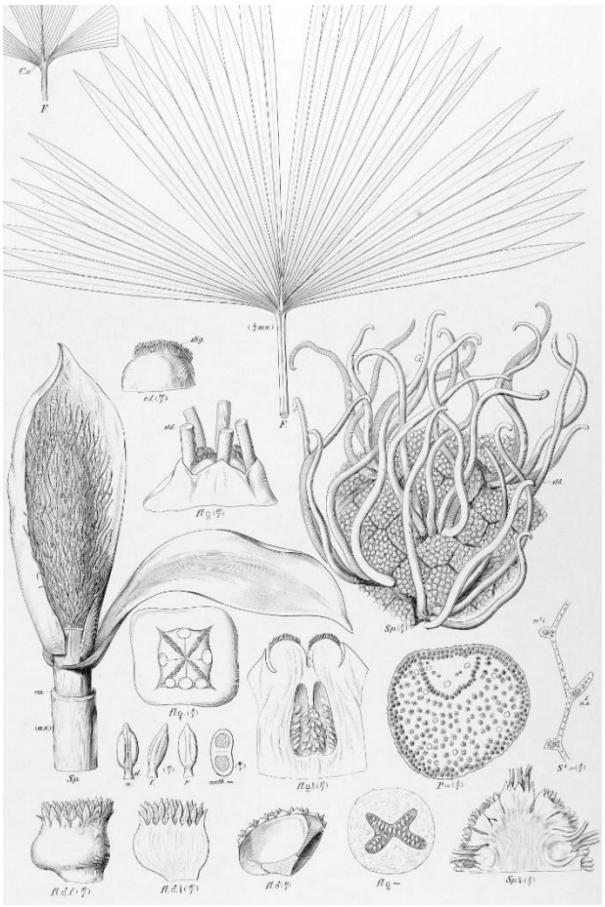


Figura1. *Carludovica palmata* Ruiz & Pavón (Fayaz, 2011).

1.1.3 Reproducción sexual de *C. palmata* en Campeche

En plantaciones de palma jipi localizadas al norte de Campeche, durante la etapa reproductiva se han encontrado de 4-7 estructuras en diferente estadio de desarrollo, la floración ocurre aproximadamente a los dos meses. La distribución de las inflorescencias de flores pistiladas (femeninas) y de flores estaminadas (masculinas) (Sajo et al., 2014; Wilder, 1977) muestra el carácter protogínica, es decir, las flores se encuentran dispuestas en la maduración del gineceo aproximadamente 24 horas antes del androceo con las flores desarrollándose en el ápice y posteriormente en la base (Bacab-Caamal, 2020; Cortes et al., 2018; Sajo et al., 2014; Franz, 2007). En la Figura 2, Bacab-Caamal, (2020), identificó 11 etapas durante el desarrollo de semillas, la disposición de las infrutescencias, parámetros morfológicos: peso, longitud, coloración, grosor del espádice por etapa, coloración en corteza y aumento en tamaño de las infrutescencias, así como características en semillas maduras; de color naranja a rojizo, de un tamaño de 2 mm aproximadamente y

una germinación baja del 5 %.

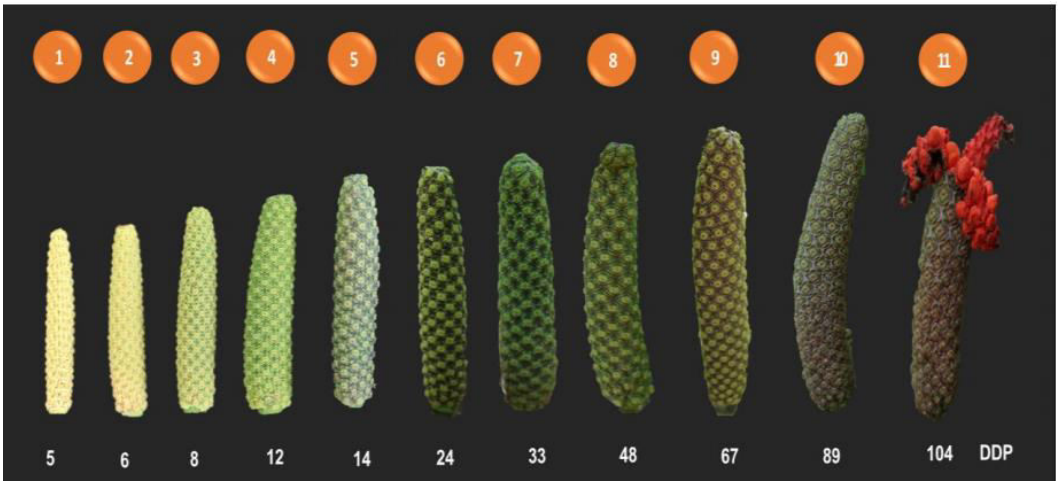


Figura 2. Etapas de desarrollo de *C. palmata***.** La numeración **1-11** son estadios de desarrollo de las infrutescencias, **DDP**: son días posteriores a la antesis.

1.1.4 Propagación clonal

Las plantas con flores poseen una diversidad incomparable de mecanismos para lograr la reproducción sexual y asexual, a menudo simultáneamente. El crecimiento clonal es la capacidad de un individuo para dar lugar a un número de individuos genéticamente dénticos pero fisiológicamente y potencialmente independientes (Herben & Klimesová, 2020; Duchoslavová & Jansa, 2018; You et al., 2014). En muchas plantas cultivadas, la propagación clonal permite la selección de genotipos de interés en poblaciones silvestres y el mantenimiento de las características en las líneas clonales. A su vez, la generación de mutaciones favorables y la identificación de genotipos novedosos (Zhang et al., 2021; McKey et al., 2010). Por ejemplo, la papa (*Solanum tuberosum* L.) es, después del arroz y el trigo, el tercer cultivo de mayor importancia en el mercado, y la propagación clonal representa el 10% de los costos de producción (Reslow et al., 2022; Andrivon, 2017). Las líneas clonales son seleccionadas a partir de cruces biparentales, que utiliza cultivares disponibles o clones de mejoramiento avanzado, o partir de semillas híbridas germinadas. Durante esta selección estricta, se asegura el cultivo clonal por más de 10-15 años (Reslow et al.,2022) y se seleccionan por tamaño, por mayor producción de almidón, y por clonas con resistencia a plagas, como el caso de resistencia al tizón tardío, incluso, hay líneas clonales con alto rendimiento y sometidas a diferentes condiciones de estrés.

En yuca, durante la propagación de líneas que producen mayor cantidad de raíces

tuberosas y gruesas, la selección por propagación clonal ofrece ventajas en relación con la planta silvestre que produce una sola raíz, por tanto, la propagación clonal ofrece ventajas de selección para incrementar la producción de los cultivos (McKey et al., 2010).

1.1.5 Desventajas de la propagación clonal

En poblaciones en las que predomina la propagación clonal, las mutaciones provocan la reducción de la fertilidad y pueden provocar problemas durante la reproducción e incluso la pérdida de la reproducción sexual en grupos de especies. Entre otras desventajas se encuentra la depresión endogámica, que afecta la reducción de la fertilidad (Charlesworth & Willis, 2009; Lande & Schemske, 1985). Durante el crecimiento clonal masivo y extensivo puede causar afectaciones a las poblaciones, así, como afectar el funcionamiento de poblaciones, provocar sesgos en la morfología de genotipos, y dar paso a poblaciones con apareamientos entre parentales, incluso la pérdida de genotipos de interés.

1.1.5.1 Propagación clonal de *C. palmata* en la región norte de Campeche

En la región norte de Campeche, los agricultores han optado por la siembra de rizomas porque involucra menos tiempo para la obtención de fibras. Durante la propagación clonal de *C. palmata* resulta ventajoso porque los artesanos seleccionan y siembran en sus parcelas aquellas líneas que tienen cogollos más largos, plantas con fibra suave, así como, plantas que durante el proceso de blanqueamiento no pierdan suavidad y color, características importantes durante el trenzado de artesanías y que garantiza la calidad de los productos finales.

1.2. Usos de la palma jipi

En México y diferentes países sudamericanos la principal materia prima son las hojas inmaduras, donde se obtiene la fibra, para ello se somete a diferentes condiciones de lavado, secado y teñido (Ortega-Haas, 2016; Lobo, 2010). Una vez procesada la fibra con restos celulares como lignina, se realiza el trenzado del sombrero y de artesanías (Ríos, 2007). Entre otros usos, las hojas se utilizan en elaboración techos de las viviendas por indígenas del amazonia, es utilizada como planta medicinal, se usa como cataplasma sobre las heridas y para la prevención de infecciones (Bennett et al., 1992; López et al., 2006), la decocción de hojas, para el tratamiento de problemas hemostáticas y los frutos sin abrir son comestibles (Bennett et al., 1992).

1.2.1 Importancia económica y cultural de *C. palmata*

El cultivo de *C. palmata*, tiene relevancia por el impacto en la producción de fibras en las localidades mayas de la región norte de Campeche y sur de Yucatán, formando una red de producción de la fibra durante la elaboración de artesanías y en la comercialización. En consecuencia, tiene potencial en el desarrollo agro-artesanal y económico internacional. Tan solo los sombreros en el poblado de Santa Cruz ex-hacienda el sombrero de Panamá tiene mayor importancia económica, su valor es de aproximadamente $1,500 y $2,000 el precio varía según el modelo, el tipo de tejido y el color, su venta se localiza en establecimientos dentro del poblado y en las viviendas de los artesanos. Otro poblado es Becal, la venta de sombreros es mayor porque cuentan con una categoría de sombreros finos en aproximadamente $1,000 y $5,000 en tiendas en línea Hat (2020). La importancia cultural de *C. palmata* se debe a que la mayoría de las familias del poblado se dedican al trenzado de diferentes artesanías y al cultivo de palma jipi, representando de esta manera una actividad económica tradicional con la participación de familias enteras (Moo-Huchin et al., 2019). Adicionalmente, tiene importancia para la comunidad porque con las fibras se realizan las vestimentas de las participantes de la flor más bella, y en las festividades del poblado utilizan la fibra para diferentes temáticas (día de muertos y para las fiestas decembrinas).

1.3. Distribución geográfica de *Carludovica*

Figura 3. Distribución geográfica de *C. palmata* (modificado de Natural Resources Conservation Service, 2019).

C. palmata es nativa de América del sur y se distribuye por todo el Neotrópico, en los países de Guatemala, Colombia, Perú, Bolivia, Ecuador, Panamá y Venezuela. En México la introducción de la especie en 1866 (Fadiman, 2001) (Figura 3), con genotipos de diferentes partes de Centroamérica y que actualmente se distribuye en los estados: Tabasco, Campeche y Yucatán (Moo-Huchin et al., 2019; Sajo et al., 2014). En la región norte del estado de Campeche, el cultivo se localiza en comunidades como Tancuché, Nunkiní, Bécal, Calkiní, Santa Cruz y en la región suroeste de Yucatán. La mayoría de los plantíos son de propiedad familiar de aproximadamente 1 mecate de extensión 400 m^2 en Santa Cruz Ex Hacienda. El tipo de suelo es mayormente de luvisoles y leptosoles, aunque se desarrollan en suelos con altos contenidos en nutrientes y de textura arcillosa o franco arcillosa y profundos (Moo-Huchin et al., 2019; Ortega-Haas, 2013; Bennet et al., 1992). Las poblaciones establecidas generalmente provienen de pocos genotipos o de genotipos emparentados, derivando de un efecto fundador.

1.4. Aspectos genéticos: diversidad genética y marcadores moleculares.

La diversidad genética representa al total de alelos encontrados en una población finita (Piñero et al., 2010). La determinación de la diversidad genética, permite analizar estrategias para la conservación del germoplasma, selección recursos genéticos con tolerancia a plagas y enfermedades (Carvalho et al., 2019; Govindaraj et al., 2015; Lombardi et al., 2014). Para la estimación de diversidad genética, se usan medidas como el tamaño efectivo de una población, el número de alelos observados, la distribución de frecuencias en los alelos y del tipo de sistema marcador utilizado (Petit et al., 1998; Bashalkhanov et al., 2009). La importancia de la diversidad genética desde el punto de vista de conservación y recuperación largo plazo de especies, depende en gran medida que las poblaciones sean lo suficientemente diversas y lo suficientemente grandes como para adaptarse a los cambios en el medio ambiente, resistencia a plagas y evitar niveles de endogamia (Peery et al., 2012).

1.4.1 Estudio de la diversidad genética

Las plantas monocotiledóneas se distribuyen en la mayoría de los hábitats terrestres y exhiben una extraordinaria diversidad en formas vegetativas y florales. Muchas de estas especies abarcan cultivos sustentan gran parte de la dieta humana (Soto-Gómez, 2020; Givnish et al., 2018; Ulijaszek et al., 2012). La determinación de la diversidad genética en plantas de interés agrícola es crucial porque permite la obtención de líneas y genotipos que

aseguren el éxito del cultivo, y de genotipos que sean resistentes a plagas y enfermedades, así como, resistentes a los cambios ambientales (Carvalho et al., 2019).

1.4.2 Estimadores de la diversidad genética

Para la estimación de diversidad genética, se usan medidas como el tamaño efectivo de una población, el número de alelos observados, la distribución de frecuencias en los alelos y del tipo de sistema marcador utilizado (Bashalkhanov et al., 2009; Petit et al., 1998). Los estimadores de la diversidad genética tienen relación con la frecuencia alélica de la población, el flujo génico, la selección natural y los procesos reproductivos. Dentro de los parámetros cuantitativos para la determinación de la diversidad genética, se encuentran; tamaño efectivo de la población, heterocigosidad esperada, el porcentaje de polimorfismo, y la heterocigosidad observada (Piñero et al., 2010). Sin embargo, en una población el número de alelos observados y su distribución de frecuencias, dependen del tamaño de la muestra y del sistema de marcadores genéticos utilizados (Peery et al., 2012).

1.4.2 Factores determinantes de una baja diversidad genética en plantas

Dentro da diversidad genética existen factores que contribuyen a una baja diversidad de las poblaciones, entre ellas los cuellos de botellas que causan pérdidas de la diversidad genética y de alelos en corto y largo plazo, que provocaría depresión endogámica pero no tan severa porque sería contrarrestada por purgas dentro de la población (García-Dorado, 2021; García-Dorado, 2015). La baja diversidad genética tiene relación con la carga genética, la deriva genética y con el marcador determinante de la heterocigosidad y aptitud de la población (Reed y García-Dorado, 2021; Reed & Frankham 2015; Frankham, R. 2005) (Figura 4).

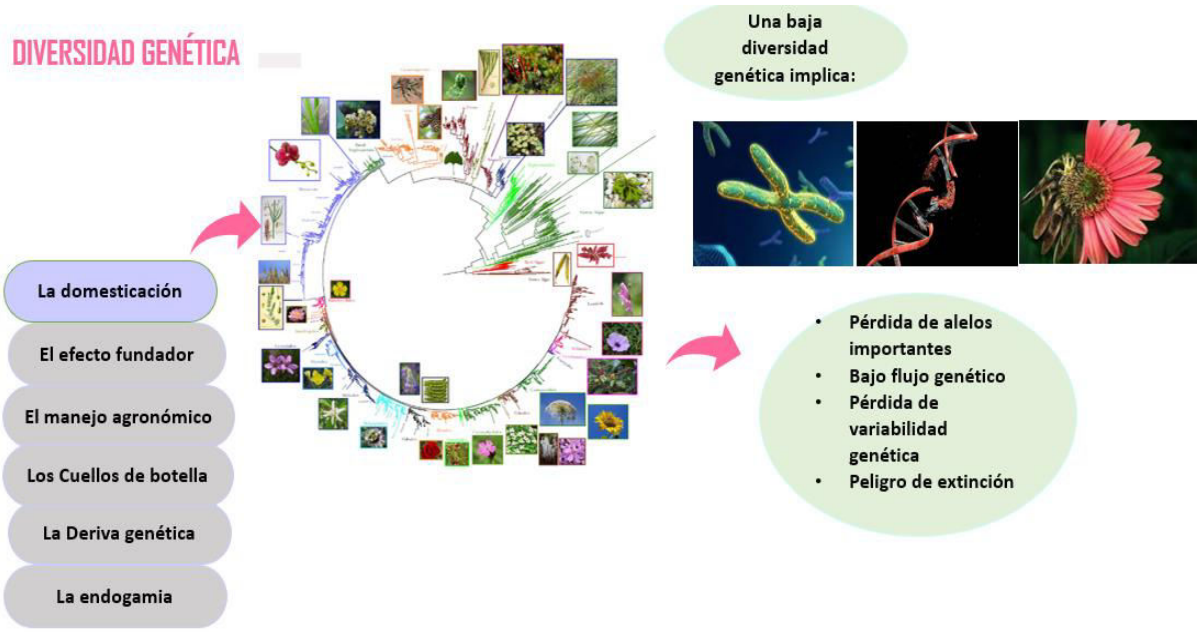


Figura 4. Factores que afectan a la diversidad genética (modificado de Carvalho et al.,2019).

1.4.3 Cuellos de botellas que afectan a la diversidad genética

Desde el punto de vista de conservación, la reducción del tamaño de la población, un "cuello de botella" puede ocasionar pérdida de la diversidad genética debido a la incapacidad de las especies a la adaptación a los cambios medioambientales, con la posibilidad de reducción de sus poblaciones y por tanto su extinción (Peery et al., 2012; Nei et al., 1975). Los cuellos de botella en las poblaciones aumentan el riesgo de tener niveles bajos de diversidad genética. Sin embargo, las poblaciones deben ser lo suficientemente diversas y lo suficientemente grandes para adaptarse a los cambios en el medio ambiente de lo contrario la diversidad estaría limitada (Peery et al., 2012; Frankham, 2005).

1.4.4 Efecto fundador y cuellos de botella

Dentro de las poblaciones fundadas, se exhiben un número reducido de individuos, y de alelos genéticamente limitados y con potencial evolutivo menor, estos factores negativos en poblaciones aumentan el riesgo de extinción. Una población fragmentada puede tener bajos niveles de flujo génico, diversidad genética limitada, exhibir taxones amenazados, y por consecuente un menor margen de inmigración de alelos que contrarrestan los efectos de la deriva génica (Peery et al., 2012; Nei et al., 1975). La importancia del mantenimiento de especies, se debe a la conservación y recuperación a largo plazo, de esta forma se evita

que las poblaciones sufran endogamia (Peery et al., 2012) (Figura 4).

1.4.5 La domesticación

Durante el proceso de domesticación de los cultivos, en su mayoría provienen de una pequeña población inicial, junto con una intensa selección de caracteres agronómicos, la mayoría de estos cultivos tienen menos variación genética que sus ancestros silvestres (Eyre-Walker et al., 1998; Tanksley & McCouch, 1997). Los efectos del proceso de domesticación incluyen un paso inicial, un evento de cuello de botella poblacional llamado, "cuello de botella de domesticación" este evento inicial para la selección de los cultivos, propicia la reducción de la diversidad genética de las variedades modernas y conlleva a una pérdida de genes. Para contrarrestar estos inconvenientes se han incrementado los esfuerzos para incorporar germoplasma élite en los programas de mejoramiento de los cultivos (Eyre-Walker, et al., 1998; Xiao et al., 1996) (Figura 4).

1.4.6 Manejo agronómico en plantas de propagación clonal.

Durante el crecimiento clonal masivo y extensivo, el funcionamiento de ciertas poblaciones se ve afectada por la morfología con sesgos, o la generación de poblaciones con un solo grupo de apareamientos. Por ejemplo, en poblaciones donde predominan el manejo agronómico y la propagación clonal, las poblaciones pueden sufrir mutaciones, reducción de la fertilidad, incluso pérdida de la reproducción sexual en grupos de especies, causando genotipos con mayor homocigosis. En poblaciones de plantas con entrecruzamiento de líneas consanguíneas, en plantas con autofecundación y poblaciones depresión endogámica hay mayor probabilidad de disminución de rasgos de aptitud, acumulación alelos deletéreos recesivos (Charlesworth & Willis, 2009; Lande & Schemske, 1985).

1.4.7 Depresión endogámica

La depresión endogámica, es aquel valor, como consecuencia directa de la consanguinidad o coeficiente de endogamia F (Wright, 1977). La consanguinidad, se refiere al aumento de la homocigosis en la descendencia de individuos emparentados (Pérez-Pereira et al., 2022) y el coeficiente FIS, indica la correlación por descendencia entre dos alelos en un locus. La depresión endogámica, es la reducción de la fertilidad y la descendencia de individuos emparentados, donde los rasgos de aptitud en las poblaciones silvestres se ven reducidos. En sistemas de plantas con entrecruzamiento de líneas consanguíneas, mejora cuando esta genera mayor (heterosis), un criterio muy importante para el mejoramiento de cultivos (Charlesworth & Willis, 2009; Lande & Schemske, 1985).

