

# UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

## TESIS

MICROPROPAGACIÓN Y GENÉTICA DEL PAISAJE  
DE *Acrocomia aculeata* (Jacq. Lodd. ex Mart) EN  
CHIAPAS, CONOCIMIENTO PARA SU MANEJO

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA

**XOCHITL ESMERALDA TOLEDO ESPINOSA**

DRA. CAROLINA ORANTES GARCIA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
UNICACH  
**DIRECTORA**

DR. ALEJANDRO NETTEL HERNANZ  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
UNICACH.  
**CO-DIRECTOR**

DRA TAMARA M. RIOJA PARADELA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
UNICACH  
**ASESORA**



Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Marzo de 2014.

# ÍNDICE GENERAL

|   | PÁGINA |
|---|--------|
| ÍNDICE DE FIGURAS.....  | i      |
| ÍNDICE DE CUADROS.....  | iii    |
| RESUMEN.....  | iv     |
| I. INTRODUCCIÓN.....  | 1      |
| II. ANTECEDENTES.....   | 4      |
| 2.1. Estudios de micropropagación.....                            | 4      |
| 2.1.2. Fitoreguladores.....                                       | 9      |
| 2.1.3. Aplicaciones.....  | 11     |
| 2.2 Estudios genéticos.....                                       | 13     |
| 2.2.1. Genética del paisaje.....                                  | 13     |
| 2.2.2. Diversidad genética de <i>A. aculeata</i> .....            | 12     |
| 2.2.3. Diferenciación genética de <i>A. aculeata</i> .....        | 14     |
| III. OBJETIVOS E HIPOTESIS.....                                   | 15     |
| 3.1. Objetivo General.....  | 15     |
| 3.2. Objetivos particulares.....                                  | 15     |
| 3.3. Hipótesis.....   | 15     |
| IV. MÉTODOS.....  | 16     |
| 4.1. Área de estudio.....   | 16     |
| 4.2. Colecta de muestras.....                                     | 21     |
| 4.2.1. Micropropagación y organogénesis.....                      | 21     |
| 4.2.2. Genética del Paisaje.....                                  | 22     |
| 4.3. Pruebas Experimentales Micropropagación y Organogénesis..... | 24     |
| 4.3.1. Prueba de viabilidad con tetrazolio.....                   | 24     |

|  |    |
|--|----|
| 4.3.2. Preparación de medios de cultivo y siembra del embrión..... | 24 |
| 4.3.3. Diseño experimental.....                                    | 26 |
| 4.3.4. Crecimiento y desarrollo de plántulas.....                  | 27 |
| 4.3.5. Análisis estadístico.....                                   | 28 |
| 4.4. Pruebas experimentales Genética del Paisaje.....              | 28 |
| 4.4.1. Extracción y visualización de ADN.....                      | 28 |
| 4.4.2. Amplificación de microsatélites.....                        | 29 |
| 4.4.3. Análisis de geles de acrilamida.....                        | 32 |
| 4.4.4. Análisis genético.....                                      | 32 |
| V. RESULTADOS.....   | 34 |
| 5.1. Micropropagación y organogénesis.....                         | 34 |
| 5.1.2. Prueba de viabilidad.....                                   | 34 |
| 5.1.3. Porcentaje de germinación final.....                        | 35 |
| 5.1.4. Germinación acumulada.....                                  | 36 |
| 5.1.5. Crecimiento y Desarrollo de plántulas.....                  | 37 |
| 5.2. Análisis genético.....  | 42 |
| 5.2.1. Amplificación de microsatélites.....                        | 42 |
| 5.2.2. Pruebas genéticas.....                                      | 42 |
| VI. DISCUSION.....   | 47 |
| 7.1. Micropropagación y organogénesis.....                         | 47 |
| 7.1.1. Germinación.....  | 47 |
| 7.1.2. Crecimiento y desarrollo.....                               | 50 |
| 7.2. Análisis genético.....  | 59 |
| 7.2.1. Diferenciación genética.....                                | 59 |
| 7.2.2. Diversidad genética.....                                    | 61 |
| 7.3. Implicaciones para el manejo de <i>A. aculeata</i> .....      | 62 |

|                              |    |
|------------------------------|----|
| VII. CONCLUSIONES.....       | 65 |
| VIII. LITERATURA CITADA..... | 67 |
| IX. APÉNDICES.....           | 88 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1.- Distribución de <i>Acrocomia aculeata</i> (Pennigton y Sarukhan, 1968; Quero, 1994; Cabrera, 1991). .....  | 16 |
| Figura 2. Regiones Fisiográficas de Chiapas .....   | 17 |
| Figura 3.- Relieve de Chiapas.....  | 21 |
| Figura 4. Ubicación de los sitios de colecta de semillas de <i>A. aculeata</i> .....  | 22 |
| Figura 5.- Mapa de colectas realizadas de <i>Acrocomia aculeata</i> para este estudio en Chiapas.....   | 23 |
| Figura 6.- Extracción de ADN genómico en hojas de <i>Acrocomia aculeata</i> , observada a través de un gel de agarosa al 1%.....  | 26 |
| Figura 7. Ejemplo de gel de acrilamida al 2%, donde se observan los alelos amplificados del microsatélite Aacu07 (Rango 153-177 pb) de individuos de <i>A. aculeata</i> de Chiapas..... | 31 |
| Figura 8.- Porcentaje de viabilidad de embriones de <i>A. aculeata</i> .....  | 34 |
| Figura 9.- Porcentaje de germinación final (%G) de embriones de <i>A. aculeata</i> ....   | 35 |
| Figura 10.- Germinación acumulada (GA) de embriones de <i>A. aculeata</i> .....   | 36 |
| Figura 11. Valores promedio de la longitud de la raíz de <i>A. aculeata</i> de los 16 tratamientos por cada semana durante 42 días.....   | 38 |
| Figura 12. Valores promedio del número de raíces de <i>A. aculeata</i> de los 16 tratamientos por cada semana durante 42 días.....  | 39 |
| Figura 13. Valores promedio de la longitud de la hoja de <i>A. aculeata</i> de los 16 tratamientos por cada semana durante 42 días.....   | 40 |
| Figura 14. Valores promedio del número de hojas de <i>A. aculeata</i> de los 16 tratamientos por cada semana durante 42 días.....   | 41 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 15.- Relación entre las distancias geográficas y distancias genéticas de <i>A. aculeata</i> en Chiapas.....  | 43 |
| Figura 16. Mapas de agrupamiento geográfico y genético de poblaciones naturales de <i>A. aculeata</i> para diferente número de poblaciones, $K=2,3$ y $4$ , de acuerdo con el programa TESS 2.3 (Francois y Duran, 2010)..... | 44 |

