



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE YUCATÁN

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ESTABLECIMIENTO DE MARCADORES MICROSATELITALES PARA
EL MEJORAMIENTO GENÉTICO Y LA CONSERVACIÓN DEL
GERMOPLASMA EN *Cocos nucifera* L.”**

TESIS

PRESENTADA POR:

GERARDO DANIEL RAMÍREZ TÉC

EN SU EXAMEN PROFESIONAL

EN OPCIÓN AL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

BIBLIOTECA **CICY**

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO.

2005

ÍNDICE

| | Página |
|--|--------|
| 1 INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2 ANTECEDENTES | 3 |
| 2.1 TAXONOMÍA DEL COCOTERO | 3 |
| 2.2 MORFOLÓGÍA DEL COCOTERO | 4 |
| 2.2.1 RAÍCES | 4 |
| 2.2.2 TALLO HERBÁCEO | 4 |
| 2.2.3 HOJAS | 4 |
| 2.2.4 INFLORESCENCIA Y FLORES | 5 |
| 2.2.5 FRUTOS | 6 |
| 2.3 ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN | 6 |
| 2.4 VARIEDADES DE COCOTERO | 7 |
| 2.4.1 COCOTEROS ALTOS | 7 |
| 2.4.1.1 COCOTERO ALTO ATLÁNTICO (<i>Niu Kafa</i>) | 8 |
| 2.4.1.2 COCOTERO ALTO PACÍFICO (<i>Niu Vai</i>) | 8 |
| 2.4.2 COCOTERO ENANO | 9 |
| 2.4.3 HÍBRIDOS | 9 |
| 2.4.4 TIPOS DE COCOTERO PRESENTES EN MÉXICO | 10 |
| 2.4.4.1 ECOTÍPOS ALTOS EN MÉXICO | 10 |
| 2.4.4.2 ECOTÍPOS ENANOS EN MÉXICO | 11 |
| 2.5 IMPORTANCIA ECONÓMICA | 11 |
| 2.6 PROBLEMÁTICA DEL COCOTERO | 13 |
| 2.6.1 BAJA PRODUCTIVIDAD | 13 |
| 2.6.2 SENECTUD DE LAS PLANTACIONES | 14 |
| 2.6.3 PLAGAS Y ENFERMEDADES | 14 |
| 2.6.3.1 AMARILLAMIENTO LETAL DEL COCOTERO | 15 |
| 2.7 MARCADORES MOLECULARES | 16 |
| 2.7.1 ISO-ENZIMAS | 19 |
| 2.7.2 RFLP (POLIMORFISMOS EN LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN) | 19 |
| 2.7.3 MARCADORES BASADOS EN LA PCR | 20 |
| 2.7.3.1 RAPD (ADN POLIMORFICO AMPLIFICADO AL AZAR) | 20 |

| | Página |
|--|--------|
| 2.7.3.2 AP-PCR (PCR CON OLIGONUCLEÓTIDOS ARBITRARIOS) | 21 |
| 2.7.3.3 AFLP (POLIMORFISMO DE LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS) | 22 |
| 2.7.3.4 STS (SITIOS ETIQUETADOS POR LA SECUENCIA) | 22 |
| 2.7.3.5 EST (SITIOS ETIQUETADOS POR LA EXPRESIÓN) | 23 |
| 2.7.3.6 CAPS (SECUENCIA POLIMORFICA AMPLIFICADA Y CORTADA) | 23 |
| 2.7.3.7 SCAR (REGIONES AMPLIFICADAS CARACTERIZADAS Y SECUENCIADAS) | 23 |
| 2.7.3.8 D/TGGE (GELES DE ELECTROFORESIS EN GRADIENTE DESNATURALIZANTE / TÉRMICO) | 24 |
| 2.7.3.9 ISSRs (INTER-SECUENCIAS SIMPLES REPETITIVAS) | 24 |
| 2.7.3.10 SSR (MICROSATÉLITES O SECUENCIAS SIMPLES REPETITIVAS) | 25 |
| 3 OBJETIVOS | 27 |
| 4 HIPÓTESIS | 28 |
| 5 DISEÑO EXPERIMENTAL | 29 |
| 6 MATERIALES Y MÉTODOS | 32 |
| 6.1 MATERIAL VEGETAL | 32 |
| 6.2 EXTRACCIÓN DE ADN | 32 |
| 6.3 CUANTIFICACIÓN DEL ADN POR UV (ESPECTROFOTOMETRÍA) | 33 |
| 6.4 AMPLIFICACIÓN POR PCR | 34 |
| 6.5 ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS | 35 |
| 6.6 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA | 35 |
| 6.7 TINCIÓN CON LA TÉCNICA DE NITRATO DE PLATA | 36 |
| 6.8 INTERPRETACIÓN DE BANDAS Y LECTURA DE GELES | 37 |
| 6.9 CÁLCULO DE LAS FRECUENCIAS GENOTÍPICAS Y ALELICAS | 37 |
| 6.10 ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD Y DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA | 38 |