1.4.7.1 Factores determinantes de la depresión endogámica

La depresión endogámica, es causada por la presencia de mutaciones deletéreas recesivas en las poblaciones (homocigosis) causadas predominantemente en aquellas poblaciones que se auto-fecundan y causando reducción de la aptitud de la progenie (Lande & Schemske, 1985). En poblaciones con cruzamientos es común la depresión endogámica, pero es alta en especies con autofecundación alterando muchos de sus loci. En poblaciones con individuos endogámicos, la expresión de los alelos nocivos parcialmente recesivos puede ser heredados de forma idéntica por descendencia y entre parentales, provocando una reducción en el tamaño de la población y posiblemente una extinción de especies aisladas y en especies silvestres (Pérez-Pereira et al., 2022; Keller & Waller, 2002) (Figura 4).

1.4.7.2 Mecanismo de purga de alelos

En poblaciones pequeñas o autoincompatibles, la carga genética nociva puede eliminarse de forma efectiva y poder interactuar con altos niveles de consanguinidad, para ello usa el mecanismo de purga de alelos asociados a la depresión endogámica, y contribuir al éxito de especies con autofecundación. La purga, puede proteger a las especies de la depresión endogámica, pero ocasionar disminución de la diversidad genética en condiciones de endogamia prolongada. Las bajas tasas de recombinación impiden la variación genética y la acumulación de alelos deletéreos recesivos que pueden volverse parte del sistema de adaptación de las poblaciones, si bien, la consanguinidad puede acelerar la pérdida del potencial evolutivo de especies autoincompatibles, en altos niveles de consanguinidad (De Kort et al., 2022).

1.4.7.3 Persistencia de las especies en escenarios de depresión endogámica

Se ha demostrado que la endogamia reduce la aptitud individual, afecta la viabilidad y afecta al potencial evolutivo de una población (Caballero et al., 2017; Kristensen et al., 2005). Pero en muchas especies endogámicas aún persisten estos eventos, e incluso pueden prosperar en diferentes entornos. Esta paradoja evolutiva, explica porque muchas especies con autopolinización tienen la capacidad de colonizar una amplia gama de entornos. *Arabidopsis thaliana*, es una especie autoincompatible y presenta niveles de endogamia en entornos naturales, no produce cigotos después de las autopolinización, puede presentar altos niveles de endogamia en entornos naturales, adicionalmente puede presentar altos niveles de endogamia en entornos naturales, pero al mismo tiempo no mostrar riesgo de

extinción, más bien exhibe potencial adaptativo, y por tanto demostrar que aunque las poblaciones sean pequeñas y genéticamente bajas, pueden seguir evolucionando y persistiendo (De Kort et al., 2022; Wright et al., 2002). La purga de alelos asociados a la depresión endogámica contribuye al éxito de especies con autopolinización y la protege de forma efectiva ante escenarios de poblaciones que sufren depresión endogámica (De Kort et al., 2022). La participación de los ET (Elementos Transponibles), promueven rápidamente variación genética mediante el aumento tasas de mutación en regiones genómicas flanqueantes aguas arriba y aguas abajo, además de aumentar hasta 10 veces la tasa de mutaciones, aunque muchas de estas mutaciones pueden ser letales, los ET generan variación genética y aseguran el éxito del acervo genético (Quesneville et al., 2020; Dubin et al., 2018).

1.5 Herramientas moleculares de la diversidad genética

En las últimas décadas se han utilizado marcadores moleculares como herramienta valiosa, reproducible y de rápida obtención. Se usan en estudios de la variabilidad genética entre individuos, en la identificación de híbridos y de variedades, en el establecimiento de relaciones filogenéticas, para análisis del mapeo genético y rastreo de rasgos cuantitativos de (rasgos loci); además, de sus aplicaciones en biología de conservación (Amom-Nongdam, 2017; Otero-Arnaiz et al., 1997). Un marcador molecular, es una secuencia diana basada en ADN que se hibrida en sitios complementarios, tiene secuencias cromosómicas conocidas y donde no codifica para proteínas, por tanto, son llamados “marcadores moleculares neutrales” y funcionan asertivamente para análisis a nivel genoma (Nadeem et al., 2018; Collard et al., 2005). Existen varios marcadores moleculares basados en PCR, resultando ser confiables, reproducibles, en relación a la secuencia diana que hibridan. Entre ellos: El Polimorfismo de Longitud de Fragmento Amplificado (AFLP), las Repeticiones de Secuencias Simples (ISSR), el Polimorfismo de un Solo Nucleótido (SNP), el Polimorfismo Amplificado Relacionado con la Secuencia (SRAP), Polimorfismo Dirigido al Codón de Inicio (SCoT) y los (IRAP) Polimorfismo Amplificación Inter-retrotransposones. Existen otros marcadores; Inter-cebadores de Sitios Unión (iPBS), los Marcadores Funcionales (FM). El uso de los marcadores y con el advenimiento de las tecnologías de Secuenciación de Próxima Generación (NGS), ofrecen excelentes oportunidades para la generación de información genómica, estructural y funcional en cultivos de importancia agronómica (Amom-Nongdam, 2017), también complementan a los estudios morfológicos utilizados para programas de mejoramiento genético (Meerow et al., 2003).

Los marcadores moleculares dominantes funcionan para la detección rápida de diferente loci en individuos, pero es imposible diferenciar a aquellos alelos homocigotos de aquellos que presentan heterocigosis. Entre estos marcadores están los basados en retrotransposones y los SCoT, que han sido ampliamente utilizados en especies de monocotiledóneas.

1.5.1 Marcadores moleculares de Polimorfismo Amplificado de Inter-Retrotransposones (IRAP).

El sistema IRAP es un sistema marcador que usa cebadores dirigidos a las secuencias LTR (Long Terminal Repeat) (Kalendar y Schulman, 2006). Las técnicas IRAP y REMAP (Polimorfismo Amplificado de Retrotransposon en Microsatélites), se han utilizado comúnmente en diferentes especies. El principio de funcionamiento de las técnicas IRAP, depende de la amplificación por PCR de regiones LTR, y la técnica REMAP, incluye un extremo de la región LTR y con microsatélites. La versatilidad de usar estos marcadores moleculares y de la obtención rápida de los productos PCR, son económicos y sin extensos datos de secuencias genómicas. Los cebadores por LTR, son secuencias grandes y son prácticos para su visualización en geles de agarosa, los tamaños de los productos de PCR pueden variar entre, 100 pb y 1000 pb para los IRAP (Kalendar y Schulman, 2006), mientras que Azhar et al., (2017), reportan la obtención de amplicones de aproximadamente 300 y 3000 pb. Arvas et al., (2022) reportan en *Oryza sativa*, la presencia de bandas de aproximadamente 3000 pb y 100 pb usando solos y en combinación los LTR.

Los marcadores IRAP y REMAP, son herramientas funcionales para la identificación de similitudes entre individuos y la diversidad genética de monocotiledóneas, como en, cebada, arroz, trigo, banano, cocotero y azafrán (Nie-Qiao et al., 2019; Kalendar & Schulman, 2006). Los IRAP son considerados un sistema marcador en monocotiledóneas desde la secuenciación del genoma de arroz en el 2005, hasta la actualidad (Arvas et al., 2022; Kalendar & Schulman, 2006).

1.5.2 Características de los marcadores moleculares IRAP

Son marcadores de tipo retrotransposon desarrollado por (Kalendar & Schulman, 2006) estas secuencias presentes entre dos retrotransposones LTR adyacentes son amplificadas por el sistema IRAP a través de la aplicación de cebadores que son complementarios a la secuencia LTR 3' final. La orientación de estas secuencias LTR puede ser (1) cola-cola, (2) cabeza-cabeza y (3) cabeza-cola. Las secuencias idénticas están presentes en diferentes cadenas que están separados por pequeñas distancias intergénicas en la disposición de cabeza a cabeza y se transcriben fuera de cada otro. Sin embargo, en aquellos con orientación de cola a cola la disposición es opuesta a la de uno frente a otro y se transcriben entre sí ambos en dirección 5' y 3', los cebadores se utilizan para LTR son de cabeza a

cola, mientras que un solo cebador se usa para aquellos con cabeza a cabeza o cola con cola. Durante la resolución de los marcadores IRAP se utilizan geles de agarosa, que permiten la amplificación de tamaños de banda de 300pb y 3000 pb (Azhar et al., 2017).

1.5.3 Elementos Transponibles (ET)

Un elemento transponible (ET) es una unidad genómica capaz de moverse dentro del genoma de prácticamente todos los organismos generando plasticidad genómica, induciendo mutaciones cromosómicas y la diversidad alélica. Se ha demostrado que desempeñan un papel clave en la expresión y regulación de genética, así como en la adaptación y en la evolución (Orozco-Arias et al., 2019; Keidar et al. ,2018). El genoma de organismos eucariotas se compone de Elementos Transponibles (ET), el descubrimiento de elementos transponibles fue realizado en la década de 1940 por Barbara McClintock en el maíz. Se ha descubierto que los ET están presentes de forma ubicua en eucariotas (Lee et al., 2017; Wicker et al., 2017).

1.5.4 Constituyentes de los retrotransposones

Pueden estar separados por uno o más codones de terminación. Los genes Gag son generalmente los dominios de retrotransposon LTR más variables, son responsables del empaquetamiento de ARN y proteínas de retrotransposon. El gen de la poliproteína codifica algunos dominios enzimáticos como la proteinasa aspártica (AP), la transcriptasa inversa (RT), la ARNasa H y la integrasa (INT). Cada dominio tiene un papel específico en el ciclo de replicación (Figura 5). En algunos casos, tienen otra región aguas arriba de la LTR 3’2 llamada cromodominio que puede ser responsable de la integración dirigida y para escapar del silenciamiento mediante el direccionamiento específico de regiones heterocromáticas (Orozco-Arias et al., 2019; Zhao et al., 2016; Ustyantsev et al., 2015).Los LTR-RT también contienen un sitio de unión del cebador (iPBS) y un tracto de poli-purina (PPT), ambos sitios pueden funcionar como cebadores, donde el primero es el sitio de cebado de la cadena (-) para la transcripción inversa y el segundo es el sitio de cebado de la cadena (+) durante la transcripción inversa. Además, la nueva inserción de retrotransposones (LTR) crea una breve duplicación denominada duplicación del sitio objetivo (TSD) de 4-6 pb en los extremos del retroelemento. La Figura 5, demuestra la estructura del retrotransposon y la disposición de los elementos, las flechas naranjas son LTR o llamadas Regiones Terminales Largas (Orozco-Arias et al., 2019).

Figura 5. Estructura del retrotransposon LTR. Incluye al gen env, que en ocasiones está ausente en algunos retroelementos. Las flechas naranjas corresponden a (LTR).

1.5.4. 1 Retroelementos en el genoma de plantas

En plantas se ha postulado que la amplificación de los retrotransposones o retroelementos tienen un mecanismo que permite el aumento del tamaño del genoma. Por ejemplo, en cebada se ha estudiado a detalle la secuencia contigua en el locus Rar1 del contig 66 kb, que ha permitido saber la expansión de su genoma. En la Figura 6, se muestra el contig de 66 kb, donde se identificaron tres genes que se agrupan dentro del intervalo de 18 kb, esta sección del genoma se disponen 4 secuencias que flanquean a 4 retroelementos y varias unidades del elemento BARE-1, los retroelementos son denominados NIKITA, SUKKULA, SABRINA y BAGY-2, y son responsables de al menos 15 eventos de integración, y como múltiples inserciones anidadas. Las características de cada retrotransposon se encuentran descritas en el Cuadro 1. En el genoma de cebada los retroelementos están como LTR individuales (Long Terminal Repeats) e indican un cruzamiento desigual o la recombinación intracromosómica entre los LTR, esta es una característica común en el genoma de la cebada (*Hordeum vulgare*) (Shirasu et al., 2000).

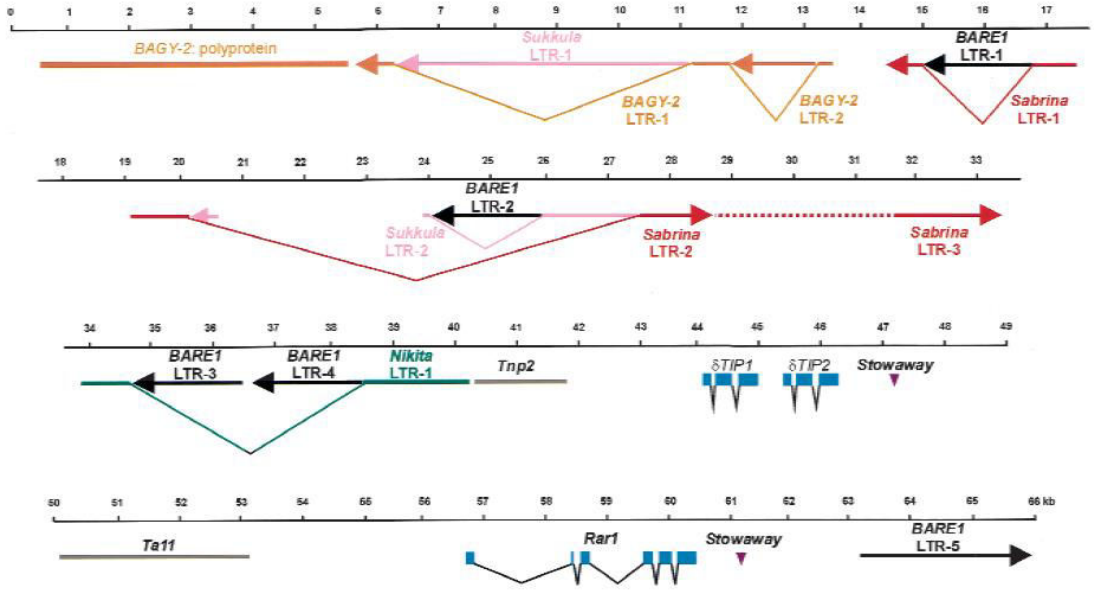
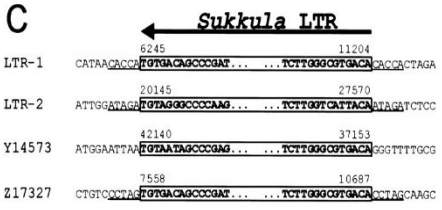
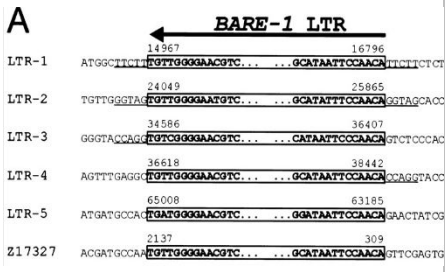
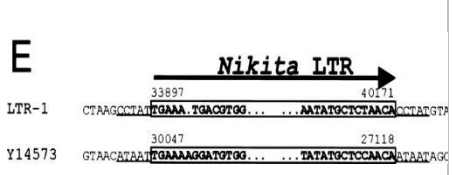


Figura 6. Secuencias de los retrotransposones en cebada en el locus Rar 1**.** Las líneas negras indican la dirección de los LTR (Shirasu et al., 2000).

Cuadro 1. Retrotransposones del contig 66 kb en el locus Rar-1 de *Hordeum vulgare*.

RTL	Características	Secuencia	Referencia
SUKKULA	• Pronunciado (Sook-koo-la), que significa "lanzadera" en finlandés • Similares a los LTR (RIRE) descritos en arroz. • Esta inserción está flanqueada por una repetición directa de 5 kb CCTAG siendo un sitio de integración en retroelementos. • Está flanqueada por repeticiones directas de 5 pb, en este caso CACCA, • Codifican para poliproteínas similares a gitanas adyacentes a las secuencias LTR • Las secuencias de SUKKULA en el contig representan LTR, de un nuevo retrotransposon de cebada que se generó por recombinación entre dos LTR del elemento original		Shirasu et al., 2000) (Kemekawa et al., 1999)
Elementos BARE-1	• Los LTR de 1.8 kb, en cada extremo. • Tienen un dominio interno que codifica para una poliproteína. • contienen los elementos para la transcripción y el procesamiento del MRNA • La organización de BARE-1 y retrotransposon es: 5' LTR - UTL - GAG - AP - IN - RT-RH - UTR tienen una (Región no traducible) la 3LTR, donde UTL sin traducir de 5', GAG.		Shirasu et al., 2000)

	• Codifica la proteína cápside de la partícula similar al virus, • AP codifica una proteinasa aspártica, IN codifica la integrasa, RT-RH codifica tanto la transcriptasa inversa como la RNase H, y UTR es la región sin traducir de 3’		
NIKITA	• Son repeticiones directas de 5 pb en los sitios de inserción (CCTAT y ATAAT) que flaquean a los LTR. • Se localizan entre las posiciones nt 33.897 y 40.171 • el locus Rar1 es interrumpido por dos BARE-1 LTR (LTR-3 y LTR-4) • Es contiguo en el locus Mlo de cebada		Shirasu et al., 2000)

*Las flechas indican la dirección del sentido de cada elemento.
*Las repeticiones directas están subrayadas.
*Tomado de Shirasu et al., 2000).

1.6 Polimorfismo dirigido al Codón de Inicio de la Traducción (SCoT)

El sistema marcador está basado en cebadores de aproximadamente 18 meros, que flanquean el codón de inicio de la traducción (ATG) y, en genomas de plantas tienen una temperatura de alineamiento de 50°C (Collard y Mackill, 2009). Para la amplificación por PCR, el cebador es único y se usa como cebador directo y como cebador reverso. En los marcadores moleculares SCoT, la temperatura de alineamiento y la longitud son factores importantes que determinan su reproducibilidad (Gorji et al., 2011). En la Figura 7, se describe la disposición del cebador para generar un (polimorfismo), mostrando la presencia de una banda, como único cebador directo, para la presencia de la banda este cebador flaquea a las regiones genéticas del codón de inicio de la de la traducción (ATG).

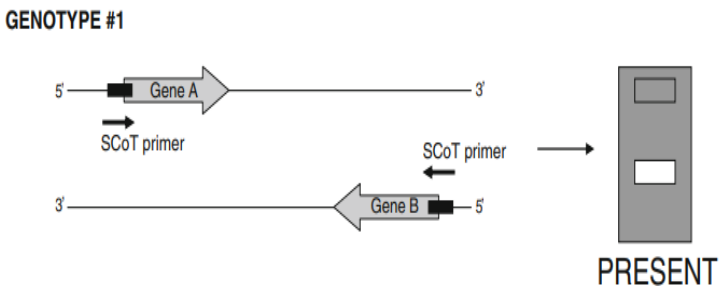


Figura 7. Disposición del cebador SCoT. En la dirección 5' funciona como cebador único en ambas direcciones mostrando polimorfismo. En la secuencia consenso que flanquea la región del codón de inicio de la traducción (Tomado de Collard y Mackill, 2009).

En el genotipo 1, cuando el cebador es único y directo se encuentra hibridado a la secuencia diana (gen A) y como anverso (gen B), se observa un polimorfismo (banda presente), pero cuando en el genotipo 2, se flanquea al (gen A) sin (gen B), demuestra ausencia de bandas indicando que no existe polimorfismo (Figura 8).

El codón de inicio codifica para el aminoácido metionina durante la traducción, la mayoría de los polipéptidos comienzan con este aminoácido. Esta región se encuentra altamente conservada en el genoma de plantas y permite utilizarlo como un marcador dominante con una variación de 2, 3 y 4 pb (Collard y Mackill, 2009).

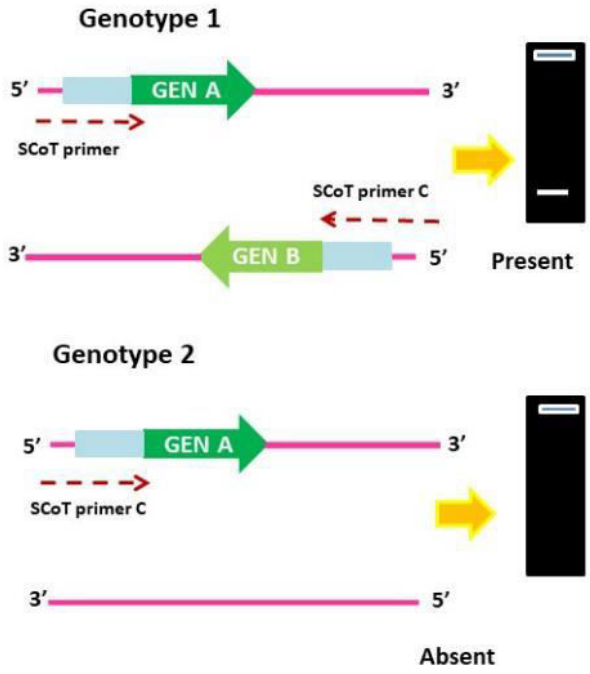


Figura 8. Diagrama de la técnica basado en los marcadores únicos SCoT (Modificado de Collard y Mackill, 2009).