## ÍNDICE DE CUADROS

|   |    |
|---|----|
| Cuadro 1. Proporciones de los compuestos químicos que se encuentran en los macroelementos, microelementos y quelatos.....   | 26 |
| Cuadro 2.- Arreglo factorial.....   | 27 |
| Cuadro 3. Secuencias de pares de cebadores de microsatélites diseñados por Nucci (2007) para poblaciones brasileñas de <i>Acrocomia aculeata</i> , con sus respectivas amplitudes alélicas, número de alelos, heterocigosidades esperadas y observadas, temperatura de reacción, índice de polimorfismo y número de acceso al Genbank, de acuerdo al autor..... | 30 |
| Cuadro 4. Valores promedio por tratamiento de los parámetros observados en <i>A. aculeata</i> cultivada in vitro durante 42 semanas.....  | 37 |
| Cuadro 5 .Valores de diversidad genética de <i>Acrocomia aculeata</i> en las regiones fisiográficas de Chiapas: Riqueza alélica ( $R_t$ ), heterocigocidad observada ( $H_o$ ), heterocigocidad esperada ( $H_E$ ) y coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ).....   | 45 |
| Cuadro 6 .Valores de la diferenciación genética de <i>A. aculeata</i> entre las regiones fisiográficas en Chiapas.....  | 46 |
| Cuadro 7. Análisis molecular de varianza (AMOVA) para <i>Acrocomia aculeata</i> en Chiapas. El valor de $\Phi_{ST}$ es significativo ( $P < 0.01$ ).....  | 47 |

## RESUMEN

La especie *Acrocomia aculeata* (coyol, coyul, corozo, totaì, macaúba) es una palma de importancia ecológica, económica y social, sin embargo es una especie poco estudiada. La propagación natural de esta especie presenta dificultades debido a su baja tasa de germinación natural (1%). El objetivo de este trabajo fue determinar las condiciones óptimas de micropropagación mediante embriones y la inducción a la organogénesis de las plántulas con la adición de fitoreguladores, así como conocer la estructura genética del paisaje en el estado de Chiapas mediante el uso de microsatélites con el propósito de generar información básica para su conservación. Se colectaron 200 semillas de cada individuo madre en tres áreas del Estado de Chiapas: Villaflores, La Sepultura y El Ocote, con la finalidad de cultivar embriones bajo condiciones *in vitro*. Para el estudio de genética del paisaje se colectaron segmentos de 5 hojas de 54 individuos en diferentes regiones del Estado. Los embriones cultivados *in vitro* obtenidos de las semillas de Villaflores presentaron un 98% de viabilidad y germinaron *in vitro* a los 11 días, presentando una germinación del 100% a los 17 días, mientras que la germinación en los embriones provenientes del Ocote y La Sepultura a los 11 días fue de 22% y 24%, respectivamente. La adición al medio MS de ácido indolacético (AIA) y 6-Benciladenina (BA) provocó un aumento en la longitud de la raíz (1.0 mg/L y 0.3 mg/L respectivamente), mientras que agregar BA (1.0 mg/L) incrementó la longitud de las hojas y el AIA (1.0 mg/L) la proliferación de hojas. La interacción de citocinina/auxina provocó un efecto negativo en la producción de raíces (un retraso del 60%). Los resultados del análisis de genética del paisaje arrojaron que el patrón de aislamiento por distancia fue no significativo ( $r^2 = 0.03$ ). La correlación de las distancias genéticas y geográficas fue no significativa ( $r = -$

0.0324 y  $P = 0.303$ ), como también la correlación entre las distancias genéticas y altitudinales ( $r=0.0492$  y  $P= 0.2500$ ). Se generaron 3 mapas de agrupamiento geográfico y genético con las poblaciones naturales. Los resultados del análisis de genética de poblaciones arrojaron que existe una diferenciación baja pero significativa entre las regiones fisiográficas del estado ( $F_{ST} = 0.102$ ,  $\Phi_{ST} = 0.035$ ). Los análisis muestran que existen áreas relativamente alejadas en las que la diferenciación genética es menor que con las zonas aledañas. Esta diferenciación posiblemente se originó por la influencia de eventos históricos y la acción de barreras geográficas. Los análisis confirman la preferencia por la polinización cruzada en la especie.

Palabras clave: *Acrocomia aculeata*, embriones, *in vitro*, microsatélites, diferenciación genética.

## I. INTRODUCCIÓN

La palma de coyol (*Acrocomia aculeata* Jacq. Lodd. ex Mart.), presenta gran variedad fenotípica de una región a otra, lo que ha ocasionado que en el pasado se describieran dentro del género alrededor de 40 especies diferentes. *Acrocomia* comprende tres especies (Henderson *et al.*, 1995; Dransfield, 1987): *Acrocomia aculeata*, distribuida desde México hasta Paraguay y el norte de Argentina; *Acrocomia crispa*, de Cuba y *Acrocomia hassleri*, de Brasil. Henderson, Galeano y Bernal (1997) sostienen que el género *Acrocomia* contiene dos especies, *A. hassleri* y *A. aculeata*. A pesar de que se describen diversas especies de *Acrocomia*, Henderson *et al.* (1995) sostienen que muchas de ellas son en realidad sinónimos de *A. aculeata*, como *A. totai*, *A. mexicana*, *A. medios*, *A. vinifera* y *A. sclerocarpa*, entre otros. Lorenzi *et al.* (2004) informan de la existencia de tres especies brasileñas de *Acrocomia* y ponen a *A. totai* como especie distinta de *A. aculeata*.

Actualmente se reconoce que *A. aculeata* es la única especie del género en México (Henderson *et al.*, 1995). Esta palma perenne, se distribuye a lo largo de las costas mexicanas; en el Golfo de México desde el Norte de Veracruz hasta la península de Yucatán, y en el Pacífico, desde Sinaloa hasta Chiapas (Henderson *et al.*, 1995; Missouri, 2005; Quero, 1999).

Esta especie crece en los campos abiertos a altitudes de 0 a 1000 m y forma parte de la vegetación secundaria. *A. aculeata* es una palma con una gran resistencia al fuego y a la lluvia; también tolera sequías prolongadas y fructifica en suelos muy pobres (Henderson *et al.*, 1995; Missouri, 2005; Pott Pott, 1994; Scariot, 1998), sus semillas presentan dificultad para germinar, su periodo de latencia puede ser de dos años hasta cuatro años, con una tasa de germinación

en la naturaleza del 1% al 3%, esto debido a que sus semillas están cubiertas por una testa dura lo que causa que su propagación natural sea muy lenta (Lorenzi, 2006; Rarepalmseed, 2005; Tabai, 1992; Teixeira, 2005).

En ciertas localidades de Chiapas, *A. aculeata* se utiliza en altares y jardines; las flores, frutos y hojas sirven para la alimentación humana y animal. Las espinas son utilizadas como palillos y agujas, las fibras se usan para elaborar sogas, redes y cañas de pescar; con la nuez se elaboran aretes, anillos y cuencas de rosarios y el endocarpio de la semilla es utilizado como combustible. Además, de esta especie se obtienen aceites comestibles e industriales (biodiesel), el palmito, ceras, jabones, cosméticos y licores (chicha, taberna). En el ámbito curativo, el cocimiento de la raíz es usado como remedio contra la diabetes, la “taberna” es utilizada en el tratamiento de reuma, en el control de parásitos, como laxante, además hace menos grave la tos ferina y estimula el apetito (Aristone, 2006; Hiane *et al.*, 2006; Lorenzi, 2006).