| | Página |
|---|--------|
| 6.11 RELACIONES FILOGENÉTICAS | 38 |
| 6.12 CORRELACIÓN ENTRE DISTANCIA GENÉTICA Y MORTALIDAD AL AMARILLAMIENTO LETAL | 38 |
| 7 RESULTADOS | 39 |
| 7.1 ESTABLECIMIENTO DE LOS MARCADORES MICROSATELITALES | 39 |
| 7.2 FRECUENCIAS ALÉLICAS Y CARACTERIZACIÓN DE ECOTIPOS | 44 |
| 7.3 RIQUEZA Y DIVERSIDAD GENÉTICA | 47 |
| 7.4 RELACIONES FILOGENÉTICAS | 50 |
| 7.5 DISTANCIA GENÉTICA Y SU CORRELACIÓN CON MORTALIDAD AL AMARILLAMIENTO LETAL | 51 |
| 8 DISCUSIÓN | 54 |
| 9 CONCLUSIONES | 60 |
| APÉNDICE I Patrón de alelos observados en los ecotipo estudiados con los iniciadores utilizados. | 61 |
| Apéndice Ia Alelos observados en el ecotipo MXAT (Campeche) con los iniciadores estudiados. | 61 |
| Apéndice Ib Alelos observados en el ecotipo MXPT1 (Michoacán) con los iniciadores estudiados. | 62 |
| Apéndice Ic Alelos observados en el ecotipo MXPT2 (Colima) con los iniciadores estudiados. | 63 |
| Apéndice Id Alelos observados en el ecotipo MXPT3 (Guerrero) con los iniciadores estudiados. | 64 |
| Apéndice Ie Alelos observados en el ecotipo WAT (Alto Oeste Africano) con los iniciadores estudiados. | 65 |
| Apéndice If Alelos observados en el ecotipo RLT (Islas Rennel) con los iniciadores estudiados. | 66 |
| Apéndice Ig Alelos observados en el ecotipo TYT (Alto Polinesio) con los iniciadores estudiados. | 67 |
| Apéndice Ih Alelos observados en el ecotipo PT (Alto Panamá) con los iniciadores estudiados. | 68 |
| Apéndice Ii Alelos observados en el ecotipo MYD (Enano Malayo Amarillo) con los iniciadores estudiados. | 69 |
| APÉNDICE II Alelos observados en los ecotipos estudiados y su frecuencia alelica (%) | 70 |
| Apéndice IIa Alelos observados en el <i>locus</i> A3 y G11 y su frecuencia alelica (%) | 70 |
| Apéndice IIb Alelos observados en el <i>locus</i> C7 y E10 y su frecuencia alelica (%) | 70 |
| Apéndice IIc Alelos observados en el <i>locus</i> B12 y su frecuencia alelica (%) | 71 |

| | Página |
|--|--------|
| Apéndice II <i>d</i> Alelos observados en el <i>locus</i> F2 y su frecuencia alelica (%) | 71 |
| Apéndice II <i>e</i> Alelos observados en el <i>locus</i> H7 y su frecuencia alelica (%) | 72 |
| APÉNDICE III | 73 |
| REACTIVOS | 73 |
| SOLUCIONES | 74 |
| COLECTA DE MATERIAL VEGETAL | 76 |
| BIBLIOGRAFÍA | 77 |

RESUMEN

Cocos nucifera L. es un cultivo importante de los trópicos húmedos, representa parte de la economía de muchos países en desarrollo, pero las plantaciones de cocotero están siendo afectadas por el Amarillamiento Letal, poniendo en riesgo el trabajo y sustento de miles de familias.

El presente trabajo se enfoca a la búsqueda de marcadores moleculares microsatelitales para realizar estudios de diversidad y estructura genética en los ecotipos de cocotero mexicanos e importados. Se estudiaron cuatro ecotipos mexicanos de cocotero, caracterizados anteriormente mediante marcadores morfológicos, fisiológicos e iso-enzimáticos, y cinco ecotipos de cocotero importados de África Occidental, Islas Rennel, Tahití, Panamá y Malasia. Se establecieron siete microsatélites nucleares. El estudio mostró que la diversidad genética fue mayor en los ecotipos mexicanos de coco que en los importados ($F_{st}= 0.26$ y $F_{st}=0.21$ respectivamente). De igual manera la diversidad genética mostró valores ligeramente mayores en los ecotipos mexicanos con respecto a los importados ($h= 0.65$ y 0.60). Este resultado es similar al obtenido con el filograma en el cual se observaron dos grupos claramente separados genéticamente correspondientes a las variedades *Niu Kafa* y *Niu Vai*. De igual modo, se observó que dentro de las poblaciones mexicanas existe una diferenciación respecto a las distancias genéticas, que se pueden observar en el análisis de conglomerados realizados. A su vez se realizó una correlación de los ecotipos mexicanos y el MYD (Enano Malayo Amarillo), con los valores de distancia genética y los valores de porcentaje de mortalidad al Amarillamiento Letal del cocotero, observándose que entre menor distancia genética exista entre un ecotipo mexicano y el MYD, los valores de mortalidad serán menores. Se realizó una matriz de frecuencias alélicas, que permitió identificar marcadores genéticos que puedan ayudar a la formación de cruza entre ecotipos mexicanos y el MYD, lo cual en los programas de mejoramiento genético (clásico), es de suma importancia para avanzar en la lucha contra el Amarillamiento Letal del cocotero.