1.6.2 Características de marcadores SCoT

Para la separación de fragmentos y bandas a partir de los marcadores SCoT, se detectan mediante pruebas de PCR, su principal se característica es su simplicidad para presentar alto grado de polimorfismo, son de bajo costo, algunos están dirigidos a genes, son reproducibles al ser marcadores dominantes. El polimorfismo se correlaciona con algunos genes funcionales (Amom-Nogdam, 2017; Collard y Mackill, 2009). Los marcadores SCoT se diseñan a partir de la región conservada que codifica al codón de inicio de la traducción en plantas sin necesidad de secuencia genómica, lo novedoso de estos marcadores es su diseño a partir de regiones vinculadas a genes funcionales de la transcripción y a regiones que están vinculadas a un gen funcional (Saboori et al., 2019; Collard y Mackill 2009). Son 36 marcadores diseñados en cebada con una % GC ideales para cebadores de entre 50 y 72 % (Cuadro 2).

SCoT primer	Sequence (5'-3')	%GC
1	CAACAATGGCTACCACCA	50
2	CAACAATGGCTACCACCC	56
3	CAACAATGGCTACCACCG	56
4	CAACAATGGCTACCACCT	50
5	CAACAATGGCTACCACGA	50
6	CAACAATGGCTACCACGC	56
7	CAACAATGGCTACCACGG	56
8	CAACAATGGCTACCACGT	50
9	CAACAATGGCTACCAGCA	50
10	CAACAATGGCTACCAGCC	56
11	AAGCAATGGCTACCACCA	50
12	ACGACATGGCGACCAACG	61
13	ACGACATGGCGACCATCG	61
14	ACGACATGGCGACCACGC	67
15	ACGACATGGCGACCGCGA	67
16	ACCATGGCTACCACCGAC	56
17	ACCATGGCTACCACCGAG	61
18	ACCATGGCTACCACCGCC	67
19	ACCATGGCTACCACCGGC	67
20	ACCATGGCTACCACCGCG	67
21	ACGACATGGCGACCCACA	61
22	AACCATGGCTACCACCAC	56
23	CACCATGGCTACCACCAG	61
24	CACCATGGCTACCACCAT	56
25	ACCATGGCTACCACCGGG	67
26	ACCATGGCTACCACCGTC	61
27	ACCATGGCTACCACCGTG	61
28	CCATGGCTACCACCGCCA	67
29	CCATGGCTACCACCGGCC	72
30	CCATGGCTACCACCGGCG	72
31	CCATGGCTACCACCGCCT	67
32	CCATGGCTACCACCGCAC	67
33	CCATGGCTACCACCGCAG	67
34	ACCATGGCTACCACCGCA	61
35	CATGGCTACCACCGGCCC	72
36	GCAACAATGGCTACCACC	56

Cuadro2. Lista de marcadores SCoT diseñados, del codón de inicio ATG. (Tomado de Collard y Mackill 2009).

1.6.3 Aplicaciones de los SCoT

El uso de marcadores basados en SCoT han permitido la evaluación molecular para selección de genotipos en cebada (cultivar comercial, líneas mejoradas y seleccionadas), también para la tolerancia a salinidad. Además, la comparación entre las técnicas Triple-SCoT (marcador SCoT basado en tres cebadores como nueva estrategia para evaluación de la diversidad y estudios de tolerancia de salinidad (Aboulila y Mansour, 2017). Estos marcadores dirigidos son reproducibles para genética molecular y aplicable para numerosos estudios, para mapeo de QTL, esto se debe a que los niveles de recombinación entre el marcador y el gen/QTL son menores, comparándolos con aquellos marcadores aleatorios como los marcadores RAPD, ISSR o SSR (Collard y Mackill, 2009).

RESUMEN DEL CAPÍTULO I

En el subtema 1.1 describimos a *Carludovica palmata*, una especie que se encuentra dentro de los 12 géneros de la familia Cyclanthaceae, su gran importancia se debe al uso de las hojas inmaduras (denominadas cogollos), herramienta utilizada por los artesanos para el trenzado del sombrero de Panamá, en los municipios de región norte de Campeche. La sección 1.1.2, destaca a los dos sistemas de propagación en *C*. *palmata*, por rizomas la más utilizada para la propagación de nuevos individuos (clonas) y la propagación por semillas que implica la fusión de gametos, un sistema poco utilizado en la especie, debido a que los agricultores de la región no la germinan porque implica mayor tiempo para el cultivo para la obtención de las hojas inmaduras. En la sección 1.2.1 destacamos la importancia de *C*. *palmata* en la península de Yucatán por sus fibras suaves y que representa un sistema importante para la elaboración de diferentes artesanías, así como su comercialización. En la sección 1.3, describimos la distribución geográfica de *C*. *palmata* indicando sus orígenes en países de América del sur como; Panamá, Colombia, Perú, Bolivia, Ecuador y Venezuela. En México la introducción de la especie fue en 1866 en la región norte de Campeche, en comunidades como Tancuché, Nunkiní, Bécal, Calkiní, Santa Cruz y en la región suroeste de Yucatán. Dada la importancia de la especie y que se propague vegetativamente, surgen los estudios de la diversidad genética en la región, por tanto, en la sección 1.4.1 recapitula los estudios de la variación genética y su importancia. En el 1.4.2 se describen los factores que involucran una reducción de la diversidad genética, los cuellos de botella, entre ellos, el efecto fundador, la domesticación, el sistema de propagación vegetativa y la cruza entre parentales de la misma especie, que en eventos prolongados pueden causar endogamia. Para contrarrestar estos inconvenientes, en la sección 1.5, se propone el uso de herramientas moleculares para determinación de diferentes loci polimórfico que determinan la diversidad genética mediante dos marcadores moleculares, el Polimorfismo de Amplificación Inter-retrotransposones, en la sección 1.6 describe a los marcadores moleculares, el Polimorfismo Dirigido al Codón de Inicio (SCoT), la versatilidad de ambos marcadores dominantes se debe a la rápida detección, facilidad de la técnica e informativos para la determinación del polimorfismo.

JUSTIFICACIÓN

En el género *Carludovica*, no se han realizado estudios de la variabilidad genética. Por ello, en el presente trabajo se implementarán estrategias para evaluar la diversidad genética de *Carludovica palmata* en dos sistemas de propagación, i) plantas a partir de rizoma y ii) plantas a partir de semillas y se confirmarán con los marcadores moleculares IRAP y SCoT, para la identificación de diferentes loci polimórficos. Tal análisis permitirá determinar la variabilidad genética de la especie en la región norte del estado de Campeche y de aquellos factores que están involucrados en la diversidad genética intraespecífica como, “cuellos de botellas”, entre ellos; el manejo agronómico, el sistema de propagación, el efecto fundador, y niveles de parentesco entre los individuos.

HIPÓTESIS

La especie de *C. palmata* en la región norte de Campeche, tiene una base genética estrecha. Por lo tanto, en poblaciones de plantas de propagación por rizomas los genotipos han sido preseleccionados y sus genes se han mantenido sin muchos cambios desde hace años, mientras que en las poblaciones de plantas de propagación a partir de semillas la diversidad genética será reducida por proceder de una base genética limitada.

OBJETIVO GENERAL

Analizar la diversidad genética de *Carludovica palmata* en el norte de Campeche, mediante marcadores moleculares.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer la diversidad genética en plantas de *C. palmata* en dos sistemas de propagación i) plantas a partir de semillas germinadas *in vitro* y ii) plantas a partir de rizoma mediante el empleo de marcadores moleculares (los IRAP y SCoT).
- Seleccionar al mejor marcador polimórfico y reproducible en los dos sistemas de propagación.
- Estimar la diversidad genética utilizando estimadores de diversidad (Nei, índice de Shannon-Weiner).
- Determinar niveles de parentesco con el coeficiente de endogamia (FIS).

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

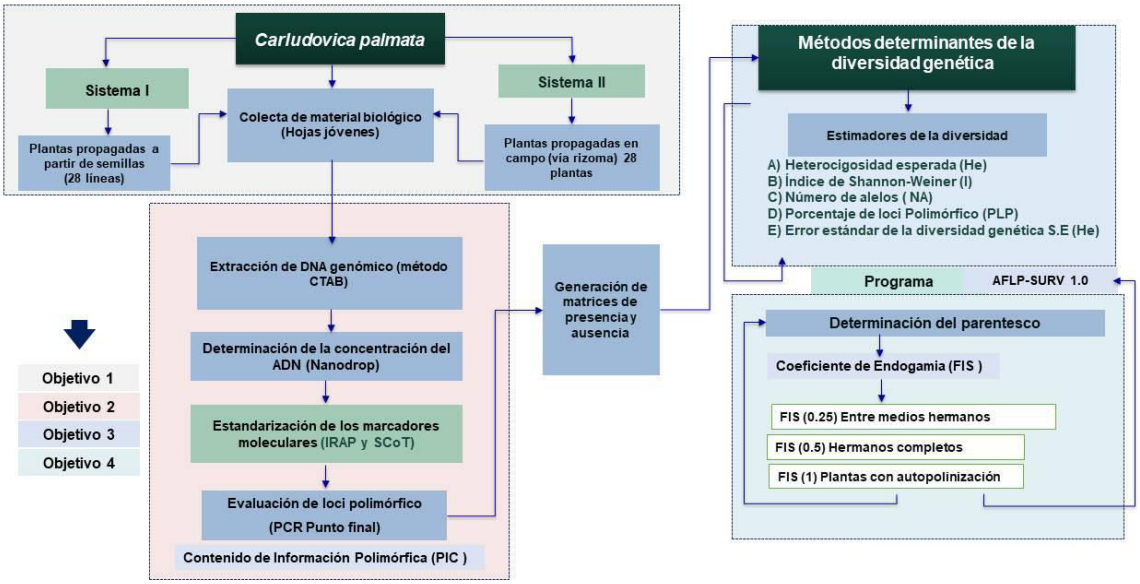


Figura 9. Esquema de estrategia experimental.

DESCRIPCIÓN DE LA ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

- **Objetivo 1**

La estrategia experimental inició con la especie de estudio *C*. *palmat*a, seguido los dos sistemas de propagación, el sistema I (incluyó a las 28 líneas de plantas a partir de semillas) y el sistema II (fueron 28 plantas adultas propagadas a partir de rizomas), estas plantas se muestrearon en la región norte de Campeche, Santa Cruz ex-hacienda.

- **Objetivo 2**

El material biológico consistió en colectar fracciones de hojas jóvenes, en plantas adultas para ambos sistemas, posteriormente se realizó la extracción del ADN siguiendo el protocolo CTAB modificado (bromuro de cetiltrimetilamonio) Kumar & Agrawal (2019) y una modificación del protocolo para cocotero descrito por (Edwards et al., 1991), protocolo descrito en el (Anexo: 1). Las muestras de ADN fueron cuantificadas por un espectrofotómetro (Nanodrop), a una longitud de onda de 260 nanómetros (se detalla en la sección 2.3 de materiales y métodos), seguidamente se estandarizaron los marcadores moleculares IRAP y SCoT, descritos a detalle en la sección 2.4, 2.5 y 2.6 de materiales y métodos. Después de la estandarización de los marcadores moleculares, se procedió a realizar las pruebas por PCR punto final (detallado en la sección 2.5 y 2.6), para cada marcador molecular fueron condiciones de PCR diferentes. Seguidamente en los resultados, se determinaron el tamaño banda y conteo de los diferentes loci polimórficos generados, se corrieron por productos de PCR en geles de agarosa y se revelaron en un transiluminador. Luego se realizó el contenido de información polimórfica (PIC) que evalúa la eficiencia del marcador molecular en relación de la determinación del polimorfismo, en la sección (2.6.1 y 2.6.2) se describe a detalle.

- **Objetivo 3 y Objetivo 4**

En el apartado métodos determinantes de la diversidad genética (objetivo 3) se describieron los diferentes estimadores (NA, He, I, NEI, PLP). Primeramente, se generaron las matrices de presencia y ausencia de los diferentes loci polimórficos y se corrieron en el programa AFLP-SURV 1.0, este programa, infiere la heterocigosidad esperada, la desviación

estándar, PLP y el error estándar de la diversidad genética S.E (He). Por último, en el (objetivo 4) se infirieron apareamientos entre parientes cercanos de *C*. *palmat*a, que utiliza el coeficiente de endogamia (FIS) y que dentro del mismo programa AFLP-SURV 1.0, se pueden hacer las corridas especificando (FIS = 0.25, cruce entre medios hermanos), (FIS = 0.5, cruce entre padres, que resultó ser hermanos completos) y (FIS = 1, que demuestra individuos que se autopolinizan) todos con 1000 Bootstrap.

RESUMEN DEL CAPÍTULO II

En este apartado se describe a los materiales y métodos para el desarrollo del trabajo de investigación, en la sección 2.1, se muestran los sitios de colecta en la región norte de Campeche. En la sección 2.2.1 y 2.2, se encuentran los sitios del cultivo de plantas propagadas a partir de rizomas, un panorama de todos los cultivos muestreados y sus características de cultivo, en el subtema 2.2.3, se describen a las líneas de plantas propagadas partir de semillas con sus características del cultivo, en el subtema 2.3 se describe el protocolo para la extracción del ADN genómico, para la sección 2.4 se propone la estandarización de los marcadores de Polimorfismo Amplificado Inter-Retrotransposones (IRAP). Y en la sección 2.5, la estandarización de los marcadores del Polimorfismo dirigido al Codón de Inicio de la Traducción (SCoT), en la sección 2.6 describe los estudios de la diversidad genética, y del criterio para el conteo de bandas para la determinación del polimorfismo, así como de los parámetros que determinan la diversidad genética (PIC, NEI y el Índice de Shannon Wiener).

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Sitio de estudio

El cultivo de *C. palmata*, se presenta en varias localidades del norte del estado de Campeche, los sitios de estudio se ubican en el interior de la Ex Hacienda Santa Cruz y en los huertos familiares de sus alrededores, se muestrearon nueve plantaciones y se georreferenciaron (Figura 10; Cuadro 3).

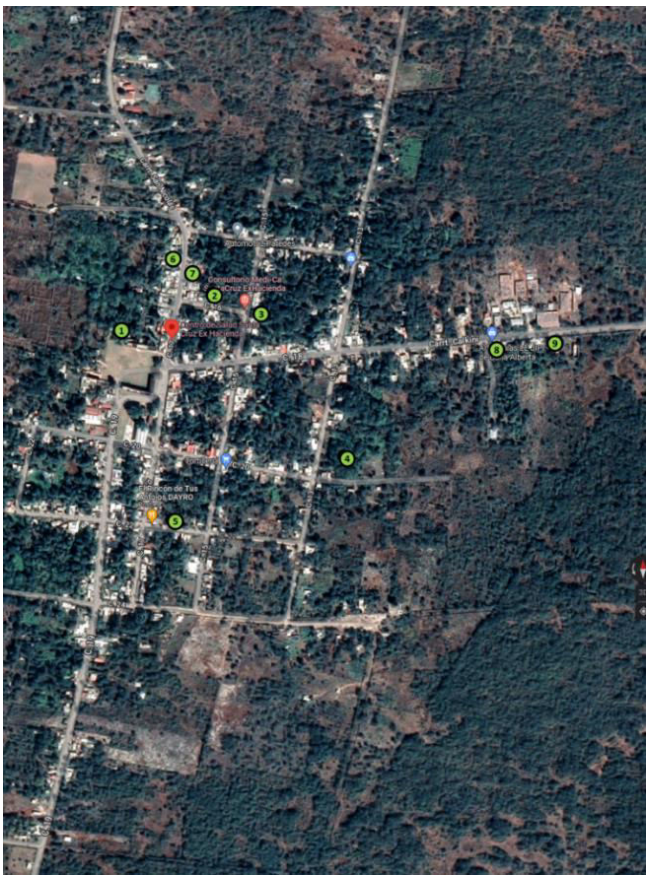


Figura 10. Imagen satelital de los nueve sitios de muestreo de *C. palmata* en plantas por rizoma, en la región norte de Campeche, México.

2.2. MATERIAL BIOLÓGICO

2.2.1 Plantas propagadas por rizoma de *C. palmata*

Se muestrearon un total de 34 plantas propagadas por rizoma, entre tres y ocho plantas por sitio de estudio (Cuadro 3) (Figura 11). Los cultivos más alejados del casco de la hacienda corresponden plantíos jóvenes de entre 20-50 años y los cultivos más longevos fueron el sitio uno (dentro del casco de la hacienda) con aproximadamente 150 años, y el sitio cinco con aproximadamente 80 años de cultivo. El manejo del cultivo varió, con aplicaciones de riego, empleo de agroquímicos y sistema de compostaje en alguno de los sitios. Para los análisis posteriores se seleccionaron tres muestras representativas por sitio de muestreo.

Cuadro 3. Características de plantas de *C. palmata* partir de rizoma en Campeche, México.

Sitio de muestreo	Clave de muestra	Características del cultivo	Morfología: PE	Total, de plantas	Georreferenciación
1	H1	Años aproximados del cultivo: 150	PEP	8	20º 23, 53” N 90 12, 26.8” W
	H2	Enfermedades por plaga: no	PE		
	H3		PE - FS		
	H4	Sistema de riego: si	PE		
	H5	Suministro de nutrición: compostaje con hojas secas.	PE		
	H6		PE		
	H7		PE		
	H8		PE-FS, plantas altas.		
2	B1	Datos no proporcionados.	PEP	3	20º 23, 54.6” N 90 14, 22.7” W
	B2		PEP		
	B3		PEP		
3	C1	Años aproximados del cultivo: 30	PE - FS	4	20º 23, 4.6” N 90 14 22.7” W
	C2	Enfermedades por plaga: no	PE-FD- planta enana		
	C3		PE - FS		
		Sistema de riego: si	PE - FS		
4	C4	Suministro de nutrición: ninguno	PE - FS		
	D1	Años aproximados del cultivo:	PE - FS	3	
	D2		PE - FS		
	D3	Enfermedades por plaga:	PE - FS		
		Sistema de riego: si Suministro de nutrición: ninguno			
5	EI	Años aproximados del cultivo: 80	PE -FD	4	
	E2	Enfermedades por plaga: no	PE - FS		20, 24’ 0.1.8 “N 90º 14, 25. 8 “W.
	E3		PE - FS		
	E4	Sistema de riego: si Suministro de nutrición: ninguno Hace 32 años el cultivo se murió por la humedad del huracán Gilberto, pero	PE - FS		

		volvieron a salir plantas del rizoma principal.			
6	F	Años aproximados del cultivo: 27 Enfermedades por plaga: ninguno Sistema de riego: si Suministro de nutrición: ninguno.	PE - FS	3	20, 24' 0.1.8 "N 90º 14, 25. 8 "W.
	G	Años aproximados del cultivo: 15 años Enfermedades por plaga: ninguno Sistema de riego: si Suministro de nutrición: ninguno	PE - FS	3	20, 24' 0.0.5 "N 90º 14, 24.8 "W
8	I	Años aproximados del cultivo: 30 años Enfermedades por plaga: ninguno Sistema de riego: si Suministro de nutrición: compostaje	PE - FS	3	20, 32' 52.1 "N 90º 14, 12.7 "W
9	J	Años aproximados del cultivo: 20 años Enfermedades por plaga: ninguno Sistema de riego: si Suministro de nutrición: compostaje	PE – FS	3	20, 23'53.2 "N 90º 14, 05. 1"W
		Total, de individuos	34 plantas		

*Presencia de estípulas (**PE**): Crecimiento de una estructura de apariencia cuneiforme en la base de la hoja. (**PEP**), Presencia de estípulas pequeñas. **FS:** Fibra suave, **FD:** Fibra dura. Simbología: de la A- I: Representan a los nueve sitios de muestreo

2.2.2 Sitios del cultivo de plantas propagadas a partir de rizomas

Se muestrearon primeramente 8 plantas en el interior del casco de Ex hacienda Santa Cruz, primeramente, en la entrada (3 plantas), parte central (3) plantas y al final del casco de la Ex hacienda (2 plantas). Las características, fueron secciones de hojas jóvenes que se humedecieron con agua destilada estéril, se envolvieron en papel sanita, posteriormente se metieron en una bolsa, se etiquetaron y se resguardaron en una nevera con hielo.

Figura 11. Plantaciones en policultivo de *C. palmata* vía rizoma. Son nueve sitios muestreados en la región norte de Campeche. Los recuadros indican el número de sitio de muestreo.

2.2.3 Plantas propagadas a partir de semillas

Las plantas de *C*. *palmata* incluidas en el trabajo son adultas, aproximadamente de cuatro años de edad y fueron obtenidas a partir de semillas germinadas en condiciones *in vitro* y adaptadas a casa sombra con riego constante y fertilización cada tres meses con macro y micronutrientes (Poly-feed® 1g/L). La Figura 12 representa a las líneas de plantas obtenidas a partir de semillas y el Cuadro 4, describe un total de 127 líneas con sus respectivas replicas. Para este trabajo se incluyeron 56 plantas de diferentes líneas.