Tradicionalmente, el aprovechamiento del *A. aculeata* se ha hecho a partir de poblaciones silvestres ya que no se siembran para su explotación comercial o autoconsumo. La baja tasa de germinación y la muerte de una gran cantidad de palmas por el hongo *Pestalotia sp.* ha provocando una disminución poblacional significativa desde 1996 (Zuart-Macías *et al.*, 1999). La tala de esta palma en el Estado de Chiapas está prohibida desde 1991 y desde 1994 se señala en peligro de desaparecer a corto o mediano plazo dentro de la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010.

No obstante, se carece de conocimiento sobre el estado actual de *A. aculeata* en Chiapas y se necesitan estrategias para evitar que las poblaciones sigan disminuyendo. La mayoría de los trabajos de investigación se han realizado

en Centro y Suramérica; estos están enfocados en mecanismos de escarificación, germinación *in situ*, elaboración de alimentos, extracción de aceites y ecología de la especie (Balick, 1990; Ramos *et al.*, 2000; Moraes *et al.*, 2001; Esquivel *et al.*, 2003; Orozco-Segovia *et al.*, 2003, Belén-Camacho *et al.*, 2005; Ly, 2005; Aristone, 2006; Lorenzi, 2006; Hiane *et al.*, 2006; Puker, 2009).

El presente trabajo tiene como objetivos determinar la tasa de germinación de *A. aculeata* bajo la técnica de micropropagación, específicamente mediante el uso de embriones y la inducción a la organogénesis adicionando al medio de cultivo ácido indolacético (AIA) y 6-Benciladenina (BA); así como identificar la estructura genética de la especie en Chiapas a nivel del paisaje mediante el uso de microsatélites, con el fin de poder establecer estrategias de conservación adecuadas (Golstein y Pollock, 1994; Vendramin *et al.*, 1996; Zucchi *et al.*, 2003).

## II. ANTECEDENTES

### 2.1. Estudios de micropropagación

Varios investigadores han demostrado la viabilidad de la micropropagación de *A. aculeata* (Pereira *et al.*, 2006; Steinmacher *et al.*, 2007; Ledo *et al.*, 2007; Bandeira, 2008; Soares *et al.*, 2011). De acuerdo a estudios realizados en el 2003 por EPAMIG (Empresa de Investigación Agropecuaria de Minas Gerais, Brasil) que investiga sobre la domesticación de especies, la baja tasa de germinación de *A. aculeata* en condiciones naturales se incrementó en un 60% desde el cultivo de embriones cigotos *in vitro*. Zuart-Macías *et al* (1999), llevaron a cabo un trabajo sobre la disminución de las poblaciones de *A. aculeata* en Chiapas, en donde encontraron que esto se debe principalmente a dos causas: 1) el bajo índice de la germinación de las semillas y 2) el efecto de una enfermedad (posiblemente causada por una especie del hongo *Pestalotia*) que produce la muerte de 50% de las palmas en una población, principalmente de los árboles adultos.

El cultivo de embriones de palma es importante, especialmente cuando se trata del intercambio de germoplasma, programas de mejoramiento genético, calidad de las plantas y la conservación de material, ya que evita la destrucción de las matrices en el campo (Silva, 2005). Esta técnica tiene un gran potencial para su aplicación en la propagación de varias especies de palmeras, que generalmente tienen un crecimiento lento y dificultad de germinación, y se ha empleado con frecuencia en protocolos regenerativos, orientados principalmente a la reducción del tiempo germinación de la semilla, mayor uniformidad de las plántulas, la regularización en la producción de plántulas y la conservación de germoplasma a mediano y largo plazo (Tabai, 1992; Ledo *et al.*, 2001; Melo *et al.*, 2001; Spera *et al.*, 2001; Sarasan *et al.*, 2002; Silva, 2002; Molla, 2004;

Steinmacher 2005; Pereira *et al.*, 2006; Tzec-Sima *et al.*, 2006; Ledo *et al.*, 2007; Pech-Ake *et al.*, 2007).

En palmas, la oxidación de los tejidos en cultivo *in vitro* es un problema recurrente (Sugimura y Salvaña, 1989; Teixeira *et al.*, 1994; Al-Khayri, 2005; Steinmacher *et al.*, 2007; Sáenz *et al.*, 2010). Este podría ser uno de los motivos más determinantes para la reducida regeneración vegetativa *in vitro* de esta familia de plantas. El empleo del CA (carbón activado) agregado al medio de cultivo para evitar la oxidación es muy frecuente especialmente en especies de la familia Arecaceae. Sugimura y Salvaña (1989), mencionan que la micropropagación de palmeras presenta graves problemas de oxidación y la inclusión de CA al medio de cultivo tiene un papel preponderante en la disminución de este problema. Las concentraciones empleadas que se observan en la literatura varían entre 0,5 y 10 g/l, siendo más frecuentes las dosis de 2,0 y 3,0 g/l.

Samosir *et al.* (1998) reportaron que, en los casos en los cuales no se agregó carbón activado al medio de cultivo, se observó oxidación en todos los explantes de inflorescencias de coco. En la mayoría de palmeras, la disminución de los niveles de 2,4-D en el medio de cultivo tiene un efecto benéfico en la disminución de la oxidación. Para evitar la oxidación y contar con material vegetal adecuado se debe utilizar como explante plántulas provenientes de semillas germinadas en condiciones asépticas (Yadav *et al.*, 1990). Asimismo, los segmentos de inflorescencia pequeños presentan mayor sobrevivencia respecto de los explantes grandes, debido a una menor oxidación.

Tabai *et al.* (1990) cultivó embriones cigóticos para reducir el momento de la germinación de semillas de *A. aculeata* en São Paulo, Brasil; los autores reportan que la oxidación de los compuestos fenólicos presentes en el embrión

está relacionada con la liberación de toxinas en el medio ambiente y por lo general no tiene ningún efecto en el desarrollo del embrión o plántulas. El uso de nitrógeno en el medio MS causó una disminución de la materia seca de las plantas y los mejores resultados se obtuvieron con el uso del 25 al 50% de la concentración original.

Bandeira (2008) en Minas Gerais, Brasil estableció protocolos para el cultivo de embriones y la inducción de la embriogénesis somática en *A. aculeata* utilizando como fuente de explantes embriones cigóticos maduros e inmaduros, observó que los embriones germinan fácilmente cuando son aislados de las semillas y se cultivan mediante la micropropagación. El cultivo de embriones en fotoperíodos dio lugar a una alta tasa de oxidación de los explantes, sin embargo era favorable para el crecimiento y desarrollo de plantas de semillero en comparación con la oscuridad temprana. La suplementación del medio con carbón vegetal activado demostró ser esencial para el pleno desarrollo de las plantas principalmente estimulando el desarrollo de un sistema de raíces de manera eficiente, mientras que en la ausencia de este componente en el medio, no hubo conversión de plántulas viables, que a su vez creció lenta y desequilibradamente. El medio MS promovió resultados ligeramente mejores que el medio Y3 (Eeuwens, 1978) en términos de desarrollo de las plántulas, en ausencia de carbón activado, observándose un crecimiento desequilibrado de las plántulas y en esta condición no mostraron formación de raíces primarias y secundarias. Por otro lado, la adición de carbón activado a los medios de conversión generó plántulas viables con raíces bien formadas. Una temperatura de 35 ° C estimula la germinación de embriones inmaduros y la conversión de plántulas viables, e independiente del tiempo en el que los frutos se mantuvieron en esta condición se

mantuvo la calidad fisiológica y la viabilidad de los explantes. Además, se proporciona más eficiente en el tratamiento de los frutos y la extracción de los embriones.