Cuadro 4. Registro de líneas a partir de semillas

Numeración	Línea de plantas	Líneas hermanas	N.º de plantas
1	10.7	10.4	2
2	11.3	11.4	2
3	12.3	12.7	2
4	13.8	13.6-13.4	3
5	14.7	-	1
6	15.5	15.7	2
7	16.3	-	1
8	17.7	17.4	2
9	18.7	18.3- 18.10	3
10	19.8	19.7	2
11	21.5	21.3	2
12	20.6	20.7	2
13	22.7	22.5	2
14	23.5	23.4-23.7	3
15	24.7	24.8	2
16	25.11	25.10	2
17	26.3	26.7	2
18	27.7	27.8	2
19	28.4	-	1
20	29.7	29.5	2
21	30.6	30.7	2
22	41.7	41.8	2
23	42.6	-	1
24	43.6	43.2-43.3	3
25	44.9	44.4	2
26	45.8	45.6-45.7	3
27	46.4	-	1
28	47.6	47.5	2
	Total, de líneas		**56**

*** Nomenclatura**: **L**: línea; **S**: semilla, la numeración indica por ejemplo **LS10.5 =línea 10.5**.

Los recuadros con (-), indican líneas únicas. Las líneas hermanas son plantas a partir de la planta original, por ejemplo, de la línea = **18.7**, sus líneas hermanas son **18.3** y **18.10**.

Figura 12. Plantas propagadas partir de semillas de *C. palmata*(A), B) líneas cultivadas en casa sombra, C) línea evaluada, nomenclatura (S12.3).

2.3 Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico total se realizó por el método de CTAB modificado (bromuro de cetiltrimetilamonio) Kumar & Agrawal (2019), modificado del protocolo para cocotero (Edwards et al., 1991) (Protocolo Anexo: 1) que utiliza un análogo del beta-mercaptoetanol, el mono-tyacilgicerol y 5 gr de tejido de hoja joven. La calidad del ADN, se verificó en geles de agarosa al 1%, con EtBr 2 µL, con un tiempo de corrida de 30 min a 90V. El gel se visualizó en un transiluminador, marca ChemiDoc ™ MP Imaging System - BIO-RAD. La calidad y la concentración del ADN, se determinaron con equipo nanodrop 2000 marca THERMO SCIENTIFIC ®.

2.4 Marcadores de Polimorfismo Amplificado Inter-Retrotransposones (IRAP).

Una vez obtenidas las muestras de ADN, se procedió a estandarizar los marcadores moleculares, estos fragmentos permitieron el análisis mediante pruebas de PCR, para ello se usaron siete marcadores basados en retrotransposones los LTR, como lo describe el **Cuadro 5**, que enlista a los LTR con relación a la secuencia y la orientación.

Cuadro 5. Marcadores LTR, secuencia y orientación.

Retrotransposon	Tm	Secuencia	Orientación del retrotransposon
NIKITA	58	CGCATTTGTTCAAGCCTAAACC	NIKITA →
SUKKULA	66	GATAGGGTCGCATCTTGGGCGTGAC	SUKKULA →
5´LTR1	63	TTGCCTCAGGGATATTTCCAACA	BARE-1 ←
5´LTR2	58	ATCATTGCCTCTAGGGGCATAATTC	BARE-1 ←
3´LTR	69	TGTTTCCCATGCGACGTTCCCCAACA	BARE-1 →
LTR 6149	61	CTCGCTCGCCCATACATCAACCGCGTTTATT	BARE-1 →
LTR 6150	62	CTGGTTCGGCCCATGTCTATGTATCCACACATGTA	BARE-1 ←

**Referencia Teo-How *et al*., 2005. Journal Plant Biology.

2.5. Estandarización de los marcadores moleculares IRAP

Se estandarizaron las condiciones de los marcadores IRAP (NIKITA, SUKKULA y la 3'LTR) que generaron diferente loci polimórfico en *Carluvodica palmata*. Las condiciones de reacción se describen en el siguiente Cuadro 6, basándose en el protocolo descrito por (Lapina et al., 2012), que utilizó agua libre de nucleasas 17.7 µL, buffer con Mg 10X, 2.5 µL marca (Dream Taq Buffer INVITROGEN®), DNTP MIX (INVITROGEN®) 2.5 µL, el cebador en este caso NIKITA 2.5 µL, el templado de ADN a una concentración (50 ng) 2 µL, y, por último, se le adicionó el ADN polimerasa INVITROGEN® 0.3 µL, a una concentración final de 25 µL.

Cuadro. 6. Relación de la reacción de PCR (IRAP).

Reacción de PCR	1 reacción
Agua libre de nucleasas	17.7
10X Dream Taq Buffer	2.5 µL
dNTP Mix, 10 Mm (INVITROGEN)	0.5 µL
Cebador	2.5 µL
Templado de DNA (50 ng)	2 µL
Dream Taq DNA Polymerase	0.3 µL
volumen final	25 µL

Una vez terminada la reacción de PCR, se colocan en un programa de amplificaciones para los IRAP. Las condiciones son las siguientes: desnaturalización: 5 minutos a 94°C, seguido de 60 segundos a 94°C, 60 segundos a 42 °C, 60 segundos a 72°C y una extensión final de 72°C por 10 minutos, en 40 ciclos. Cuadro 4. Terminadas las reacciones de PCR, se verificaron en geles de agarosa al 1.5 % con EtBr. 1 µL, más buffer de carga 6x y 5 µL de muestra, posteriormente se desarrolló a 75 V, durante 90 min, se usó una escalera como referencia de 1kb de INVITROGEN®. Finalmente, el gel de agarosa fue revelado en el transiluminador para la verificación de bandas monomórficas y polimórficas.

2.6. Estandarización de los marcadores moleculares SCoT

Se utilizaron 36 marcadores moleculares SCoT (Polimorfismo dirigido al codón de Inicio de la traducción=SCoT). La estandarización por PCR, para un volumen final de 25 µL, contiene siguiente: agua libre de nucleasas, buffer de reacción 10X ($MgCl_2$, 3Mn), 2 µL ADN genómico (50ng), un único cebador (0.4 mM), dNTPs (10 mM) y la Taq polimerasa 0.3 µL (Cuadro 7).

Cuadro 7. Relación de la reacción de PCR (SCoT).

Reacción de PCR	1 reacción
Agua libre de nucleasas	17.7
10X Dream Taq Buffer	2.5 µL
dNTP Mix, 10 Mm (INVITROGEN)	0.5 µL
cebador SCoT	0.5 µL
Templado de ADN (50 ng)	2 µL
Dream Taq DNA Polymerase	0.3 µL

Volumen final	25 µL

Una vez terminada la reacción se colocaron en un programa de amplificaciones para los SCoT. Desnaturalización: 3 minutos a 94°C, seguido de 30 segundos a 94°C, 1 minuto segundos a 50°C, 2 minutos a 72°C y una extensión final de 72°C por 10 minutos, en 36 ciclos. Finalmente, terminadas las reacciones de PCR, se verificaron en geles de agarosa al 1.5 % con EtBr. 1 µL, más buffer de carga 6x y 10 µL de muestra. Posteriormente se desarrolla a 75 V, durante 60 min, se coloca una escalera de 1kb (3 µL), finalmente el gel de agarosa fue revelado en el transiluminador para la verificación de bandas polimórficas.

2.6.1 Análisis de la diversidad genética

Se registró de manera visual la presencia (1) y ausencia (0) de bandas claras, se consideró que cada banda de diferente peso molecular era un locus. Para cada marcador molecular IRAP (NIKITA, 3'LTR y SUKKULA) se construyó una matriz de presencia-ausencia y otra matriz para los marcadores SCoT (SCoT-3, SCoT-5 y SCoT-18).

2.6.2 Estimadores de la diversidad genética

El contenido de la información polimórfica (PIC) (Botstein, 1980) Polymorphism Information Content (PIC) indica el poder discriminatorio de un marcador molecular, en relación con otros marcadores y la eficiencia para la determinación de loci polimórficos (Zhang et al., 2021; Serrote et al., 2020) como lo muestra la siguiente formula.

- PIC= $1 - \sum_{Pi^2} - \sum(2.pi^2.pj^{\,2})$
- Donde Pi es la frecuencia del i-ésimo alelo.
- Criterios:
- $\mathrm{PIC} > 0.5$, es altamente informativo o se refiere a locus que son altamente polimórficos.
- $\mathrm{PIC} > 0.25$ razonablemente informativo
- $\mathrm{PIC} < 0.25$ poco informativo (Zhang et al., 2021)

La diversidad genética se determinó con el índice de Shannon, este índice se utiliza con frecuencia para medir la diversidad genética (Sun & Ren, 2021)

La determinación de los estimadores de la diversidad genética, el porcentaje de loci polimórfico (PLP) y la heterocigosidad esperada (He), se estimaron con el programa AFLP-SURV 1.0 (Vekemans V., 2002). En este programa, las frecuencias alélicas para cada

matriz se obtuvieron empleando un método Bayesiano con un priori de frecuencias no uniformes, asumiendo los valores para apareamientos endogámicos, FIS = 0.25 indicaría parentesco entre medios hermanos, parentesco entre hermanas completas FIS = 0.5 y FIS = 1 demostraría autopolinización con un total de 1000 Bootstrap.

En la región norte de Campeche el cultivo de *C. palmata* estaría enfrentando diversos escenarios de apareamiento entre parientes cercanos, que generaría posibles eventos de endogamia. Esto es debido a la propagación exclusiva por rizoma (hijuelos), ya que los agricultores de la región, eliminan las inflorescencias e infrutescencias inmaduras. Esta práctica, está basada en la observación empírica, donde los agricultores lo atribuyen al decaimiento prematuro de la planta si permiten la maduración de las estructuras reproductivas, para inferir estos escenarios tomaremos FIS = 0.25, FIS = 0.5, y FIS = 1, para determinar apareamientos dentro de la especie.

RESUMEN DEL CAPÍTULO III

En el capítulo III, en el subtema, 3.1.2, se corroboraron y evaluaron perfiles utilizando dos sistemas de marcador de tipo dominante, para los dos sitios de propagación se evaluaron diferentes loci de entre 550 pb y 3000 pb. En el subtema 3.2, se demostró el poder discriminatorio de los diferentes marcadores moleculares (IRAP y SCoT), con la generación del contenido de información polimórfica (PIC), y el índice de Shannon Wiener que determina la diversidad alélica, el subtema 3.3.1 y 3.3.2, se demostró la estimación de la diversidad genética de NEI, con los marcadores moleculares IRAP y los SCoT, demostrando que estos marcadores resultan ser funcionales para estudios de variabilidad genética en *C. palmata*, en el subtema 3.4 y 3.4.1, se estimó la diversidad genética y se determinaron los escenarios de cruza entre parentales en plantas propagadas por rizomas y en plantas de propagadas por semillas, utilizando el coeficiente de endogamia (FIS = 0.25, 0.5 y 1).

3.1. RESULTADOS

3.1.2 Reproducibilidad de los marcadores moleculares IRAP y SCoT en *C. palmata*

Se corroboraron y evaluaron perfiles de los marcadores utilizando plantas propagadas por rizomas y de plantas propagadas por semillas. En figura 13-A-B, el marcador SUKKULA generó siete loci, con bandas entre 550 pb y 3000 pb, donde tres loci (700 pb, 1300 pb y 1500 pb) fueron monomórficos para los dos grupos de propagación.

Se validaron los marcadores SCoT en plantas a partir de rizomas con la generación de bandas 400 pb y 3000 pb. En la Figura (13-A-B), el marcador molecular SCoT-18 generó nueve loci y bandas de 700 pb, 1300 pb y 1500 pb, que mostraron monomorfismo para los dos grupos de propagación. Los resultados demuestran que ambos marcadores moleculares son reproducibles e informativos para la diferenciación genética de *C. palmata*.

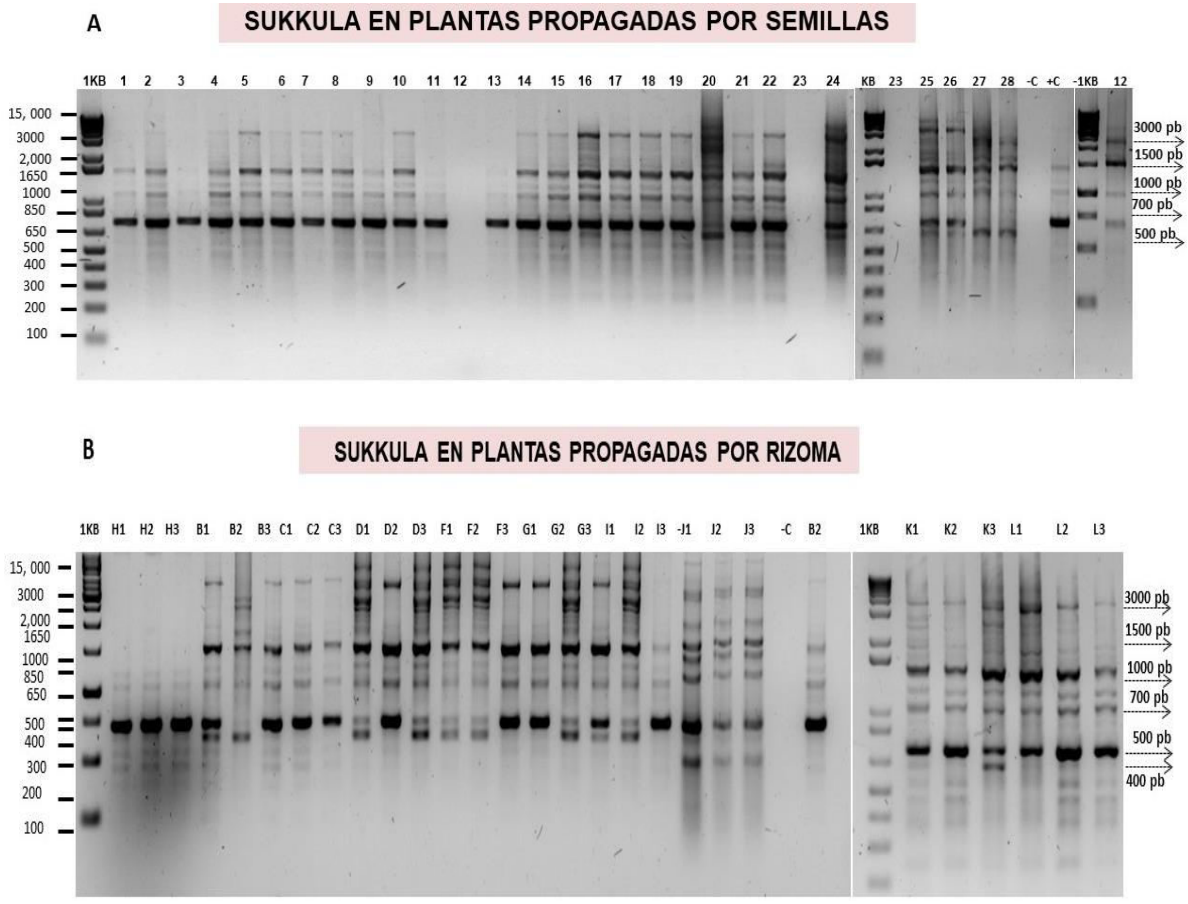


Figura13. Perfiles de amplificación con el marcador molecular SUKKULA. La figura 13-A, son plantas propagadas a partir de semillas de *C. palmata* y la figura 13-B plantas

propagadas por rizoma. Las condiciones: 1.5 % de agarosa en un tiempo de corrida de 75 V por 70 min. MPM: 1KB Plus Ladder Invitrogen.

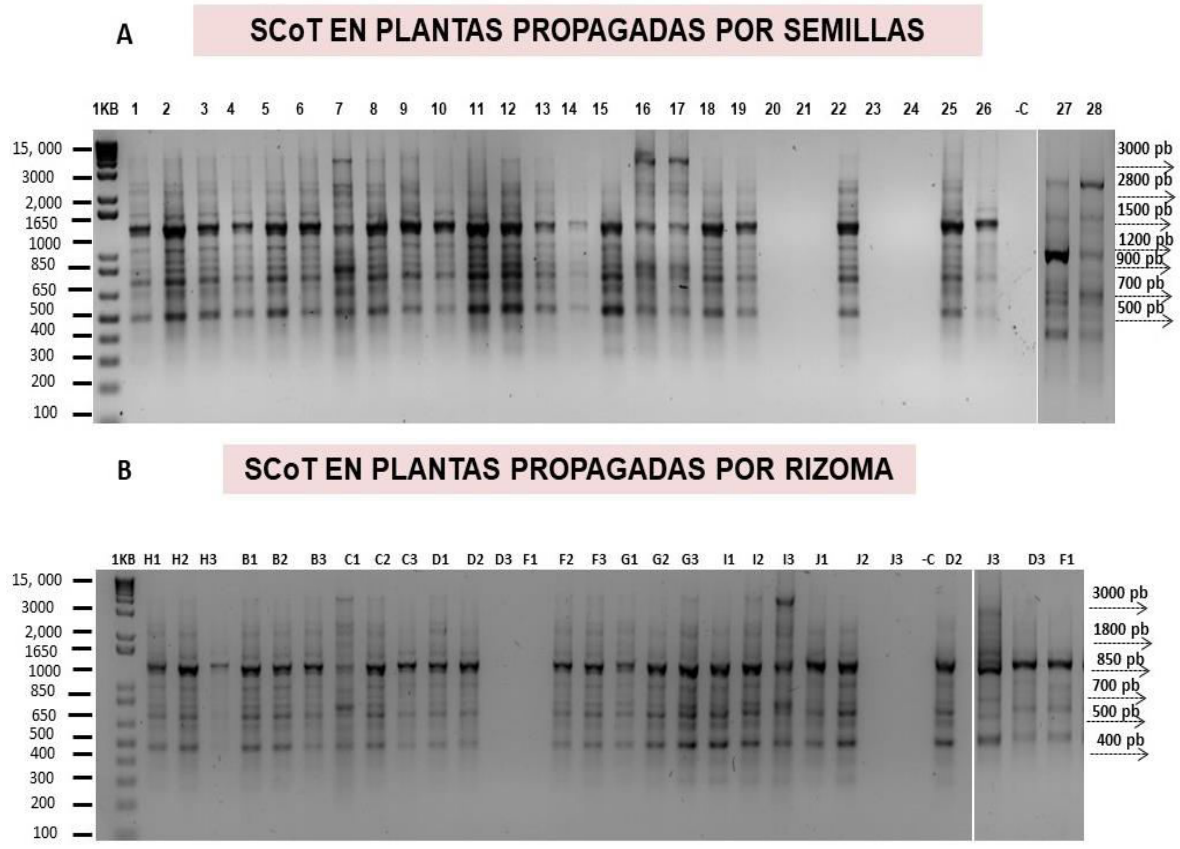


Figura 14. Perfiles de amplificación con el marcador SCoT. La figura 14-A, son plantas propagadas a partir de semillas amplificado con el marcador molecular SCoT-18. La figura 14-B, son plantas propagadas por rizoma. Las condiciones: 1.5 % de agarosa en un tiempo de corrida de 75 V por 70 min. MPM: 1KB Plus Ladder Invitrogen.

3.2 Poder discriminatorio de los marcadores moleculares

En plantas propagadas por semillas y propagadas por rizoma se generaron siete loci polimórfico con el marcador molecular SUKKULA y utilizando el marcador molecular SCoT-18, que generaron nueve loci polimórficos (Cuadro 8). Basado en los índices de contenido polimórfico y de Shannon Wiener, los loci demostraron una baja diversidad genética intraespecífica generando un (PIC > 0.28) en plantas propagadas por rizoma utilizando el marcador molecular SUKKULA. Con el marcador molecular SCoT-18 se obtuvo un (PIC > 0.30) en plantas propagadas por semillas. Para ambos grupos genéticos los marcadores

resultaron ser razonablemente informativos y se sugiere que, SUKKULA y el SCoT-18 podrían ser útiles en evaluaciones de la diversidad genética de *C. palmata* en estudios subsecuentes.

Cuadro.8. Comparación de la estimación de la diversidad genética en *C. palmata* PIC y H'. (Marcadores dominantes mediante Índice de Contenido Polimórfico e Índice de Shannon Wiener).

Marcador molecular	Plantas propagadas por rizoma			Plantas propagadas por semillas		
	NB	PIC	H'	NB	PIC	H'
SUKKULA	7	0.28	0.984	7	0.24	0.9838
3'LTR	5	0.17	0.980	5	0.25	0.9802
NIKITA	5	0.13	0.980	4	0.15	0.9808
SCoT-3	5	0.21	0.987	7	0.20	0.9868
SCoT-5	6	0.13	0.989	6	0.11	0.9859
SCoT-18	9	0.15	0.988	9	0.30	0.9880

***PIC**: Índice de contenido polimórfico, ***H'**: Índice de Shannon Wiener. ***NB**: número de bandas/ loci

3.3.1 Diversidad genética con los IRAP

La diversidad genética en *C. palmata* fue similar para el índice Shannon Wiener en plantas propagadas por rizoma (H' = 0.986) y en plantas propagadas por semilla (H' = 0.981), no demostrando diferencias significativas con los marcadores moleculares IRAP y con los marcadores moleculares SCoT (Cuadro 8).

3.3.2 Diversidad genética de Nei con los marcadores IRAP

Utilizando 22 loci polimórficos con los marcadores IRAP, se validó el sistema marcador en plantas propagadas por semillas y propagadas por rizoma. En el Cuadro 9, muestra el análisis usando el índice de FIS y de los valores para el sistema de propagación indicando que podría ocurrir por diferentes cruzas entre plantas que son medias hermanas (FIS = 0.25), plantas hermanas (FIS = 0.5) y cuando la planta de autopoliniza (FIS = 1).