Ribeiro Monteiro *et al.* (2010) examinaron la morfología y anatomía de los embriones cigóticos y plántulas durante la germinación *in vitro*, en semillas de Montes Claros de Minas Gerais, Brasil. Los embriones se colocaron en medio MS suplementado con compuestos orgánicos y cultivados en la oscuridad a 30°C durante 20 días, se observó un alargamiento del eje embrionario después de 2 días y un alargamiento del pecíolo del cotiledón a partir del quinto día, esto es una indicación morfológica de la germinación que se asocia con la formación de almidón y rafidios, así como la diferenciación de elementos traqueales. El crecimiento de los cotiledones se debe al aumento del volumen celular, así como el desarrollo de la banda meristemática periférica al haustorio. La radícula está menos diferenciada que la plúmula, aunque el desarrollo de la raíz es precoz y la raíz emerge primero, indica la ausencia de latencia morfológica. El atrofia del haustorio y la acumulación de compuestos fenólicos en las capas de células subepidérmicas puede ocurrir debido a las condiciones de cultivo. Los inhibidores en las estructuras adyacentes al embrión de *A. aculeata* no influyen en la germinación.

Moura *et al.* (2010) trabajaron sobre la anatomía, la histoquímica y la ultraestructura de las semillas y embriones somáticos *in vitro* de *A. aculeata* en Brasil con el fin de obtener las relaciones entre el comportamiento de la semilla en la post-cosecha y la conversión de embrión somático a planta. Los autores observaron que el embrión y el endospermo cigóticos tienen una alta cantidad de proteínas y lípidos. La ausencia de vacuolas y pocos organelos provoca el bajo

estado metabólico de los embriones cigóticos, lo que sugiere el comportamiento ortodoxo de la semilla madura. El embrión somático no contiene proteínas o lípidos de reserva lo que puede estar relacionado con la etapa de maduración de los embriones y por lo tanto con una baja conversión de estos embriones en plantas.

Ribeiro Monteiro *et al.* (2010) en su trabajo para establecer los criterios de la aplicación de la prueba de tetrazolio en embriones de *A. aculeata* de semillas del municipio de Montes Claros, Brasil, evaluaron diferentes concentraciones (0,5, 0,75 y 1%) de 2,3,5-trifenil solución de cloruro de tetrazolio durante 2 o 4 h mediante la micropropagación de embriones, observándose que en esta especie de lenta germinación y que presenta latencia si se debe aplicar el tiempo de tinción de las cuatro horas en una solución de la sal de tetrazolio, obteniéndose el mejor desarrollo de plántulas en la solución 0,5% y 35°C para poder evaluar la viabilidad de las semillas.

Soares *et al.* (2011) trabajaron con embriones de *A. aculeata* en Lavras, Brasil evaluando la influencia de las concentraciones de sal en el medio de cultivo MS y el agua de coco en la germinación *in vitro*, los embriones fueron extirpados y luego inoculadas en tubos de ensayo que contienen 15 ml de medio cultivo MS con concentraciones de 50 a 100% de sales minerales y agua de coco (0, 50, 100 e 150mL L<sup>-1</sup>). Los cultivos se mantuvieron en una cámara de crecimiento con 42W m<sup>-2</sup>, temperatura de 25±2°C y fotoperíodos de 16 horas, se tuvo el mayor porcentaje de germinación de los embriones a los 60 días, en el medio MS (Murashige y Skoog, 1962), en composición original, sin el uso de fitoreguladores de crecimiento en la plántula. El crecimiento y la conversión en plántulas normales o viables, que pueden ser aclimatado, requieren la mitad de

la concentración de sal en el medio MS suplementado con 50 ml L<sup>-1</sup> agua de coco.

Borcioni-Elis y Raquel (2012) evaluaron mediante la micropropagación la germinación de embriones cigóticos de *A. aculeata* en Paraná, Brasil y la promoción de crecimiento y desarrollo de plántulas normales bajo diferentes concentraciones (0,00, 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5 y 1 mg L<sup>-1</sup>) de un análogo de brasinoesteroides (Biobras 16 ®). Observando que la aplicación de Biobras 16 ® no promueve un aumento en el porcentaje de germinación pero estimula la formación de plántulas normales. El efecto de Biobras 16 ® sólo se observó en la primera fase, no en las etapas de crecimiento.

### **2.1.2. Fitoreguladores**

La producción de plántulas mediante la ruta de la micropropagación puede ser optimizada basada en el uso de fitoreguladores del crecimiento vegetal (Ledo *et al.*, 2007), sin embargo, se sabe poco sobre el uso de estas sustancias en desarrollo de las plantas cultivadas.

Moura *et al.* (2009) en su estudio con semillas de la Región Oeste del Estado de Minas Gerais, Brasil para inducir embriones somáticos a partir de la inoculación de embriones cigóticos utilizaron un medio compuesto de sales de Y3 (Eeuwens, 1978), 68,46 g de L<sup>-1</sup> de sacarosa, 1,0 g L<sup>-1</sup> de caseína hidrolizada, 100 g L<sup>-1</sup> de myo-inositol, 9 µM picloram, y solidificado con 2,5 g de L<sup>-1</sup> gelrita (Moura *et al.*, 2009), observaron después de 60 días de cultivo el 87,5% de germinación. Después de 60 días de inducción en la oscuridad, a 25 ± 2 ° C, los callos embriogénicos somáticos formados se subcultivaron durante otros 60 días en el mismo medio suplementado con 3 g de L<sup>-1</sup> de carbón activo para generar

embriones somáticos (Moura *et al.*, 2009) y a los 120 días los embriones somáticos se regeneraron a partir de callos nodulares. En el medio sin fitoreguladores solo la mitad de embriones germinaron. Al adicionar 9  $\mu\text{M}$  de ácido 4-amino-3,5,6 triclora picolínico (picloram) se obtuvieron callos embriogénicos.

Moura *et al.* (2008) en su trabajo sobre el estudio histológico de la embriogénesis somática en embriones cigóticos de *Acrocomia aculeata* de Pernambuco, Brasil, inocularon los embriones cigóticos en medio Y3 con 9  $\mu\text{M}$  de picloram (4-amino-3,5,6-trichloropicolonic acid), observando que se regeneraron embriones somáticos a partir de la inducción de callo nodular en medio con carbón activado. Muchos proembriones se originaron de los meristemas después de 10-20 días de cultivo. Después de 30-40 días de cultivo, las masas meristemáticas crecieron y generaron callo nodular, después de la transferencia a un medio sin carbón activado y sin luz generaron embriones somáticos de origen multicelular. Los embriones no se regeneraron en plantas.

Ribeiro *et al.* (2010) en su trabajo para establecer los criterios de la aplicación de la prueba de tetrazolio en embriones de *A. aculeata* de semillas del municipio de Montes Claros, Brasil, observaron que el tratamiento de preacondicionamiento en agua no es necesaria. En esta especie de lenta germinación y que presenta latencia si se debe aplicar el tiempo de tinción de las cuatro horas en una solución de la sal de tetrazolio, 0,5% y 35°C para poder evaluar la viabilidad de las semillas.

Bandeira (2008) en Minas Gerais, Brasil, en su trabajo obtuvo que la frecuencia de la embriogénesis somática fue mayor en medio que contiene 2,4 mg L-1 picloram, que también ha demostrado ser más eficaz en la formación de estructuras nodulares. Los resultados de este estudio indican que es posible

obtener plántulas de manera relativamente rápida (12 semanas) mediante el cultivo de embriones in vitro.

### **2.1.3. Aplicaciones**

Sosnowska y Henrik (2008) en su trabajo mencionan que las raíces de *Acrocomia aculeata* se han utilizado durante mucho tiempo en los pueblos indígenas de los estados de Yucatán y Tamaulipas, México para el tratamiento de la diabetes. Compuestos hipoglucemiantes de esta palma han sido reportados en muchos estudios (Pérez *et al.*, 1997; Haines, 2004; Andrade-Cetto y Heinrich, 2005).

Rodríguez *et al.* (2010) reportaron que los extractos crudos de *Acrocomia aculeata* obtenidos mediante micropropagación y la raíz adulta, son factibles para utilizarse como agentes profilácticos ante la infección causada por el virus de influenza.

## **2.2. Estudios genéticos**

### **2.2.1. Genética del paisaje**

La genética del paisaje es una fusión entre la genética molecular y la ecología del paisaje. La distinción clave con la genética de poblaciones es la incorporación de pruebas explícitas de la heterogeneidad del paisaje en el flujo de genes y la variación genética (Holderegger y Wagner, 2008), con la finalidad de comprender los procesos del flujo de genes y la adaptación local mediante el estudio de las interacciones entre la variación genética y las variaciones espaciales (o ambientales). Los patrones espaciales más utilizados son: clinas, aislamiento por distancia, límites genéticos (discontinuidades) para el flujo de genes, metapoblaciones y los patrones al azar (Manel *et al.*, 2003; Holderegger *et al.*,

2010). A diferencia de los estudios clásicos de genética de poblaciones, estos patrones se pueden evaluar a nivel individual, sin definir poblaciones de antemano. Idealmente, en un enfoque de genética del paisaje, el individuo es la unidad operativa de estudio. Sin embargo, esto se puede extender a nivel de poblaciones (Manel *et al.*, 2003). Después del muestreo, se utilizan herramientas genéticas y estadísticas para determinar el patrón genético espacial y correlacionarlo con el paisaje o las características ambientales. Los datos obtenidos se utilizan para encontrar discontinuidades genéticas e identificar las áreas de interés para la conservación (Storfer *et al.*, 2010; Manel y Gernot, 2009).

En la actualidad, se carece de estudios de genética del paisaje en *Acrocomia*. En palmas, Trénel *et al.* (2008), en su trabajo con la especie *Ceroxylon echinulatum* encontraron una clina geográfica que cruza los Andes en la zona Amotape-Huancabamba en el sur de Ecuador / norte de Perú. Las pruebas de Mantel apoyaron firmemente el modelo de declinación con la dispersión transversal andina en la zona Amotape-Huancabamba. A lo largo de la clina, el flujo de genes fue limitado por la distancia, el impacto por la fricción del clima fue menos significativo.

### **2.2.2. Diversidad genética de *A. aculeata***

Oliveira *et al.* (2008) analizaron la diversidad genética de las poblaciones de *A. aculeata* en la región norte del Estado de Minas Gerais, Brasil. Los autores utilizaron marcadores RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA por sus siglas en inglés) para estudiar seis poblaciones. Los índices de diversidad genética fueron  $H_E = 0.42$  y  $0.34$ , en las poblaciones Itacambira y Mirabela  $H_E =$

0.28 y 0.25. Los autores proponen el establecimiento de estrategias de conservación en estas dos poblaciones. Nucci *et al.* (2008) describieron ocho marcadores microsatélites polimórficos de *A. aculeata* y analizaron 43 individuos de poblaciones naturales. Obtuvieron un promedio de cinco alelos por locus para caracterizar un estudio de estructura genética poblacional en Brasil.

Chorfi y Colombo (2009-2012) realizaron un proyecto en Sao Paulo, Brasil para caracterizar genéticamente las poblaciones naturales, así como el potencial de producción, rendimiento y composición en la producción de biodiesel, para seleccionar plantas madre y formar una colección de germoplasma con miras a la mejora de la especie. Los resultados no se han publicado al momento. Mientras que Colombo (2011-2013) en los últimos años, ha estudiado la caracterización de los ambientes y la diversidad genética de las poblaciones de *A. aculeata* en Sao Paulo en relación con la diversidad de especies, representada por las plantas de *A. aculeata* de otros estados brasileños y países donde se produce de forma natural, donde utilizaron descriptores agro-morfológicos y microsatélites, además se estableció si existe la presencia de híbridos naturales entre *A. aculeata* y *A. totai* en la región donde ambas especies se encuentran en simpatría (región de la frontera entre São Paulo y Mato Grosso do Sul) para desarrollar el protocolo para la multiplicación *in vitro* de especies, con el objetivo de la clonación y la producción de plántulas comerciales de los genotipos de élite.

### **2.2.3. Diferenciación genética de *A. aculeata***

Oliveira *et al.* (2008) observaron una diferencia significativa para los índices de diversidad entre las poblaciones, lo que indicó que existe mayor variabilidad genética dentro de las poblaciones que entre las poblaciones; el flujo génico entre poblaciones fue  $Nm=2.4$ . El dendograma presento 3 agrupamientos con un 88% de similitud, las poblaciones más próximas geográficamente fueron también las más cercanas genéticamente. En su estudio Nucci *et al.* (2008) observaron en su dendograma tres agrupamientos distintos relacionados con la ecología, geografía y el clima en que se localizaron sus poblaciones naturales de *A. aculeata*. La diversidad genética entre las poblaciones fue mayor dentro de las regiones que entre ellas, con un  $F_{ST}=0.25$ . La mayoría de las poblaciones no se encontraron en equilibrio Hardy-Weinberg. El índice de fijación de los alelos sugiere que la especie posee un sistema de apareamiento mixto (polinización cruzada y autopolinización). Gonçalves *et al.* (2012) abordaron la estructura genética y el sistema de apareamiento en *A. aculeata* en São Paulo y Minas Gerais, Brasil por medio de ocho loci microsatélites. En el análisis bayesiano, estas poblaciones se agruparon en dos o tres grupos cercanos geográficamente. El estudio mostro que las poblaciones poseen una elevada tasa de fecundación cruzada aunque también hubo un cierto grado de endogamia biparental (cruce entre parientes).

### **III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

#### **3.1. Objetivo general**

- Determinar las condiciones óptimas de micropropagación y la estructura genética a nivel del paisaje de *Acrocomia aculeata* en Chiapas como información base para el diseño de alternativas de manejo en el Estado.