Se estimó la heterocigosidad de Nei y el nivel de parentesco con (FIS = 0.25; FIS = 0.5) con los marcadores moleculares IRAP (SUKKULA, NIKITA, 3'LTR). Las estimaciones con un (FIS = 0.25), con los marcadores moleculares IRAP demostró en las plantas propagadas por rizomas la heterocigosidad (He = 0.28149), con un error estándar (S.E He = 0.03568) y para las plantas propagadas por semillas (He = 0.28149) y (S.E He = 0.03831), estas estimaciones demostraron que la diversidad genética es similar y que no existen diferencias significativas cuando se usan los marcadores IRAP.

Los resultados fueron similares utilizando un parentesco entre medios hermanos (FIS =0.5) que demuestran que en propagadas por semillas la heterocigosidad fue (He = 0.25352), con un error estándar (S.E He = 0.03810) y para las plantas propagadas por rizomas (He = 0.24527) y (S.E He = 0.03132), en la Figura 15, se puede ver la gráfica que muestra al marcador molecular IRAP utilizado e indicando que no existen diferencias significativas en plantas propagadas por semillas y en plantas propagadas por rizoma, demostrando que la diversidad genética es similar en ambos grupos.

Cuadro 9. Estimadores de la diversidad genética. (Lynch & Milligan method), cuando FIS = 0.25 y FIS = 0.5, en *Carludovica palmata*, empleando 22 loci de marcadores IRAP (SUKKULA, NIKITA, 3'LTR). Con el programa AFLP-SURV 1.0. (Vekemans V., 2002) en plantas propagadas por semillas y plantas propagadas por rizoma.

Marcadores IRAP	Plantas de propagación	N.º de individuos	N.º de loci	Locus por grupo	PLP	He	S.E. (He)
FIS 0.25							
(SUKKULA, NIKITA, 3'LTR)	Semillas	28	22	15	68.2	0.27505	0.03831
	Rizomas	28	22	17	77.3	0.28149	0.03568
FIS 0.5							
(SUKKULA, NIKITA, 3'LTR)	Semillas	28	22	15	68.2	0.25352	0.03810
	Rizomas	28	22	18	81.8	0.24527	0.03132

NLocP: número de loci polimórfico en 5%. Evalúa las frecuencias alélicas (0.05- 0.95).
*PLP: Porcentaje de loci polimórfico 5%.
*He o Hj: Heterocigosidad esperada, en proporción de datos genotípicos de Hardy-Weinberg indica la diversidad genética.
*S.E. (He): Error estándar de la diversidad genética.
*FIS (0.25 y 0.5, H&W asume) 1000 Bootstrap.

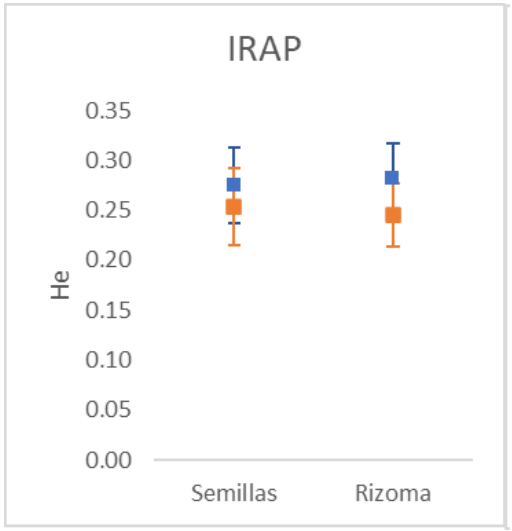


Figura15. Gráfico de la heterocigosidad determinada con los marcadores IRAP**.** Plantas propagas por semillas y en plantas propagadas por rizomas, (He) =heterocigosidad esperada.

3.3.3 Loci polimórfico con los marcadores moleculares SCoT

Identificamos el comportamiento del sistema marcador SCoT en relación con las plantas propagadas por rizomas y de plantas propagadas por semillas, se estimó el parentesco (FIS = 0.25 y FIS = 0.5), con 26 loci polimórfico de marcadores moleculares SCoT. En el Cuadro 10, determinamos la heterocigosidad esperada con (SCoT-3, SCoT-5, SCoT-18) con un mayor contenido de loci polimórfico el PLP (73.1), en plantas propagadas por semillas a diferencia de un PLP (69.2) en plantas propagadas por rizomas.

Los resultados del parentesco con medios hermanos (FIS =0.25) demostraron en propagadas por rizomas una heterocigosidad esperada (He = 0.29560) y (S.E He = 0.03665) y en plantas propagadas por semillas (He = 0.26788) y (S.E He = 0.03003) demostrando diversidad genética similar.

Cuando asumimos un parentesco entre hermanos con (FIS =0.5), los resultados indicaron que la heterocigosidad esperada en plantas propagadas por rizomas (He = 0.25861) tuvo un error estándar (S.E He = 0.03455), para las plantas propagadas por semillas la (He = 0.23249) y (S.E He = 0.02966) resultaron son muy similares no evidenciando diferencias significativas.

En la Figura 16, el gráfico demuestra que utilizando los marcadores SCoT, con el parentesco entre medios hermanos (FIS = 0.25) y con hermanos completos (FIS = 0.5) la diversidad genética es similar y no existen diferencias significativas esto sugiere que bajo

la cualquiera de los sistemas de propagación *C. palmata* tiene heterocigosis similar y que puede estar asociada al proceso de selección de los individuos en la región norte.

Cuadro 10. Estimadores de la diversidad genética. (Lynch & Milligan method), cuando FIS = 0.25 y FIS = 0.5, *Carludovica palmata*, empleando (26) loci de marcadores SCoT (SCoT-3, SCoT-5, SCoT-18) Con el programa AFLP-SURV 1.0 (Vekemans V., 2002) en los dos grupos genéticos.

Marcadores SCoT	Grupos	N.º de individuos	N.º de loci	Locus por población	PLP	He	S.E.(He)
FIS = 0.25							
(SCoT-3, SCoT-5, SCoT-18)	Semillas	28	26	19	73.1	0.26788	0.03003
	Rizomas	28	26	18	69.2	0.29560	0.03665
FIS = 0.5							
(SCoT-3, SCoT-5, SCoT-18)	Semillas	28	26	19	73.1	0.23249	0.02966
	Rizomas	28	26	18	69.2	0.25861	0.03455

*NLocP: número de loci polimórfico en 5%. Evalúa las frecuencias alélicas (0.05- 0.95).
*PLP: Porcentaje de loci polimórfico 5%.
*Heo Hj: Heterocigosidad esperada, en proporción de datos genotípicos de Hardy-Weinberg indica la diversidad genética.
* S.E. (He): Error estándar de la diversidad genética.
*FIS (0.25 y FIS = 0.5, if H&W asumen) 1000 Bootstrap.

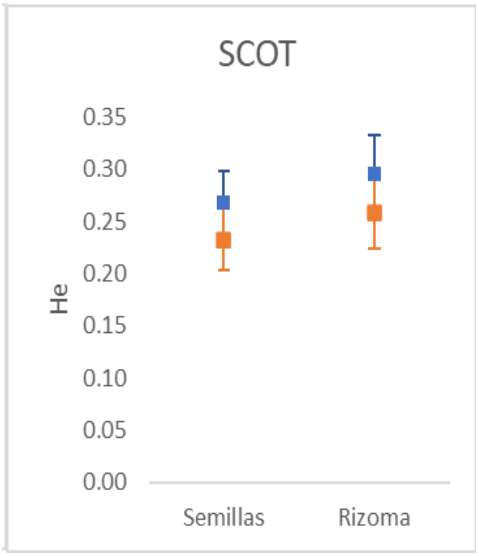


Figura 16. Gráfico de la heterocigosidad determinada con los marcadores SCoT. En plantas propagas por semillas y en plantas propagadas por rizomas, (He) =heterocigosidad esperada.

3.4 Escenarios del parentesco en *C. palmata*

Se utilizó el criterio de Hardy-Weinberg, que infiere apareamientos no aleatorios dentro de una población y cuando se asume un parentesco dentro de la especie se toma el valor de (FIS = 0.25), demostrando ser medios hermanos, con hermanos completos (FIS =0.5) y cuando la misma planta (planta que sufre autopolinización) (FIS= 1). En el Cuadro 11, se estimó el parentesco y la heterocigosidad esperada con los marcadores moleculares IRAP y los marcadores moleculares SCoT como un estimador de la diversidad genética.

En los resultados del parentesco con medios hermanos (FIS =0.25) se demostró una heterocigosidad esperada en plantas propagadas por semillas (He = 0.27056), y (S.E He = 0.02363) y en plantas propagadas por rizomas (He = 0.28920), un (S.E He = 0.02544) resultando una diversidad genética similar. Cuando asumimos un parentesco entre hermanos con (FIS =0.5) la heterocigosidad esperada de plantas propagadas por semillas (He = 0.24159) y (S.E He = 0.02341) y en plantas propagadas por rizomas (He = 0.25260) y (S.E He = 0.02335) demostrando diversidad genética similar sin diferencias significativas.

3.4.1 Parentesco en plantas con autofecundación

El último escenario (Cuadro 11: FIS = 1), demostraría lo que sucede en función de la heterocigosidad esperada con la misma planta. En el Cuadro 11, los resultados indicaron que el número de loci polimórfico disminuye en las plantas propagadas a partir de semillas (NLP = 29), mientras que en plantas propagadas por rizomas es mayor (NLP = 36), la heterocigosidad esperada en plantas propagadas a partir de semillas (He = 0.20504) y (S.E He = 0.02365) y en plantas propagadas por rizomas (He = 0.29735) y (S.E He = 0.02065) demostró que utilizando ambos marcadores moleculares (IRAP y SCoT) la heterocigosidad esperada resultó ser similar para los dos grupos genéticos sin diferencias significativas y cuando la plantas se autopolinizan.

En la Figura 16, el gráfico demuestra que utilizando los marcadores moleculares IRAP y SCoT, en relación con el parentesco entre medios hermanos (FIS = 0.25), con hermanos completos (FIS = 0.5), con la misma planta (FIS = 1) la diversidad genética es similar y no existieron diferencias significativas, esto sugiere que bajo la cualquiera de los sistemas de propagación la especie tiene heterocigosis similar y que puede estar asociada al proceso de selección de los individuos heterocigóticos “congelados” demostrando el sistema de cultivo y la propagación clonal de *C*. *palmata* en la región norte.

En el caso de las plantas propagadas por semillas bajo los sistemas de apareamientos entre plantas (cruzas de medias hermanas, hermanas completas o auto-fecundación), se demostró la incapacidad de incrementar la diversidad genética en las líneas de plantas a partir de semillas, demostrando una diversidad genética limitada.

Cuadro 11. Estimadores de la diversidad genética. **(**Lynch & Milligan method), cuando FIS =(0.25, 0.5 y 1) en *Carludovica palmata*, empleando 48 loci y utilizando tres marcadores IRAP (SUKKULA, NIKITA, 3'LTR), y cuatro marcadores SCoT (SCoT-3, SCoT-5, SCoT-18) computado con el programa AFLP-SURV 1.0. (Vekemans V., 2002).

Grupos	N.º de individuos	N.º de loci	NLocP	PLP	He	S.E.(He)
FIS =0.25						
Propagación por semilla	28	48	34	70.8	0.27056	0.02363
Propagación por rizoma	28	48	36	75.0	0.28920	0.02544
FIS =0.5						
Propagación por semilla	28	48	34	70.8	0.24159	0.02341
Propagación por rizoma	28	48	36	75.0	0.25260	0.02335
FIS=1						
Propagación por semilla	28	48	29	60.4	0.20504	0.02365
Propagación por rizoma	28	48	36	75.0	0.29735	0.02065

NLocP: número de loci polimórfico en 5%. Evalúa las frecuencias alélicas (0.05- 0.95).
*PLP: Porcentaje de loci polimórfico 5%.
*He o Hj: Heterocigosidad esperada, en proporción de datos genotípicos de Hardy-Weinberg indica la diversidad genética.
*S. E (He): Error estándar de la diversidad genética.
*FIS (0.25, 0.5, 1. H&W assumed) 1000 Bootstrap.

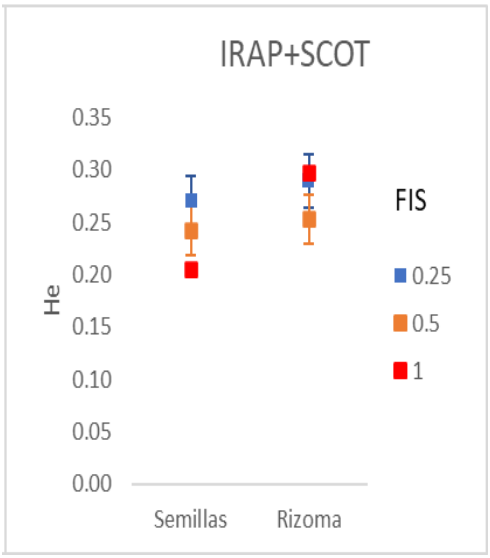


Figura 17. Gráfico de la heterocigosidad esperada en plantas propagas por semillas y en plantas propagadas por rizomas en relación con el parentesco entre medios hermanos (FIS = 0.25), hermanos completos (FIS = 0.5) y con plantas de autopolinización (FIS = 1).

CAPÍTULO IV

4.1 DISCUSIÓN

4.1.2 Reproducibilidad del marcador (IRAP-SCoT)

De los siete marcadores Inter-retrotransposones (IRAP), descritos para cebada tres resultaron reproducibles en *C. palmata* (SUKKULA, 3'LTR y NIKITA) (Shirasu et al., 2000). Los resultados demostraron la robustez del marcador molecular SUKKULA, en la generación de diferentes loci polimórfico e indicaron que son razonablemente informativos con un (PIC <0.25) (PIC = 0.28) en plantas propagadas por rizomas (PIC = 0.24) y en plantas propagadas a partir de semillas (Cuadro 8). Botstein et al., (1980), afirmaron que el contenido de información del polimorfismo (PIC), es el resultado de los loci totales e que demuestran el poder discriminatorio del marcador molecular, por tanto, los marcadores IRAP utilizados fueron adecuados para los análisis de PIC en *C. palmata*, así como la eficiencia y la robustez del marcador molecular empleado. Existen 36 marcadores moleculares SCoT descritos para arroz (Collard & Mackill, 2009), nuestro trabajo demostró que 34 marcadores moleculares presentaron bandas monomórficas, y solo tres generaron diferente loci polimórfico (SCoT-3, SCoT-5, y SCoT-18) y únicamente el SCoT-18 generó loci polimórficos que fueron razonablemente informativos (PIC < 0.25), con un (PIC = 0.15) en plantas por rizomas y un (PIC = 0.30) en plantas por semillas, que demostró que el SCoT 18 es adecuado para determinación de polimorfismo. En un estudio realizado en la especie *Crocus sativus*, se evaluaron los marcadores moleculares IRAP, con el marcador molecular SUKKULA se generaron diferentes loci polimórfico, y con el marcador molecular NIKITA se generaron únicamente monomorfismo y sin diferencias significativas en la diversidad genética en los en relación con los sitios evaluados (Alsayied et al., 2015). En nuestro trabajo al igual que el estudio con *Crocus sativus*, SUKKULA generó mayor polimorfismo a diferencia que NIKITA generó monomorfismo en plantas propagadas por rizoma y en plantas propagadas por semillas (Cuadro 8). La reproducibilidad del marcador SUKKULA demostró un (PIC = 0.28) en plantas propagadas por rizomas y un (PIC = 0.30) en plantas propagas por semillas con el marcador molecular SCOT-18, esto demostró que para cada grupo genético el marcador funciona en la determinación de distinto loci polimórfico (Cuadro 8) y (Figura 13-A-B, 14-A-B). Cuantitativamente el grado de polimorfismo se mide con la heterocigosidad (Nei & Roychoudhury, 1974). Para las plantas propagadas por rizomas y en plantas propagadas por semillas el índice de contenido polimórfico fue mayor que (PIC

2.5) e indicó que los marcadores utilizados son funcionales para *C*. *palmata*. Serrote et al., (2020), en su clasificación de los valores de PIC, mencionan que un valor de PIC (0 a 0.10) indica una baja reproducibilidad de un marcador dominante, mientras que un PIC (<2.5) indica alta reproducibilidad del marcador molecular, nuestros resultados validados con los marcadores IRAP y SCoT demostraron ser adecuados para los análisis de la variación genética en *C. palmata*.

La generación de bandas polimórficas con el marcador molecular SUKKULA de 500 pb, 1000 pb, 15000 y 3000 pb no mostraron loci específicos en nuestro estudio. Mientras que el estudio realizado por Alsayied et al., (2015) con *Crocus* se generaron bandas desde 100 pb hasta aproximadamente 4 kb, además, de la ausencia de bandas (alelos nulos), que fueron tomados como accesiones con distinto loci polimórfico. En nuestro trabajo al igual *Crocus sativus*, utilizando el marcador molecular SUKKULA, la presencia de bandas en la posición 600 pb, en plantas por rizomas con un loci polimórfico en la posición 600 pb (Figura 13-A-B), permitió determinar la diversidad genética. Sathapondecha et al., (2021), en sus análisis moleculares con los marcadores SCoT, validaron como mejor marcador molecular SCoT-18, en comparación con los RAPD, resultando ser reproducible para diferentes especies monocotiledóneas, como, en arroz (*Oryza sativa*), en palma aceitera (*Elaeis guineensis*), y en cebolla (*Allium cepa*), en nuestro estudio el SCoT-18 es un adecuado marcador polimórfico, pero no demostró diferencias significativas para los diferentes loci polimórfico (Cuadro 10). Por otra parte, el SCoT-10, SCoT-20 y SCoT-36no amplificaron para ninguna de las muestras de ADN en *C*. *palmata*, indicando que estos dos marcadores no son funcionales para la especie.

4.1.3 Diversidad genética con el Índice de Shannon y Nei

Se determinó con el índice de Shannon-Weiner la diversidad alélica total en plantas propagadas por rizoma y en plantas propagadas a partir de semillas, el índice (I- H') mide la diversidad total y diversidad genética Sun & Ren, (2021). Los resultados el índice de Shannon-Weiner fueron (H' = 0.986) en plantas propagadas por rizomas, y en las plantas propagadas a partir de semillas (H' = 0.981) estos resultados sugieren que en los sistemas de propagación hay una diversidad genética limitada. En sus estudios (Saboori et al., 2019), estimaron la diversidad genética en cultivares de palma datilera que utilizaron diferentes parámetros de la diversidad genética, en sus resultados el número de loci polimórfico estimado con marcadores moleculares SCoT en palma datilera fue menor (PLP =62.5% a 67.86%) comparado con *C. palmata* (PLP 69.2% a 73.1%). Estos resultados sugieren que

la diversidad alélica en palmas cultivadas puede ser similar y cuando las especies provienen de sistemas de propagación diferente. En nuestros análisis, se incluyeron a los marcadores SCoT para la determinación de la diversidad genética; el índice de Shannon (I), (Ne), (HE) y el (PLP), en plantas de propagación a partir de rizomas y en plantas de propagación a partir de semillas en comparación con cultivares con mayor diversidad en palmata datilera resultó que (I = 0.348, He = 0.233 y PLP = 67.86) en el cultivar Mazafati y en el cultivar Kalooteh (I = 0.311, He = 0.206 y PLP = 62.5) que demostraron niveles moderados de diversidad genética con los diferentes loci utilizando a los marcadores moleculares SCoT. En nuestro estudio, también se usaron diferentes estimadores de la diversidad genética como el índice de Shannon (I, o H'), (Ne), (HE) y el (PLP), para los dos grupos de propagación y con los marcadores (IRAP y SCoT). Nuestros resultados con los IRAP (SUKKULA) en plantas propagadas a partir de rizomas demostró una heterocigosidad esperada (He = 0.2892) y (PLP = 75%) mientras que en plantas de propagación por semillas (He = 0.27056) y (PLP = 75%) (Cuadro 11), el uso de los marcadores moleculares no mostró diferencias significativas en relación con la diversidad genética y con el tipo de propagación, pero destaca ser limitada para ambos grupos de propagación. Entre los factores que estuvieran limitados a la especie es amplio, entre ellos, en la reproducción sexual (limitación para la producción de semillas), la propagación exclusivamente clonal, así como cruzamientos entre parentales.

4.1.4 Parentesco en individuos de *C. palmata*

C. palmata en la región norte de Campeche está enfrentando cruce entre parentales como lo demuestran los estudios realizados con el coeficiente de endogamia FIS, este estimador determina apareamientos entre los individuos de una población y tiene relación con la heterocigosis (Pérez-Pereira et al.,2022; Piñero et al., 2010). En *C. palmata* el coeficiente de endogamia (FIS = 0.25) demostró la diversidad genética para ambos grupos, resultando (He = 0.028920) en plantas propagadas por rizomas y (He = 0.02756) en plantas propagadas a partir de semillas, ante este escenario los apareamientos entre medios hermanos la heterocigosidad esperada resulto similar no existiendo diferencias significativas. Cuando se utiliza (FIS = 0.5), el cruce entre parentales da como resultado en hermanos completos (Cuadros 10 y 11), la heterocigosidad esperada de plantas propagadas por semillas (He = 0.24159) y (S.E He = 0.02341), y en plantas propagadas por rizomas (He = 0.25260) y (S.E He = 0.02335) demostrando una diversidad genética similar

sin diferencias significativas para ambos grupos. Finalmente, cuando las plantas se autopolinizan (FIS= 1), en el Cuadro 11 y en la Figura 17, la diversidad genética es similar y no existen diferencias significativas, esto sugiere que bajo cualquiera de los sistemas de propagación, la especie tiene heterocigosis similar y que puede estar asociada al proceso de selección de los individuos, mientras que en las plantas propagadas por semillas bajo los sistemas de apareamientos entre plantas (cruzas de medias hermanas, hermanas completas o auto-fecundación), se demostró la incapacidad de incrementar la diversidad genética en las líneas de plantas. En un trabajo reciente (Magige et al., 2022), utilizaron el coeficiente de endogamia (FIS), para la identificación de parentales, así como la diversidad genética en *Juglans regia* L. una planta que sufre polinización cruzada (exhibiendo su carácter protoginia). Los resultados utilizando marcadores ISSR demostraron una baja diversidad genética y niveles moderados de depresión endogámica Fts (0.20 a 0.50), la estructura genética demostró parentales cercanos entre sí, y del (PLP = 97%), (NA = 3.793), (He = 0.558), los estudios demostraron baja diversidad genética, indicando una posible fragmentación del hábitat, reducción del tamaño de la población, y favorecía al apareamiento entre parientes cercanos. Si, FIS es un parámetro directo de la endogamia, que indica el índice de fijación de Wright. Cuando tenemos un valor alto de FIS, demuestra ser positivo y significativo. La especie *P*. *japónica*, es una especie de predominancia reproducción asexual y tiene alta endogamia demostrado un (FIS =0.457), que demuestra un alto número de homocigotos y que está relacionada con la reproducción vegetativa de la especie (Dransfield, 2002). En nuestros análisis de la región norte de Campeche, en relación con la diversidad genética, sugieren que bajo la cualquiera de los sistemas de propagación la especie tiene heterocigosis similar, situación relacionada al proceso de selección de los individuos “heterocigóticos congelados” que evidencian al sistema de propagación clonal (reproducción vegetativa) de *C*. *palmata* en la región norte, mientras que en plantas que se reproducen por semillas la diversidad genética resulta similar, mientras que en plantas propagadas por semillas bajo los sistemas de apareamientos entre plantas (cruzas de medias hermanas, hermanas completas o auto-fecundación), se demostró la incapacidad de incrementar la diversidad genética en las líneas de plantas, si bien, durante la auto-fecundación se proporciona seguridad reproductiva cuando los polinizadores o las parejas sexuales son raros, sin embargo, la auto-fecundación puede ser "callejón sin salida de la evolución", esto demostraría, que la auto-fecundación eventualmente conducirá a la extinción debido a la menor efectividad de la recombinación y aumento de homocigotos

(Van Ginkel et al., 2020). Por último, la diversidad genética limitada en la región norte de Campeche, sugiere que pudieron ser diferentes eventos de recombinación (diferentes genotipos introducidos en el interior de la hacienda), que demuestra que ambos marcadores IRAP (SUKKULA y 3'LTR) en los individuos evaluados dentro de la hacienda están mostrando que al menos dos de cada grupo (H1, H5, H3) indicando diferenciación genética. Entre otros factores que pudieran explicar esta diferenciación genética, se encuentra la presencia de retrotransposones dentro de *C. palmata*, que estaría beneficiando al sistema de propagación clonal como lo mencionan (McKey et al., 2010; Ramakrishnan et al., 2023). Los retrotransposones, en plantas son la principal causa de variación genética generando cambios a nivel genético y alteraciones en los cromosomas. Los retrotransposones en su mayoría son activados por condiciones de estrés y factores ambientales, en la actualidad los retrotransposones LTR, son una herramienta excelente para estudiar la diversidad genética, así como factores claves de la diversidad genética como; la deriva génica, la endogamia, el flujo génico, la recombinación genética y el equilibrio entre la mutación (Loveless et al., 1984; Ramakrishnan et al., 2023). Adicionalmente, la reducción de la diversidad genética tiene relación con la disminución de alelos (alelos homocigotos). Por su parte, Johnson & Shaw, (2015), mencionan que, durante la disminución de los alelos y una baja diversidad genética puede propiciar a una depresión endogámica. McKey et al., (2010) que afectan la reproducción sexual (aptitud), y la disminución la diversidad genética en poblaciones.

CONCLUSIONES GENERALES

En base en las estimaciones realizadas utilizando los marcadores moleculares IRAP y SCoT, se demostró que el marcador molecular SUKKULA y marcador molecular SCoT-18 demostraron ser funcionales y razonablemente reproducibles para la determinación de la diversidad genética en *C. palmata*, en la región norte.

La diversidad genética de *C. palmata* en plantas de propagación por rizomas, demostró la introducción de pocos genotipos seleccionados (efecto fundador), por tanto, la diversidad genética es limitada.

La heterocigosidad esperada en *C. palmata* resultó ser similar en plantas de propagación por rizomas y en plantas de propagación por semillas, sin cambios significativos debido a una base genética estrecha.

Los estudios entre parentales de *C. palmata*, demostraron niveles de parentesco entre ambos grupos de propagación sin diferencias significativas respecto a la diversidad genética, excepto, cuando se asume que las plantas de propagación por semillas se generen por autofecundación, en este caso, diversidad genética es menor en comparación de las plantas a partir de rizomas.

PERSPECTIVAS

Perspectivas de los estudios de la diversidad genética

Implicaciones sobre de la diversidad genética limitada en la región norte de Campeche

La diversidad genética de *C. palmata* en México es limitada debido a que la base genética es estrecha, parte de un (efecto fundador), que inició hace más de 150 años durante su introducción. Entre los factores que están involucrados en la disminución de la diversidad genética, se encuentran, la limitación del cultivo exclusivamente por propagación vegetativa, la domesticación y la incapacidad de producir semillas fértiles.

Estos cuellos de botella podrían agravarse con el paso de los años arriesgando a la especie y ser propensos a niveles altos de endogamia, así mismo la generación exclusivamente por rizomas (hijuelos) afectaría seriamente el cultivo, resultando ser propenso al ataque de patógenos, situación que se desconoce en la especie y que es importante considerar en futuros trabajos de investigación.

Para ello se considerarían las siguientes alternativas:

- Selección de genotipos eficientes en la propagación rápida (rizomas) y de calidad de fibras.
- Seleccionar genotipos de excelente producción de hojas inmaduras para bancos de germoplasma.
- Contar con sistemas de germinación de semillas de líneas clonales élite.
- Selección de genotipos de resistencia a sequía y de genotipos que presenten resistencia a enfermedades.
- Validar nuevos marcadores genéticos que permitan diferenciar líneas clonales en campo.
- Realizar otros estudios de la diversidad genética de la región porque se desconoce el riesgo del cultivo, debido a la propagación exclusivamente clonal.
- Realizar estudios relacionados con la determinación de la endogamia total.
- Incrementar la diversidad genética (refrescar con nuevos genotipos),
- Promover la polinización cruzada, lo que podría lograrse identificando diferentes líneas genéticas de interés.

BIBLIOGRAFÍA

Aboulila A. A., Mansour M. (2017) Efficiency of Triple-SCoT Primer in Characterization of Genetic Diversity and Genotype-Specific Markers against SSR Fingerprint in Some Egyptian Barley Genotypes. *American Journal of Molecular Biology*. 7: 123-137

Ahuja, M. R., & Jain, S. M. (Eds.) (2015). Genetic diversity and Erosion in plants: Case histories. Vol: 8 Springer.

Allaby, R. G., Ware, R. L., & Kistler, L. (2019) A re-evaluation of the domestication bottleneck from archaeogenomic evidence. *Evolutionary Applications*, 12(1), 29-37.

Allendorf F.W., Hohenlohe P.A., Luikart G. (2010) Genomics and the future of conservation genetics. *Nature Reviews Genetics* 11(10):697-709.

Alsayied, N. F., Fernández, J. A., Schwarzacher, T., & Heslop-Harrison, J. S. (2015). Diversity and relationships of *Crocus sativus* and its relatives analysed by inter-retroelement amplified polymorphism (IRAP). *Annals of Botany*, 116 (3), 359-368.

AmomT., Nongdam P. (2017) The Use of Molecular Marker Methods in Plants: A Review. *General Science Sci. Journal*.Department of Biotechnology, Manipur University, Manipur, India. 9 (17)1-7.

Andrivon, D. (2017) Potato facing global challenges: how, how much, ¿how well? Potato Research. 60: 389-400.

Artesanías Colombia (2014). Programa de atención a la población desplazada APD, fecha de consulta: 14 noviembre 2014. http://www.artesanias-de-colombia-realiza-capacitacion-a-indigenas-wounaam-1212.

Arvas E.Y., Kocacalıskan I., Ordu E., and Erisen O. (2022) Comparative retrotransposon analysis of mutant and non-mutant rice varieties grown at different salt concentrations, *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. 36 (1):25-34.

Azhar M., Muhammad N., Nawaz A., Shahid Q., Doğan Y., Comertpay G, Yıldız M., Hatipoğlu R, Ahmad F., Alsaleh A, Labhane N, Özkan H., Chung G., and Shehzad F.B (2017). DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. Biotechnology and *Biotechnological Equipment*. 32(2): 261-285.

Bacab-Caamal D.V. (2020) “Análisis de la fase reproductiva de palma jipi (*Carludovica Palmata* Ruiz & Pavón) en plantas cultivadas en el norte del estado de Campeche” Tesis Profesional. (ITESCAM), Calkiní, Campeche. Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. (CICY).

Barrantes Gilbert & Sandoval Luis. (2009) “Conceptual and statistical problems associated with the use of diversity indices in ecology*” Revista de Biología Tropical*. 57(3) 451-460.

Barrett Spencer C. H. (2015) Influences of clonality on plant sexual reproducción. *Biological Sciences*. 112 (29): 8859-8866.

Bashalkhanov, S., Pandey, M. & Rajora, O.P. (2009) A simple method for estimating genetic diversity in large populations from finite sample sizes. *BMC Genetics* 10:84, 1-10.

Bennett, B., Alarcon, R., Cerón, C. (1992) The ethnobotany of *Carludovica palmata Ruiz* & Pavon (Cyclanthaeae) in Amazonian Ecuador. *Economic Botany.* 46 (3): 233-240.

Bristol, M. L. (1961) *Carludovica palmata* in broommaking. Botanical Museum Leaflets, Harvard University. 19 (9):183.

Botstein, D., White, R.L., Skalnick, M.H., Davies, R.W. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. Am. J. Hum. Genet. 32(3):320

Brumfield RT, Beerli P, Nickerson D.A. Edwards S.V. (2003) The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history. *Trends in Ecology and Evolution*.18(5):249-56.

Caballero, A., Bravo, I. & Wang, J. (2017) Inbreeding load and purging: implications for the short-term survival and the conservation management of small populations. *Nature Communications*. 118:177-185

Carvalho Y. G. S., Vitorino L.C., de Souza U. J. B., Bessa L.A. (2019) Recent Trends in Research on the Genetic Diversity of Plants: Implications for Conservation. *Diversity*.MDPI. (11) 62:1-21.

Charlesworth, D., & Willis, J. H. (2009). The genetics of inbreeding depression. *Nature Reviews Genetics*, 10 (11): 783-796

Collard, BC and Mackill, DJ (2009) Start codon directed polymorphism (SCoT): a novel and simple DNA marker technique to generate gene directed markers in plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 27): 86-93.

Collard B.C.Y., Jahufer M.Z.Z., Brouwer J.B. (2005) An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. *Euphytica.* 142:169-196

Cortes, V., Gómez, D., and Nuñez-Avellaneda, L. (2018). Relación de visitantes florales con las fases florales de *Carludovica palmata* (Ruiz & Pavon 1798)

(*Cyclanthaceae*) en un bosque seco tropical en Colombia. *Entomología Mexicana,* 4: 315-321.

Deham, T., Barton H., Castillo C., Crowther A., Dotte-Sarout E., Florin, S. A., Pritchard, J., Barron, A., Zhang, Y., & Fuller, D. Q. (2020). The domestication syndrome in vegetatively propagated field crops. *Annal of Botany*. 125(4):81-597.

De Kort, H., Legrand, S., Honnay, O., & Buckley, J. (2022). Transposable elements maintain genome-wide heterozygosity in inbred populations. *Nature Communications*. 13 (1): 7022.

Dubin, M. J., Mittelsten Scheid, O. & Becker, C. (2018) Transposons: a blessing curse. *Current Opinion in Plant Biology*. 42:23-29.

Duchoslavová J., Jansa J. (2018). The direction of carbon and nitrogen fluxes between ramets changes during ontogeny under simulated competition for light.*Journal of Experimental Botany* 69:2149-2158.

Duke, J. A. (1986) Isthmian ethnobotanical dictionary. Scientific Publishers, Jodhpur, India.

Dransfield S. (2002) *Greslania circinata* and *Greslania rivularis* (Poaceae-Bambusoideae) from New Caledonia, The Herbarium, Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey TW9 3AE, UK. *The Journal of the American Bamboo Society* 16(1): 1-8

Edwards K., Johnstone C., Thompson C. (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analys.*Plant Biotechnology section* 2: 1-4.

Escobar E. (2001) Presentación de Yotoco, Reserva Natura, Flora: Plantas vasculares Universidad Nacional de Colombia. Herbario de la Universidad de Antioquia, Medellín Colombia. Sede Palmira Valle: universidad Nacional de Colombia. Pp. 277.

Eyre-Walker, A., Gaut, R. L., Hilton, H., Feldman, D. L., & Gaut, B. S. (1998). Investigation of the bottleneck leading to the domestication of maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 95(8): 4441-4446.

Fadiman, M. (2001) Hat weaving with Jipi (*Carludovica palmata*) in the Yucatán Peninsula, México. *The New York Botanical Garden Press*. Pp. 539-544.

Fayaz A. (2011).*Encyclopedia of tropical plants.* Firefly Books Ltd. https://herbaria.plants.ox.ac.uk/bol/plants400/Profiles/CD/Carludovica

Ferguson ME., Shah T., Kulakow P., Ceballos H. (2019) A global overview of *Cassava* genetic diversity. *PLoS ONE* 14(11):1-16.

Ferreira, M. D. S., Rocha, A. D. J., Nascimento, F. D. S., Oliveira, W. D. D. S., Soares, J. M. D. S., Rebouças, T. A., & Amorim, E. P. (2023). The Role of Somaclonal Variation in Plant Genetic Improvement: A Systematic Review. *Agronomy*. 13(3): 730.

Frankham, R. (2005). Genetics and extinction. *Biological conservation*. 126(2):131-140

Frankham R. (2015) Genetic rescue of small inbred populations: metaanalysis reveals large and consistent benefts of gene fow. *Molecular Ecology* 24:2610-2618.

Franz M. N. (1999) Biología reproductiva de algunas Ciclantáceas (*Cyclanthaceae*) y de los picudos asociados (*Coleoptera: Curculionidae*). Tesis de Maestria Universidad de Costa Rica. Pp. 17-18.

Franz, N. (2007) Reproductive trade-offs in a specialized plant/pollinator system involving Asplundia uncinata Harling (Cyclanthaceae) and a derelomine flower weevil (Coleoptera: *Curculionidae*). *Plant Systematics and Evolution*. 269(3-4):183-201.

García-Dorado, A., & Caballero, A. (2021) Neutral genetic diversity as a useful tool for conservation biology. *Conservation Genetics,* 22(4): 541-545.

García-Dorado A. (2015) On the consequences of ignoring purging on genetic recommendations for minimum viable population rules. *Heredity*. 115:185-187

Givnish, T.J., Zuluaga, A., Spalink, D., Soto Gomez, M., Lam, V.K.Y., Saarela, J.M., Sass, C., Iles, W.J.D., Lima de Sousa, D.J., Leebens-Mack, J., Pires, J.C., Zomlefer, W.B., Gandolfo, M.A., Davis, J.I., Stevenson, D.W., dePamphilis, C., Specht, C.D., Graham, S.W., Barrett, C.F., Ané, C. (2018) Monocot plastid phylogenomics, timeline, net rates of species diversification, the power of multi-gene analyses, and a functional model for the origin of monocots. *American Journal of Botany* (105):1-23

Gorji A.M., Poczai P., Polgar Z., Taller J. (2011) Efficiency of Arbitrarily Amplified Dominant Markers (SCoT, ISSR and RAPD) for Diagnostic Fingerprinting in Tetraploid Potato. *American Journal of Potato Research*. (88):226-237.

Govindaraj, M., Vetriventhan, M., and Srinivasan, M. (2015). Importance of genetic diversity assessment in crop plants and its recent advances: an overview of its analytical perspectives. *Genet Res Int* 431-487.

Harling, G. (1958) Monograph of the *Cyclanthaceae*. *Acta de Horticultura*. Rudolf (ed). Hakan Ohlsson (18): 1-428.

Harling, G., Wilder, G., & Eriksson, R. (1958) *Cyclanthaceae*. The families and genera of vascular plants Kubitzki, K. (ed) *Springer.* Pp. 202-215.

Hat J. (2020) Catálogo de los sombreros finos. Jipihats. Acceso agosto de 2024. https://jipijapahats.com/tienda/

Havecker, ER, Gao, X. and Voytas, D.F. (2004) The LTR retrotransposon diversity. *Genome Biology* 5(6):225.

Helyar S.J., Hemmer-Hansen J., Bekkevold D., Taylor M., Ogden R., Limborg M. (2011) Application of SNPs for population genetics of nonmodel organisms: new opportunities and challenges. *Molecular Ecology Resources*. (11):123-36.

Herben, T., & Klimešová, J. (2020). Evolution of clonal growth forms in angiosperms. *New Phytologist*, 225(2):999-1010.

Instituto Nacional de Biodiversidad Coryright© y Missouri Botanical Garden (1995), modificado agosto de (1996). Manual de la flora de Costa Rica. www.mobot.org/manual.plantas/045686/G045864.html.

INEGI (2007) Conjunto de datos Vectorial edafológicos. (Continuo Nacional), México, escala 1:250000 serie II. https://apps1.semanart.gob.mx.

Johnson M.G., Shaw J. (2015) Genetic diversity, sexual condition, and microhabitat preference determine mating patterns in *Sphagnum* (Sphagnaceae) peat-mosses, *Biological Journal of the Linnean Society,* Volume 115, Issue 1, May 2015, Pages 96-113.

Kalendar R., Schulman AH. (2006) IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting. *Nature Protocols*.1(5):2478-2484.

Kalendar, R., Antonius, K., Smykal, P., & Schulman, A. H. (2010). iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. *Theoretical and Applied Genetics*. (121)1419-1430.

Kalendar R., Muterko A., Boronnikova S. (2021) Retrotransposable elements: DNA fingerprinting and the assessment of genetic diversity. In: Besse P. (ed), Molecular plant taxonomy. *Methods in Molecular Biology* New York, NY, Springer.(2222):263-286.

Keller L.F., & Waller D.M. (2002) Inbreeding effects in wild populations. Trends *Ecology and Evolution*. 17:230-24.

Keidar, D.; Doron, C.; Kashkush, K. (2018) Genome-wide analysis of a recently active retrotransposon, Au SINE, in wheat: Content, distribution within subgenomes and chromosomes, and gene associations. *Plant Cell Reports* 37:193-208

Khang, N.H.M., Quang, N.T., Mai, H.N.X. (2022) Genetic characterization of coconut (*Cocos nucifera* L.) varieties conserved in Vietnam through SCoT marker-based polymorphisms. *Genetic Resources and Crop Evolution* (69):385-398.

Khoury, C. K., Brush, S., Costich, D. E., Curry, H. A., De Haan, S., Engels, J. M., & Thormann, I. (2022). Crop genetic erosion: understanding and responding to loss of crop diversity. *New Phytologist*.233(1), 84-118.

Khodaee, L., Azizinezhad, R., Etminan, A.R. et al. Assessment of genetic diversity among Iranian Aegilops triuncialis accessions using ISSR, SCoT, and CBDP markers. (2021) *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 19(5): 1-9.

Kristensen, T. N., Sorensen A. C., Sorensen D., Pedersen K. S., Sorensen J G., Loeschcke V. (2005) A test of quantitative genetic theory using *Drosophila*-effects of inbreeding and rate of inbreeding on heritabilities and variance components, *Journal of Evolutionary Biology*. 18(4):763-770.

Kemekawa N, Ohtsubo H, Horiuchi T, Ohtsubo E. (1999) Identification and characterization of new gypsy-type retrotransposons in rice. *Molecular Genetics and Genomics* (260):593-602.

Kirk H., Freeland J.R. (2011) Applications and implications of neutral versus non-neutral markers in molecular ecology. *International Journal of Molecular Sciences*. 12(6):3966-88.