#### **3.2. Objetivos particulares**

- Evaluar la tasa de germinación de embriones en medio de cultivo *Murashige y Skoog* (MS)
- Evaluar en los explantes la interacción de diferentes niveles de ácido indolacético (AIA) y 6-Benciladenina (BA) para el crecimiento y desarrollo de plántulas.
- Obtener y comparar la estructura genética del paisaje de *A. aculeata* en Chiapas.

#### **3.3. Hipótesis**

1. A mayor concentración de auxinas y menor de citocininas se obtendrá un mayor crecimiento y desarrollo de órganos en las plántulas.
2. La distancia geográfica y la altitud tienen un efecto significativo en la estructura genética del paisaje de esta especie.

## IV. MÉTODOS

### 4.1. Área de estudio

Chiapas se ubica entre las coordenadas 14°32' y 17° 59' de latitud norte y 90° 22' y 94° 15' de longitud oeste, limita al norte con el Estado de Tabasco, al sur con el Océano Pacífico al oeste con el Istmo de Tehuantepec y los Estados de Oaxaca y Veracruz y al este con la República de Guatemala con una frontera de 658.5 km, posee un litoral de 260 km en la costa del Océano Pacífico (Fig. 1). La extensión territorial del estado es de 74,415 km<sup>2</sup>, lo que le ha valido el octavo lugar a nivel nacional y el 3.8% del territorio mexicano (Orozco, 2003; Plan Estatal de Desarrollo de Chiapas, 2007-2012).

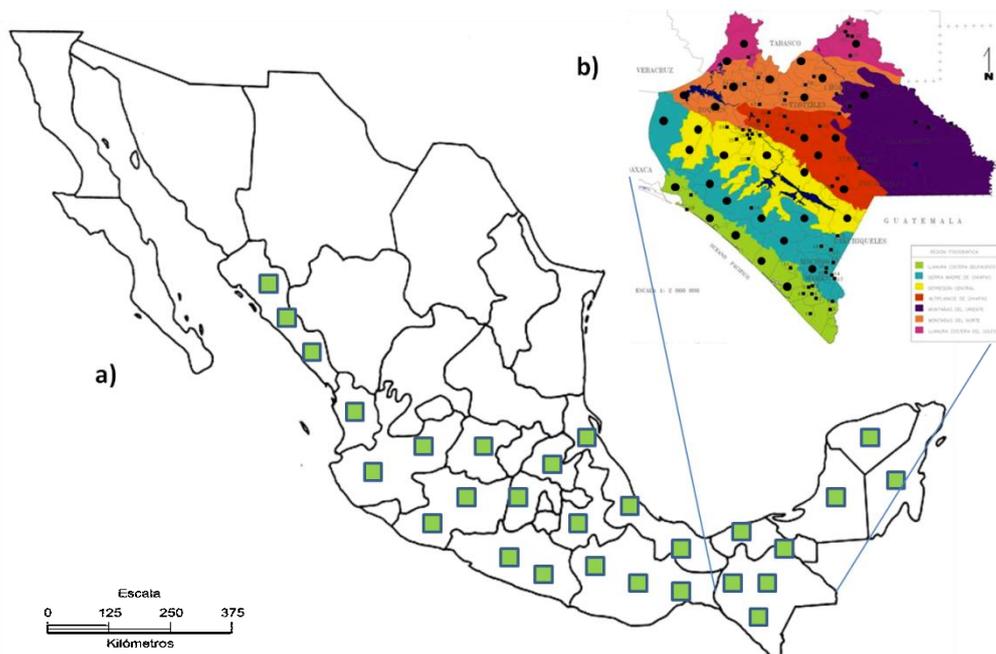


Figura 1.- a) Distribución de *Acrocomia aculeata* (Pennigton y Sarukhan, 1968; Quero, 1994; Cabrera, 1991), b) Mapa de las regiones fisiográficas del estado de Chiapas según Müllerried (1957).

El estado presenta un complejo relieve, con pendientes ligeras hasta mayores a los 60° e intervalos altitudinales que van desde el nivel del mar hasta los 4,100 m. Con base al criterio topográfico y climático. Müllerried (1957) definió siete regiones fisiográficas en el estado de Chiapas (Fig. 2). Esta regionalización sigue vigente hasta la actualidad. Las colectas se llevaron a cabo en las regiones fisiográficas donde se encontró la especie *A. aculeata*.

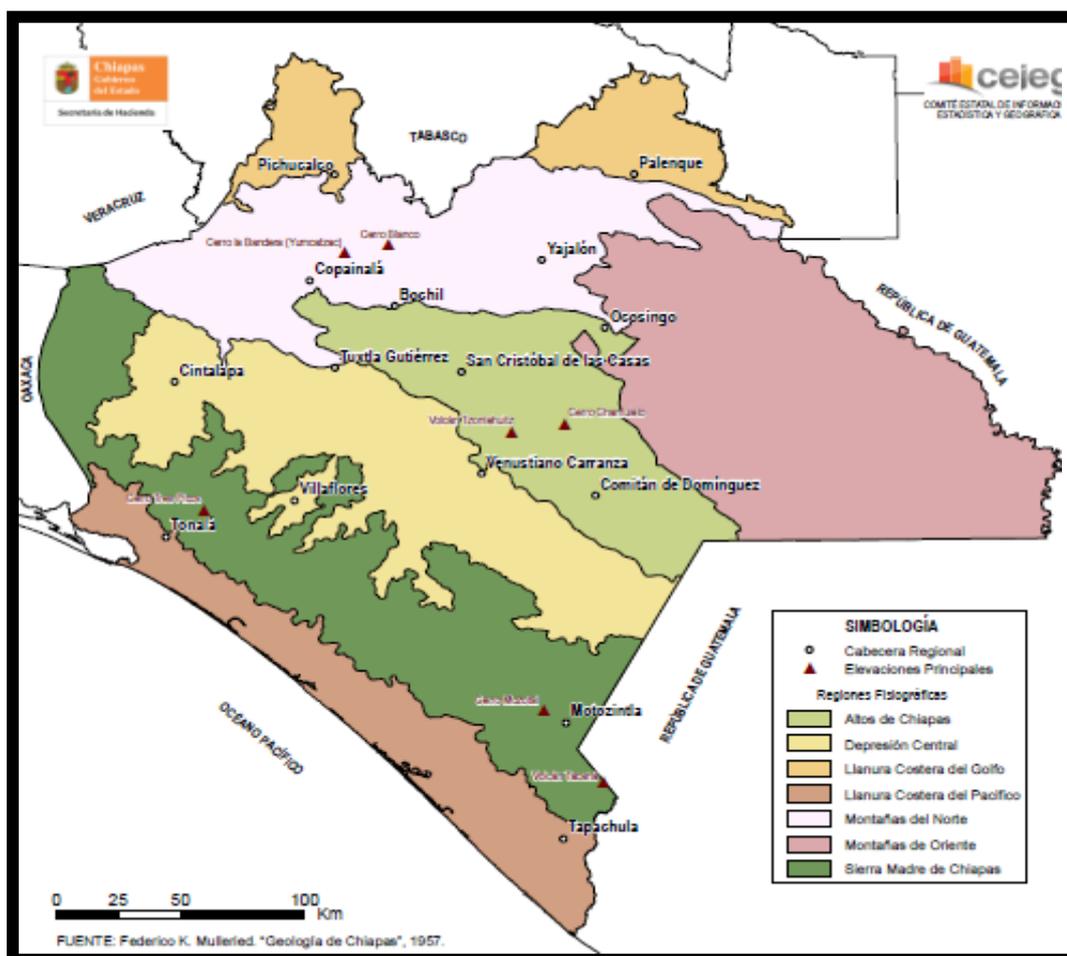


Figura 2. Regiones Fisiográficas de Chiapas (INEGI, 2005).

La Llanura Costera del Pacífico, de relieve plano y clima cálido; se extiende de noroeste a sureste y se continua en terrenos de Guatemala y Oaxaca, su longitud es de 280 km con una anchura de solo 15 km en el noroeste, aumentando hasta 35 km en el sureste (Müllerried, 1957).

La Sierra Madre de Chiapas, al noreste de la Llanura del Pacífico, de accidentado relieve y variedad de climas, consiste en una zona montañosa con orientación casi igual a la planicie del Pacífico, y prosigue en terrenos de Guatemala y Oaxaca, en Chiapas alcanza una longitud de 280 km, con una anchura variable entre 50 km en la parte noroeste y de 65 km en la parte sureste, la mayor altitud, si se exceptúa el Tacaná, es de 3,000 m en el extremo sureste y disminuye a casi 1,500 m en el límite con Oaxaca (ídem).

La Depresión Central, al noroeste de la Sierra, región baja y hundida entre las montañas, con una gran variedad de formas topográficas que incluyen serranías, cerros aislados, mesas, llanos y cañadas, y con clima cálido subhúmedo; al ser paralela a la sierra se orienta en la misma dirección, ONO a ESE, con una extensión igual a 280 km, continuándose en terrenos de Oaxaca y Guatemala, la anchura es de 30 km en el sureste, pero aumenta a 55 km en el noroeste, para disminuir a 25 y aun a 20 en la región del municipio de Cintalapa, en el noroeste registra una altitud de 500 m y en el sureste aumenta hasta 650 m (Müllerried, 1957).

El Altiplano Central, al noroeste de la depresión, región compacta de elevada altitud, caracterizado por la sucesión de pequeños valles y montañas, salpicado de fenómenos cársticos con climas semicálidos y templados; con una extensión aproximada, en Chiapas, de 160 km hasta la frontera con Guatemala, tiene una anchura de 75 km de suroeste a noroeste, los puntos más altos se localizan en las cercanías del municipio de San Cristóbal de las Casas,

específicamente en los cerros Zontehuitz y Huitepec, con 2860 y 2660 m respectivamente (Müllerried, 1957).

Las Montañas del Oriente, al noroeste de la Altiplanicie, formada por sierras bajas y accidentadas con valles paralelos, orientados de noroeste a sureste y con clima cálido sumamente húmedo; se limita al este por los ríos Usumacinta y Salinas que corresponden a la frontera con Guatemala, en Chiapas tiene una longitud de 150 km y una anchura de 70 a 100 km con escasa altitud en el norte, en la región del Usumacinta hay solo 900 msnm, de este punto al suroeste aumentan las montañas de altura y al suroeste del río Jataté se encuentran altitudes hasta de 1,200 m (ídem).

Las Montañas del Norte, región al norte de las Montañas de Oriente, de la Depresión y del Altiplano Central, se conforma de sierras paralelas y bajas, con alargados valles intermontanos, muy húmedas y cálidas; con dirección general de oeste a este y se prosiguen al poniente en terrenos de Oaxaca y Veracruz, correspondientes a la parte media del Istmo de Tehuantepec, la longitud mayor de esta región es de 250 km en terrenos de Chiapas y su anchura de sur a norte es de 65 km, en su límite sur tiene una altitud de 800 a 1,500 m, pero en el norte al pie de ellas, la altura es solo de 50 m, llegando a alcanzar en algunas partes, alturas considerables de hasta 2,000 msnm (Müllerried, 1957).

La Llanura del Golfo, se extiende al norte de las Montañas del Norte, básicamente formada por terrenos ondulados, con clima cálido y muy húmedo, en los límites de Chiapas forma dos amplios salientes dirigidos hacia el Golfo de

México, uno en el poniente, al norte del municipio de Pichucalco, con su punto más septentrional en el lugar llamado Las Mercedes, a orillas del río Grijalva, que dista 55 km de la costa, el otro saliente más ancho, se sitúa al noroeste del municipio de Salto de Agua y al norte de Palenque y Reforma, su punto más septentrional se encuentra a orillas del río Usumacinta, dista 95 km del Golfo.

La planicie costera dentro de Chiapas tiene una extensión de 45 km en el saliente occidental y de 90 km en el oriental, su extensión de sur a norte es de 45 km en el oeste y de 50 km en el este, con altitudes que van de 15 a 50 m al pie septentrional de las Montañas del Norte (Müllerried, 1957). Debido al contacto de tres grandes placas tectónicas, existe un alto grado de sismicidad en Chiapas. Una base de rocas muy antiguas constituye la espina dorsal de la Sierra Madre. Esta es una gran extensión de rocas sedimentarias mesozoicas, formadas debajo de las aguas marinas que forman los conjuntos montañosos del norte. Restos de plutonismo forman la Sierra Madre de Chiapas y depósitos aluviales formaron las Llanuras Costeras del Golfo y del Pacífico (Fig. 3) (INEGI, 2012).

La complejidad orográfica del estado de Chiapas se puede observar en dos grandes conjuntos montañosos, formados por las Montañas del Norte, del Oriente y Los Altos, y al sur, la Sierra Madre de Chiapas, la región más accidentada del estado. Entre ambos conjuntos montañosos, se encuentra una fosa tectónica llamada la Depresión Central. Completan este panorama, las Llanuras Costeras, al sur la del Pacífico, y al norte la del Golfo, que se extiende mayoritariamente por Tabasco y el suroeste de Campeche (INEGI, 2012).