Klimova, A.; Ruiz Mondragón, K.Y.; Molina Freaner, F.; Aguirre-Planter, E.; Eguiarte, L.E. (2022). Genomic Analyses of Wild and Cultivated Bacanora Agave (*Agave angustifolia* var. *pacifica*) Reveal Inbreeding, Few Signs of Cultivation History and Shallow Population Structure plants. (11) 1426.

Khoury, C. K., Brush, S., Costich, D. E., Curry, H. A., De Haan, S., Engels, J. M., & Thormann, I. (2022). Crop genetic erosion: understanding and responding to loss of crop diversity. New Phytologist, 233(1), 84-118.

Kumar J., & Agrawal V. (2019) Assessment of genetic diversity, population structure and sex identification in dioecious crop, *Trichosanthes dioica* empoying ISSR, Scot y SRAP markers. Check for updates, *Heliyon*, Elsevier. 5:1-25.

Lapina, L., Grauda., D., & Rashal., I. (2012). Using retrotransposon-based molecular markers for analysis of genetic variability in Latvian populations of alfalfa. Acta Biologica Universitatis Daugavpiliensis, 12(1):84-87.

Lande, R. & Schemske, D. W. (1985) The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. I. Genetic models. *Evolution* 39: 24-40.

Lee, J.; Waminal, N.E.; Choi, H.-I.; Perumal, S.; Lee, S.-C.; Nguyen, V.B.; Jang, W.; Kim, N.-H.; Gao, L.-Z.; Yang, T.-J. (2017). Rapid amplification of four retrotransposon families promoted speciation and genome size expansion in the genus *Panax*. *Scientific Reports*. *7*:9045

Lobo C.S. (2010) Plantas de uso artesanal en Costa Rica. Museo Nacional de Costa Rica, San José. Pp.60.

Lombardi, M., Materne, M., Cogan, N. O. I., Rodda, M., Daetwyler, H. D., Slater, A. T., et al. (2014). Assessment of genetic variation within a global collection of lentil (Lens culinaris Medik.) cultivars and landraces using SNP markers. *BMC Genet*. 15:150.

Lopp, J., Sammul, M. (2017). Benefits of clonal propagation: impact of imported assimilates from connected ramets. *Plant Ecology*. 217: 315-329.

López, C., Shanley, P., Cuba Cronkleton, M. (2006). Riquezas del bosque: frutas, remedios y artesanías en América Latina. *Center for International Forestry* Research (CIFOR), Santa Cruz, Bolivia. Pp.53-55.

Loveless M.D., Hamrick J.L. (1984) Ecological Determinants of Genetic Structure in Plant Populations. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 15(1):65-95.

Luikart G., England P.R., Tallmon D., Jordan S., Taberlet P. (2003) The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing. *Nature Reviews Genetics* 4(12): 98-194.

Magige, E.A.; Fan, P.Z.; Wambulwa, M.C.; Milne, R.,Wu, Z.Y.; Luo, Y.H.; Khan, R.; Wu, H.Y.; Qi, H.L.; Zhu, G.F., (2022) Genetic Diversity and Structure of Persian Walnut (*Juglans regia* L.) in Pakistan: Implications for Conservation. *Plants*. 11:1652.

Meerow, A. W., Wisser, R.J., Brown, J.S., Kuhn, D. N., Schnell, R.J., Broschat, K. (2003) Analysis of genetic diversity and population structure within Florida coconut (*Cocos nucif*era L.) germplasm using microsatellite DNA, with special emphasis on the Fiji dwarf cultivar *Theoretical and Applied Genetics* 106:715-726.

McKey D., Elias M., Pujol B., Duputié A. (2010) The evolutionary ecology of clonally propagated domesticated plants. *The New Phytologist* 186 (2):318-332

Michael TP, Jackson S. The first 50 plant genomes. *Plant Genome*. 2013: 6

Michael TP. (2014) Plant genome size variation: bloating and purging DNA. *Brief Funct Genomics*. 13:308-317.

Moo-Huchin, V., Pérez-Pacheco E., Ríos-Soberanis C., Bello-Pérez L., Cervantes-Uc, J., Dzul-Cervantes, M. & Estrada-León, R. (2019). Extraction and characterization of

natural cellulosic fiber from Jipijapa (*Carludovica palmata*). *Chiang Mai Journal Science*. 46(3):579-591

Muñoz A.M. y Tuberquia D.M (1999) Estudio preliminar para el manejo sostenible de *Carludovica palmata* R. y P. como materia prima en la prodcución de papel artesanal en Cabo Corrientes, Choco,Colombia.Actual biol.Departamento de biología, Universidad de Antioquia 21(71):87-96.

Nadeem, M. A., Nawaz, M. A., Shahid, M. Q., Doğan, Y., Comertpay, G., Yıldız, M., & Baloch, F. S. (2018). DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 32(2):261-285

Natural Resources Conservarion Service. (2019) Plants database. *Carludovica palmata* Ruiz and Pavon. tomado 2019.

https://plants.sc.egov.usda.gov/core/profile?symbol = CAPA65.

Nei, M. and Li, W.H. (1979) Mathematical Model for Studying Genetic Variation in Terms of Restriction Endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (76):5269-5273.

Nei M., Maruyama T., Chakraborty R.(1975) The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution*. (29):1-10.

Nei, M., Roychoudhury, A.K., (1974) Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics* 76: 379-390.

Nie, Q., Qiao, G., Peng, L., & Wen, X. (2019) Transcriptional activation of long terminal repeat retrotransposon sequences in the genome of pitaya under abiotic stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 135:460-468.

Orozco-Arias, S., Isaza, G., Guyot, R. and Tabares-Soto, R. (2019) A systematic review of the application of machine learning in the detection and classification of transposable elements. *Peer J*. 7:83-111

Ortega-Haas, J. (2013) Fenología y manejo de la palma de Jipi en la comunidad de Santa Cruz Ex-Hacienda, Calkiní, Campeche, México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Campeche. Pp.127.

Ortega-Haas J. (2016) Efecto del abono orgánico e inorgánico en el crecimiento de la palma de Jipi (*Carludovica palmata* Ruiz & Pavón) en el norte de Campeche, México. ECOSUR. Tesis de maestría. Pp.10.

Ortiz R., Reslow F., Cuevas J., Crossa J. (2022). Genetic gains in potato breeding as measured by field testing of cultivars released during the last 200 years in the Nordic Region of Europe.*The Journal of Agricultural Science*.;160(5):310-316.

Otero-Arnaiz A, de la Cruz M, Oyama K. (1997) El uso de los RAPDs como marcadores moleculares en plantas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 60: 85-117.

Omayio, D., Mzungu, E., & Kakamega, K. (2019). Modification of shannon-wiener diversity index towards quantitative estimation of environmental wellness and biodiversity levels under a non-comparative Scenario. *Journal of Environment and Earth Science*. 9(9): 46-5.

Pérez-Pereira, N., Caballero, A., & García-Dorado, A. (2022). Reviewing the consequences of genetic purging on the success of rescue programs. *Conservation Genetics*, 23 (1):1-17.

Petit RJ, Excoffier L. (2009) Gene flow and species delimitation. *Trends in Ecology and Evolution*. 24(7):386-93.

Petit R.J., ElMousadik A., Pons O. (1998) Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology*. 12(4):844-855.

Peery M.Z., Kirby R., Reid B.N., Reid B.N., Stoelting R., Elenadoucet-Beer., Stacie Robinson S, Vasquez-Carrillo C., N.Pauli J., And Per J. Palsboll. (2012) Reliability of genetic bottleneck tests for detecting recent population declines. *Molecular Ecology* (21):3403-3418.

Piegu B., Guyot R., Picault N., Roulin A, Saniyal A, Kim H, Collura K, Brar DS, Jackson S, Wing RA, Panaud O (2006) Doubling genome size without polyploidization: dynamics of retrotransposition-driven genomic expansions in *Oryza australiensis*, a wild relative of rice. *Genome Research*. (16):1262-1269.

Piñero, D., Barahona A., Eguiarte L., Rocha Olivares, A., Salas Lizana (2010). En Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México. (14): 412-423.

Quesneville, H. (2020) Twenty years of transposable element analysis in the Arabidopsis thaliana genome. *Mobile DNA*. Pp.11-28.

Ramakrishnan, M., Papolu, P.K., Mullasseri, S. Zhou M., Sharma A., Ahmad Z., Satheesh V., Kalendar R., Wei Q. (2023) The role of LTR retrotransposons in plant genetic engineering: how to control their transposition in the genome. *Plant Cell Reports*. 42:3-15.

Reif, J. C., Zhang, P., Dreisigacker, S., Warburton, M. L., Van Ginkel, M., Hoisington, D., & Melchinger, A. E. (2005). Wheat genetic diversity trends during domestication and breeding.*Theoretical and Applied Genetics*. (110) 859-864

Reslow F., Carson- Nilson., Crossa J., Cuevas J., Ortiz R. (2022) Public potato breeding progress for the Nordic Region of Europe: evidence from multisite testing of selected breeding clones and available released cultivars.*Acta Agriculturae Scandinavica.* Section B. *Soil and Plant Science*. 72: 553-562

Rios, K., (2007) Estrategias para el rescate e impulso del sombrero de paja toquilla, *Cardulovica palmata*, Editor José Sánchez Posligua. Quito-Ecuador.

Saboori S., Noormohammadi Z., Sheidai M., Marashi S. (2019). SCoT Molecular markers and genetic figerprintting of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars. *Genetic Resour Crop Evol*: 1-10.

Sajo, M. G., Lombardi, J. A., Forzza, R. C., and Rudall, P. J. (2014) Comparative Anatomy of reproductive Structures in *Cyclanthaceae* (Pandanales). *International Journal of Plant Sciences*, 175 (7): 814-827.

Sathapondecha, P., Boonsermsukchareon, L., & Whankeaw, S. (2021). Comparison of multiplex PCR kits for SCoT and SRAP genotyping in plants. *Plant Genetic Resources*.19(1):29-34

Schemske, D. W., & Lande, R. (1985). The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. II. Empirical observations. *Evolution.* 39(1): 41-52.

Shirasu, K., Schulman, A. H., Lahaye, T., and Schulze-Lefert, P. (2000)A contiguous 66-kb barley DNA sequence provides evidence for reversible genome expansion. *Genome Research* 10 (7): 908-915.

Serrote, C. M. L., Reiniger, L. R. S., Silva, K. B., dos Santos Rabaiolli, S. M., & Stefanel, C. M. (2020). Determining the Polymorphism Information Content of a molecular marker. *Gene*, (726): 144175.

Soto-Gomez M. (2020). Phylogenomic studies of the monocot sister orders Pandanales and Dioscoreales. The University of British Columbia, Vancouver Pp:1-372.

Stanton D.W., Frandsen P., Waples R.K., Heller R., Russo I-RM., Orozco-terWengel P.A. (2019) More grist for the mill? Species delimitation in the genomic era and its implications for conservation. *Conservation Genetics*. 20 (1):101-113.

Stuefer, J.F., Erschbamer, B., Huber, H., & Suzuki, J.I. (2002). The ecology and evolutionary biology of clonal plants: an introduction to the proceedings of Clone-2000. In Ecology and Evolutionary Biology of Clonal Plants: Proceedings of Clone-2000. *Springer Netherlands*. Pp1-8.

Sun, W., & Ren, C. (2021). The impact of energy consumption structure on China's carbon emissions: Taking the Shannon Wiener index as a new indicator. *Energy Reports*, 7: 2605-2614.

Orozco-Arias, S., Isaza, G., Guyot, R. and Tabares-Soto, R. (2019). A systematic review of the application of machine learning in the detection and classification of transposable elements*. Peer Journals* (7):83-111.

Tanksley, S. (1983) Molecular markers in plant breeding. *Plant Molecular Biology Reporter* (1): 3-8.

Tanksley, S. D., & McCouch, S. R. (1997). Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. *Science*. 277(5329):1063-1066.

Teichert, H. (2008) Pollination biology of cantharophilous and melittophilous Annonaceae and *Cyclanthaceae* in French Guiana. Fakultät der Naturwissenschaften der Universität Ulm. Pp. 81-97

Teo-How Ch., Tan S. He., Ho Ling Ch., Faridah Z. Qa., Othman R. Y., Heslop-Harrison, and Schulman H. A. (2005) Genome Constitution and Classification using Retrotransposon Based Marker in the Orphan Crop Banana. *Journal of Plant Biology.* 48(1): 96-105.

Tomlinson, P. and Wilder, J. (1984) Systematic anatomy of *Cyclanthaceae* Monocotyledoneae)- an overview. *Botanical Gazette*, 145(4): 535-549.

Tuberquia Muñoz DJ., Caracterización Taxonómica ecológica y Etnobotánica, de las especies de la familia *Cyclanthaceae* en la Jurisdicción de Corantioquía. Informe final, Medellín, Colombia (2007). Pp 15-20.

Ulijaszek, S.J., Mann, N., Elton, S. (2012) Evolving Human Nutrition: Implications for Public Health, Cambridge University Press, Cambridge. 64: 2-416

Ustyantsev K., Novikova O., Blinov A., Smyshlyaev G. (2015) Convergent evolution of ribonuclease h in LTR retrotransposons and retroviruses*. Molecular Biology and Evolution*. 32(5):1197-1207.

Van Ginkel, M., & Flipphi, R. C. H. (2020). Why Self-fertilizing Plants Still Exist in Wild Populations: Diversity Assurance through Stress-Induced Male Sterility May Promote Selective Outcrossing and Recombination. *Agronomy*, 10(3), 349. https://doi.org/10.3390/agronomy10030349

Vekemans X. (2002) AFLP-SURV version 1.0. A program for genetic diversity analysis with AFLP (and RAPD) population data. Plant Ecology Genetics Laboratory. Libre the Bruxelles, Belgium. Pp. 1-15

Wang, L., Beissinger, T. M., Lorant, A., Ross-Ibarra, C., Ross-Ibarra, J., & Hufford, M. B. (2017) The interplay of demography and selection during maize domestication and expansion. *Genome Biology*, 18, 215.

Wicker, T., Schulman, A. H., Tanskanen, J., Spannagl, M., Twardziok, S., Mascher, M., ... & Gundlach, H. (2017). The repetitive landscape of the 5100 Mbp barley genome. *Mobile DNA*, 8: 1-16.

Wilder, G. (1988). Inflorescence position as a taxonomic character in the *Cyclanthaceae*. *Botanical Gazette*, 149 (1):110-115.

White, O. W., Biswas, M. K., Abebe, W. M., Dussert, Y., Kebede, F., Nichols, R. A., & Borrell, J. S. (2023). Maintenance and expansion of genetic and trait variation following domestication in a clonal crop. *Molecular Ecology*. 32(15):4165-4180.

Wright, S. (1977) Evolution and the Genetics of Populations vol. 3, Experimental Results and Evolutionary Deductions. University of Chicago Press, Chicago.

Wright, S. I., Lauga, B. & Charlesworth, D. (2002) Rates and patterns of molecular evolution in inbred and outbred *Arabidopsis*. *Molecular Biology and Evolution*. 19: 1407-1420.

Woodrow, P., Pontecorvo, G., Fantaccione, S., Fuggi, A., Kafantaris, I., Parisi, D., & Carillo, P. (2010). Polymorphism of a new Ty1-copia retrotransposon in durum wheat under salt and light stresses.*Theoretical and Applied genetics*. 121: 311-322.

Xiao J. H., Grandillo S., Ahn S. N., McCouch S. R., Tanksley S. D., Li J., Yuan L. (1996). Nature. 384: 223-224

Yang, S., Xue, S., Kang, W., Qian, Z., & Yi, Z. (2019) Genetic diversity and population structure of *Miscanthus lutarioriparius*, an endemic plant of China. *PLOS ONE.* 14(2):0211471.

You WH., Yu D., Xie D., Han CM, Liu CH. (2014). The invasive plant *Alternanthera philoxeroides* benefits from clonal integration in response to defoliation. *Flora* 209: 666-673.

Zhao, D., Ferguson, A.A., Jiang, N. (2016) What makes up plant genomes: The vanishing line between transposable elements and genes (BBA) *Gene Regulatory Mechanisms*. 1859(2): 366-380.

Zhang H., Tang S., Schnable J.C., He Q., Gao Y., Luo M., Jia G., Feng B., Zhi H., Diao X. (2021) Genome-Wide DNA Polymorphism Analysis and Molecular Marker Development for the Setaria italica Variety "SSR41" and Positional Cloning of the Setaria White Leaf Sheath Gene SiWLS1. *Frontiers in Plant Science*. 12: 743782.

ANEXOS

Anexo. 1 Protocolo de extracción de ADN de tejidos de cocotero e insecto utilizando el buffer CTAB.

1.- Se inicia con el pesado de 1 o 0.5 g de tejido (hoja o viruta del tronco) de cada muestra se pulveriza en nitrógeno líquido, con la ayuda de un mortero y pistilo.

2.- Al tejido pulverizado se le adiciona 5 mL del buffer CTAB previamente calentado a 65°C.

Nota: Al buffer CTAB antes de usar hay que adicionarle 1 microlitro de antioxidante (beta mercaptoetanol o monotiolglicerol) por cada mililitro de CTAB. Para *C. palmata* usamos monotiolglicerol para evitar fenolización del tejido (se usó el monotiolglicerol).

3.-Posteriormente, las muestras se homogenizan e incuban durante 15 a 30 min a 65 °C en el termobloque/baño seco.

4.- Después de la incubación, se le añade una mezcla (1:1) volumen de Fenol: Cloroformo: Alcohol isoamílico (25:24:1) (v/v), se mezcla por inversión, se centrifuga a 14,000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente.

5.- Se recupera la fase superior o acuosa y se transfiere a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL, se le añade 0.6 volumen de isopropanol frío y 0.1 volumen de acetato de sodio 3M, pH +5.2, se mezcla suavemente por inversión e incuba durante 60 min a -20 °C.

6.- Posteriormente se realiza una centrifugación a 14,000 rpm durante 10 min a 4 °C.

7.- Una vez formada la pastilla se lava con 0.5 mL de etanol al 70 % frío y se centrifuga de nuevo a 7500 rpm durante 5 min a temperatura ambiente para eliminar el excedente de etanol.

8.- Finalmente, la pastilla se resuspende en 50-100 µlde agua ultrapura.

Anexo. 2 Confirmación de ADN en muestras en *C. palmata*

Como resultados obtuvimos ADN de calidad indicando que el protocolo para CTAB descrito para cocotero es reproducible para muestras de plantas *C. palmata* de diferentes edades, condiciones de plantas y origen (*in vitro* o rizoma). La **Figura 17** muestra un gel de agarosa al 1% con las muestras de DNA de *C. palmata* a partir de hoja joven, a una concentración de 50 µg/mL. En todas las muestras se obtuvo ADN de buena calidad. Únicamente la muestra en el carril 13 se ve de menor concentración.

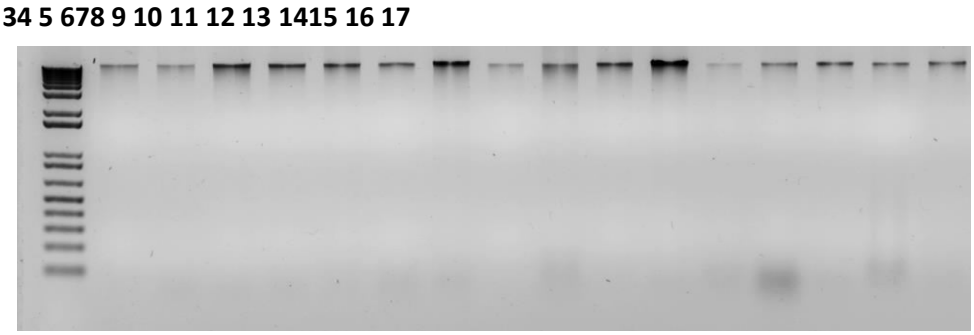


Figura 17. Gel de agarosa al 1%, con muestras de ADN a 50 µg/µL, (1:10.7, 2:11.13, 3:12.3, 4: 13.8, 5: 14.7, 6: 15.5, 7: 16.3, 8:17.7, 9:18.7, 10:19.8, 11: 21.5, 12: 20.6; 13: 22.7, 14: 23.5, 15: 24.7, 16:25.11 y 17: 26.3). Condiciones: gel de agarosa al 1%, desarrollado a 90V por 30 min Teñido con 1 μL de bromuro de etidio.

Anexo 3. Estandarización de los marcadores IRAP.

Para evaluar la reproducibilidad del programa de amplificación de PCR usando los marcadores IRAP, se repitieron las condiciones usando los marcadores NIKITA y SUKKULA, mediante las mismas condiciones, los resultados fueron los mismos. El mismo perfil monomórfico en NIKITA en 5000 pb y 6000 pb a excepción del carril 8 donde se observó degradación, el marcador SUKKULA mostro el mismo perfil monomórfico de 4000 pb en las siete muestras, y en 2000 pb, en la muestra cuatro se vio la ausencia de banda (indicando un posible polimorfismo). De esta forma para los marcadores IRAP queda estandarizada tanto para NIKITA y SUKKULA, esto indica que en *C. palmata* estos dos retrotransposones se encuentran conservados **Figura 18.** La reproducibilidad de los marcadores moleculares, consistió repetir las mismas condiciones de PCR.

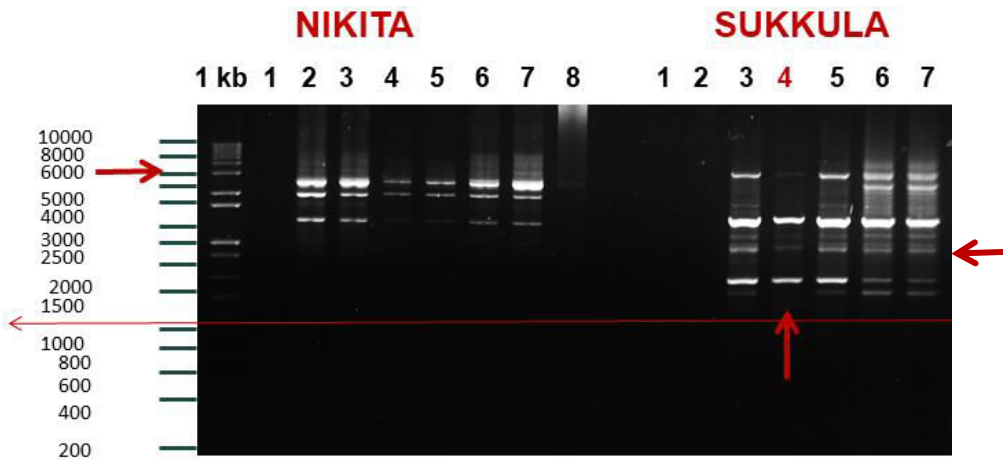


Figura 18. Amplicones de las líneas a partir de semillas de *C. palmata*. Del **carril: 1 al 7** representan las líneas. El marcador molecular NIKITA: 1 al 7, y los otros **1 al 7** representan al marcador molecular SUKKULA con siete muestras de ADN (1:10.7, 2:12.3, 14.7, 4:15.5: 17.7, 6: 19.3 y 7:28.3. **Condiciones**: gel de agarosa al 2%, desarrollado a 90V por 60 min. (Marcador de peso molecular 1 Kb). Teñido con 1 μL de bromuro de etidio. **El carril 8:** representa (ADN jipi BT).

Anexo. 4. Estandarización de los marcadores SCoT

Se probaron cinco marcadores SCoT; SCoT-1, SCoT-2, SCoT-4, SCoT-5, SCoT-6, utilizando siete muestras de ADN de líneas de *C. palmata* a partir de semillas **Cuadro 12**. Las condiciones de amplificación descrita en la sección de materiales y métodos**.** Las muestras con el ADN diluido a 50 µg/ µL, y un control negativo (agua ultrapura).

Cuadro 12. Lista de ADN (marcadores SCoT).

Muestra (líneas a partir de semillas)
1.- S 10.7
2.-S 12.3
3.-S 14.7
4.- S 15.5
5.- S 17.7
6.- S 19.3
7.- Control negativo (-C)

En la **Figura 19**, se identificaron bandas monomórficas de un tamaño de 6000 pb y 650 pb. El SCoT-1, en el carril 1, muestra una banda polimórfica cercana a 1000 pb, en los demás carriles se ven bandas monomórficas, el SCoT-2, mostró la usencia de banda en la muestra del carril 1, en los demás carriles fueron bandas monomórficas. El SCoT-4 mostró un patrón de bandas monomórficas en todos los casos, solamente se veían bandas tenues en la posición 850 pb y 650 pb.

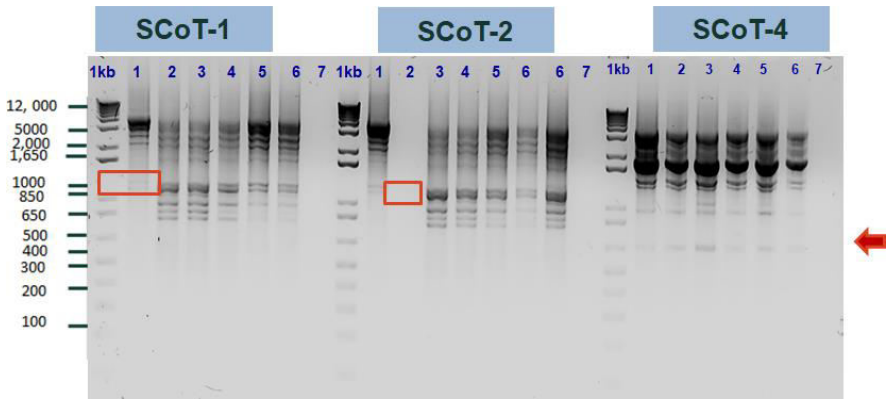


Figura 19. Amplicones de muestras de ADN de *C. palmata*, carril: 1 al 6 representan las líneas a partir de semillas con el marcador SCoT-1, SCoT-2, SCoT-4. Condiciones: gel de agarosa al 1.5 %, desarrollado a 75 V por 90 min. (MPM: 1 Kb; Invitrogen®), teñido con 1 ***µ***L de bromuro de etidio.

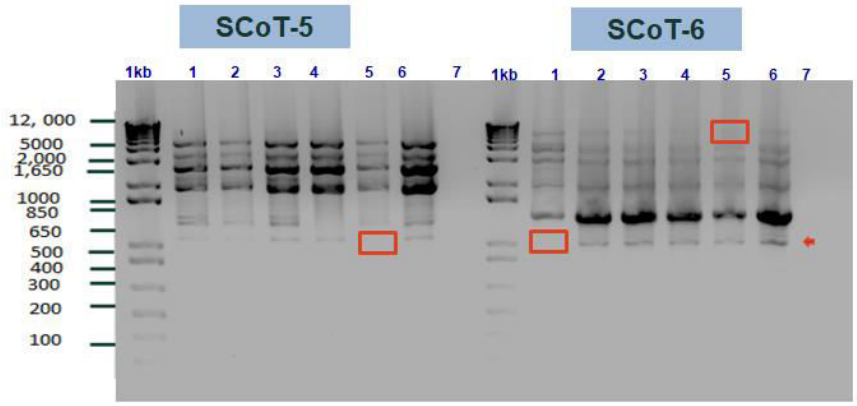


Figura 20. Amplicones de muestras de ADN de *C. palmata*. Carril: 1 al 6 representan las líneas a partir de semillas con el marcador SCoT-5, y SCoT-6. Condiciones: gel de agarosa al 1.5 %, desarrollado a 75 V por 90 min. (MPM: 1 Kb; Invitrogen®), teñido con 1 μL de bromuro de etidio.

Anexo. 5. Identificación morfológica de líneas con polimorfismo

El **Cuadro 13**, representa el total de líneas diferentes (polimorfismo)

usando el marcador SUKKULA en las 28 muestras de las líneas a partir de semillas de *C. palmata*. Como se puede observar, todas, a excepción de las líneas **LS13.8** y **LS47.6** mostraron estípulas ligeramente apreciables, mientras que cuatro de las líneas mostraron ausencia de ellas, al parecer las líneas que presentaron polimorfismo son menos altas a diferencia de las líneas que presentaron monomorfismo.

Cuadro 13. Son líneas de *C. palmata* que presentaron polimorfismo con el marcador SUKKULA.

N° de muestra	Línea clonal	Lámina			Peciolo		Coloración en la base	Presencia de estípulas	Polimórfica
		Largo	Ancho	N° de bordes	Largo	Ancho			
1	**12.3**	50cm	30 cm	16-18	62 cm	0.8 cm	X	X	
2	**13.8**	53 cm	40 cm	17-19	92 cm	0.1 cm	X	SI (ligeramente visible)	
3	**18.7**	42 cm	30 cm	10-12	80 cm	0.9 cm	X	X	
4	**21.5**	39 cm	33 cm	17-18	82 cm	0.8 cm	X	X	
5	**22.7**	48 cm	38 cm	20-21	97 cm	1 cm	X	X	
6	**47.6**	34 cm	26 cm	20-22	49 cm	0.7 cm	X	SI (ligeramente visible)	

** **X: Ausencia**; el **color rojo**: indica que todas resultaron polimórficas usando el marcador SUKKULA.

Anexo. 6 Identificación de líneas monomórficas

El **Cuadro 14**, representa a cinco líneas con característica similar (homomorfismo), de líneas de plantas a partir de semillas de *C. palmata*, usando el marcador SUKKULA, los

resultados obtenidos indican que fenotípicamente todas las monomórficas son altas, sus láminas son menos grandes, todas presentan estípulas una característica interesante y que es fácil de identificar en campo, en ninguno de los casos se observó coloración en la base de los individuos.

Cuadro 14. Líneas de *C. palmata* que presentaron monomorfismo con el marcador SUKKULA.

N° de muestra	Línea clonal	Lámina			Peciolo		Coloración en la base	Presencia de estípulas	Monomórficas
		Largo	Ancho	N° de bordes	Largo	Ancho			
1	**14.7**	44cm	25 cm	17-18	72 cm	0.6 cm	X	SI	
2	**26.3**	45 cm	26 cm	22-24	90 cm	0.8 cm	X	SI	
3	**27.7**	27 cm	22 cm	11-11	76 cm	0.8 cm	X	SI	
4	**30.6**	48 cm	25 cm	25-25	71 cm	1.2 cm	X	SI	
5	**41.7**	47 cm	35 cm	18-21	89 cm	1.1 cm	X	SI	

** **X: presencia;** el **color verde:** indica que todas resultaron monomórficas usando el marcador SUKKULA.

Anexo. 7. Características morfológicas en líneas de plantas de *C. palmata* con el marcador SUKKULA.

Figura 21. Líneas de *C. palmata* que mostraron polimorfismo usando el marcador SUKKULA la mayoría presentó ausencia de estípulas A) **L12.3**, B) **L13.8**, C) **L18.7**, D) **L21.5**, E) **L22.7**, H) **L47.6**.

La **Figura 21**, demuestra a las seis líneas que mostraron características polimórficas usando el marcador SUKKULA, las líneas **13.8**, **22.7** y **47.6** presentaron láminas foliares más suaves y delgadas, mientras que las líneas **18.7** y **47.6** fueron enanas, de las seis líneas seleccionadas con el marcador solamente la línea **18.7** presentó ligeramente estipulas, las líneas **12.3**, **13.8**, **21.5**, **22.7** y **47.6** mostraron ausencia de estípulas, sugiriendo que SUKKULA podría funcionar como un marcador de selección en campo. También se tomaron cinco plantas de las cuales presentaron características muy similares

con bandas monomórficas, en la **Figura 22**, evidencia a cinco líneas que presentaron bandas monomórficas usando el marcador SUKKULA, el **Cuadro 14**, describe que estas líneas de plantas fueron más homogéneas, fueron más altas, todas presentaron estípulas, otras de sus características morfológicas fueron sus láminas foliares más gruesas.

Figura 22. Líneas de *C. palmata*, que mostraron homomorfismo usando el marcador SUKKULA todas presentaron estípulas, sus láminas gruesas y alturas homogéneas A) **L14.7**, B) **L 26.3**, C) **L27.7**, D) **L30.6**, E) **L22.7**, H) **L41.7**.

Anexo. 8 Confirmación del ADN en muestras en *C. palmata* vía rizoma

Se realizaron las extracciones de tejido de hoja en cinco sitios de muestreo. Como resultados obtuvimos el ADN, para ello se usó el mismo protocolo de extracción de ácidos nucleicos, método CTAB, descrito para cocotero. La **Figura 23** muestra un gel de agarosa al 1% con las muestras de DNA de *C. palmata*, a partir de hoja joven vía rizoma, a una concentración de 5 µL de muestra. En todas las muestras se obtuvo ADN. Para la eliminación de ese barrido, se procedió a lavarlo de nuevo con etanol al 96% y la incubación a -20 por una noche, falta la corrida a 50 µg/uL y visualización en gel de agarosa.

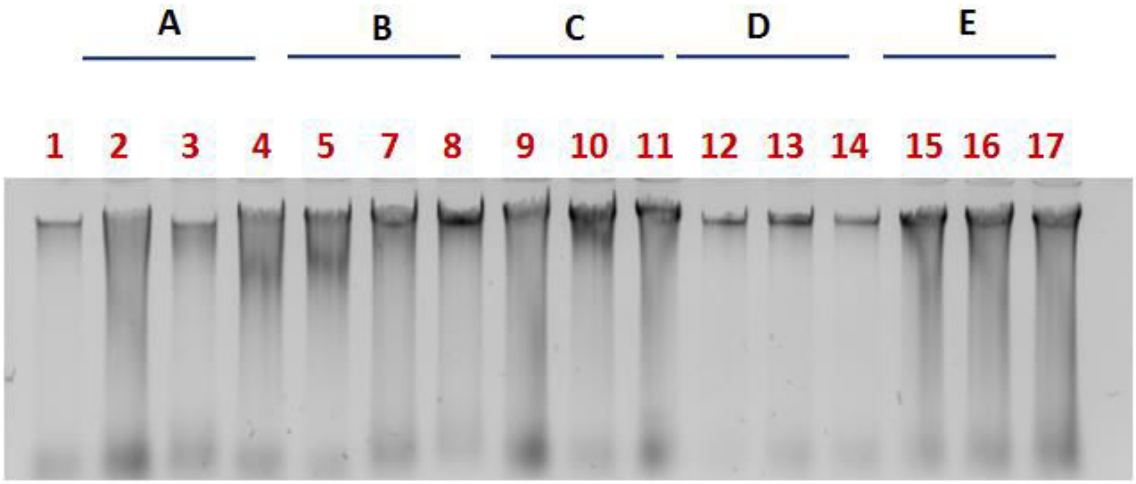


Figura 22. Gel de agarosa al 1%, con muestras de ADN. Condiciones: gel de agarosa al 1%, desarrollado a 90V por 30 min Teñido con 0.8 μL de bromuro de etidio.

Anexo. 9. Cuadro comparativo de estudios realizados en *Carludovica.*

Especie	Proceso de regeneración (Zona meristemática basal)	Germinación por semillas	Aclimatación casa sombra	Extracción de ADN	Estudios de variación genética	Uso de marcadores moleculares
C. palmata	Si	Hay plántulas en condiciones *in vitro* y en el cuarto de fisiología (en bolsas)	Si hay una línea clonal (APJ-X1)	*	No se ha probado	En proceso
C. drudei	En proceso	Si hay en el cuarto de fisiología		*	*	*
Referencia	Chan, 2019	Bacab Caamal, 2019	Laboratorio 26			Chi Chi, 2022

En *C. palmata*

*Hay una línea clonal denominada (APJ-X1), se tienen plántulas en condiciones *in vitro,* en el cuarto de fisiología hay plantas en bolsas, en invernadero.

*hay plantas y 100 individuos adaptados en campo.

*Se tienen semillas viables.

*Hay plantas provenientes de semillas en el cuarto de fisiología en bolsa y plantas en condiciones *in vitro*.

Anexo. 10. Clasificación taxonómica de *Carludovica*

Carludovica palmata	
Reino	*Plantae*
División	*Tracheophyta*
Clase	*Liliopsida*
Orden	*Pandanales*
Familia	*Cyclanthaceae*
Género	*Carludovica*
Especie	*Palmata*
Nombre científico	*Carludovica palmata* Ruiz & Pavón.

Anexo. 12. Diversidad genética en plantas a partir de rizoma

Se corroboró la diferenciación genética utilizando el marcador molecular SUKKULA, para demostrar la diferenciación genética de *C. palmata* en el interior del casco de Santa Cruz, Ex hacienda con dos marcadores moleculares IRAP (**SUKKULA** y **3'LTR**), la prueba consistió en muestrear 24 individuos de *C. palmata* dentro del casco de Santa Cruz, Ex hacienda. La **Figura 15**, demuestra diferentes bandas de aproximadamente 700 pb, 1000 pb y 1300 pb, y demuestran que la diferencia genética interespecífica en plantas a partir de rizoma. La evaluación del polimorfismo en las muestras (**H1**, **H3**) y **(H4** y **H5**), identificamos alelos nulos por la ausencia de bandas. Estas diferencias genéticas entre los individuos cercanos, podría estar inducidas por mutaciones somáticas, y aunque provienen de rizomas y del mismo sitio demuestra que existen loci diferentes, o que desde un principio provenían de diferentes genotipos.

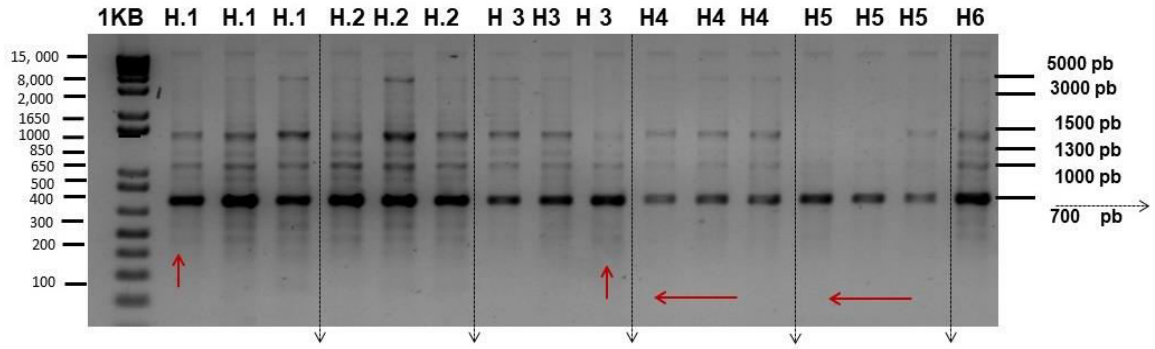


Figura. 1. Variación genética de plantas de propagación por rizoma en el interior de la hacienda, con el marcador molecular SUKKULA. Las condiciones: 75 V, 70 min en 1.5 % de agarosa. Marcador de peso molecular 1KB Plus Ladder Invitrogen, bromuro de etidio 0.8 µ L. y 2 µ L 6X DNA Loading Dye, Thermo Scientific. Los (**H1-H6**): grupos de individuos muestreados. **H1**: muestras de hacienda 1. **H6;** muestras de hacienda 6

4.2.1 Determinación de la variación genética en rizoma con 3'LTR

En un segundo muestreo se tomaron muestras de 24 individuos de *C. palmata* dentro del casco de Santa Cruz, Ex hacienda y se corroboraron con el marcador 3'LTR para la determinación de loci polimórfico. En los resultados con el marcador molecular 3'LTR, **Figura 16**, demuestra diferentes loci polimórfico de aproximadamente 650 pb, 1000 pb y 1300 pb,1500 pb, demuestra una diferenciación genética interespecífica en plantas a partir de rizoma. En el grupo **H.1** dos presentan monomorfismo, mientras que la tercera planta **H.1**, muestra mayor número de loci polimórfico y es similar al **H5** que está marcado con rojo, los **H.2** muestran monomorfismo y uno de ellos presenta alelos nulos, mientras que los **H.3 Y H.4** presentan monomorfismo, un **H.4** que es similar al **H.3** y al **H5**. Por tanto, genéticamente los individuos muestreados son similares en el interior de la hacienda, pero están mostrando polimorfismo con 3' LTR.

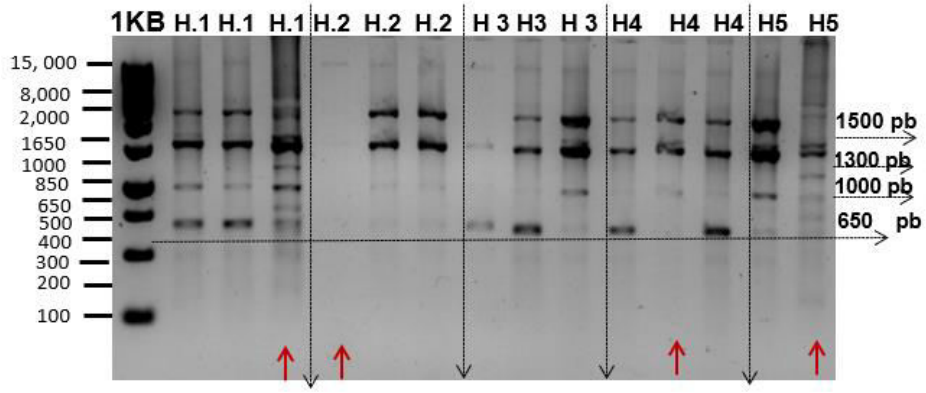


Figura. 2. Variación genética de plantas de propagación por rizomas en el interior de la hacienda, con el marcador molecular 3'LTR**.** Las condiciones: 75 V, 70 min en 1.5 % de agarosa. Marcador de peso molecular 1KB Plus Ladder Invitrogen, bromuro de etidio 0.8 µ L. y 2 µ L 6X DNA Loading Dye, Thermo Scientific. Los (**H1-H5**): grupos de individuos muestreados. **H1**: muestras de hacienda **1. H5**; muestras de hacienda **5**. Las flechan muestran la separación por cada grupo muestreado en una sección cercana, no en el mismo grupo de rizomas, si no en plantas cercanas.