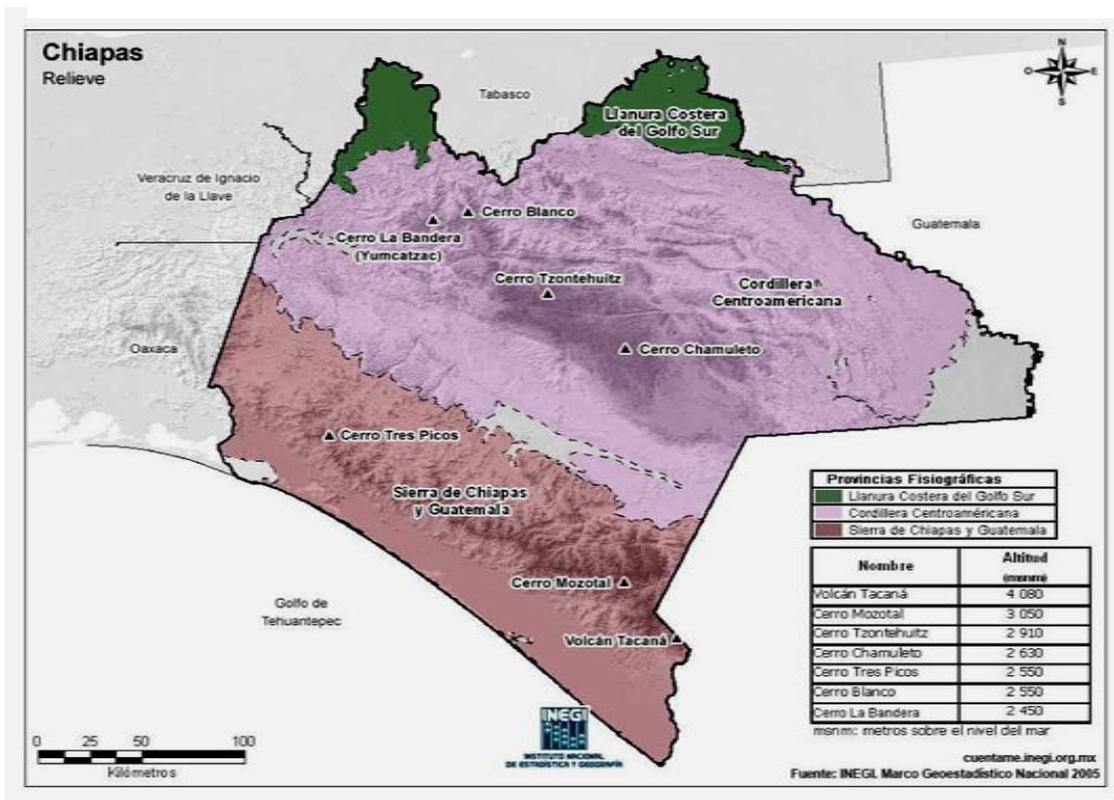


Figura 3.- Relieve de Chiapas (INEGI, 2005)

## 4.2. Colecta de muestras

### 4.2.1. Micropropagación y organogénesis

Entre los meses de febrero y marzo (época en que las semillas están maduras) de 2011, se colectó un racimo con aproximadamente 200 semillas cada uno, en tres sitios de Chiapas (Apéndice 1, Fig. 4). Los sitios de colecta fueron los siguientes: Villaflores (Depresión Central), La Sepultura (Sierra Madre) y El Ocote (Montañas del Norte) por ser las zonas más impactadas por los usos y el número de árboles (obs. Orantes, 2011). Las semillas colectadas fueron trasladadas a temperatura ambiente en costales al Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNICACH.

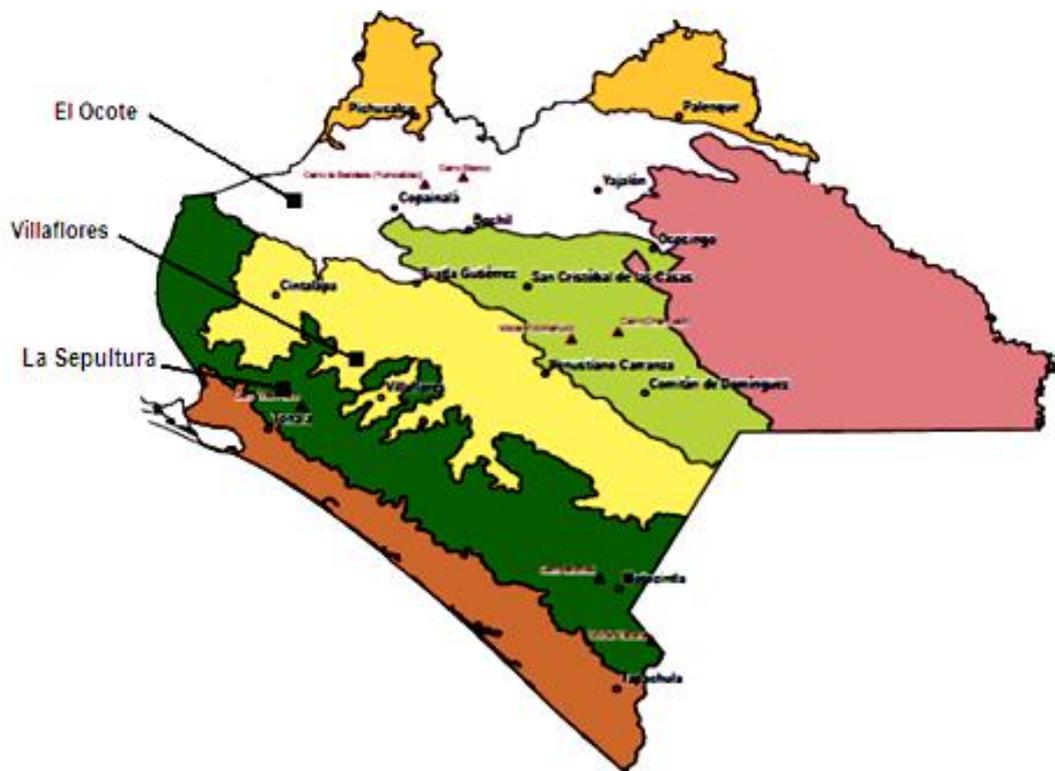


Figura 4.- Ubicación de los sitios de colecta de semillas de *A. aculeata*.

#### 4.2.2. Genética del Paisaje

Se efectuó un recorrido en áreas donde se ha reportado presencia de la palma en Chiapas (Pennigton y Sarukan, 1968; Cabrera, 1991; Quero, 1994) para establecer el área de distribución total, con los datos de colecta (Apéndice 3) se generó un mapa que muestra los municipios donde en la actualidad hay presencia de *A. aculeata* (Fig. 5). Se buscó la presencia de la especie en cada una de las regiones fisiográficas, pero no se encontró en las Montañas del Oriente. Cada individuo fue georeferenciado con un GPS de 2 satélites marca Garmin.



Figura 5. Mapa de colectas realizadas de *Acrocomia aculeata* para este estudio en Chiapas.

Durante el recorrido en las áreas de distribución se localizaron un total de 56 individuos de *A. aculeata* (Apéndice 2), posteriormente con ayuda de unas tijeras previamente desinfectadas en alcohol y limpiadas con agua destilada se colectaron 5 hojas frescas de cada individuo, se guardaron en una bolsa hermética previamente etiquetada y se colocaron en una hielera para su transporte al laboratorio de Ecología Evolutiva de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNICACH donde fueron mantenidos a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento (Hamilton *et al.*, 1999)

### **4.3. Pruebas experimentales Micropropagación y Organogénesis**

#### **4.3.1. Prueba de viabilidad con tetrazolio**

Para conocer si las semillas se encuentran vivas y para determinar el tiempo de viabilidad de las mismas, se realizó la prueba de viabilidad de acuerdo a Hartmann y Kester (1992), la cual consistió en 4 lotes de 25 semillas cada uno, las semillas se remojaron durante 24 h, posteriormente, se eliminó la testa, y se realizó un corte longitudinal, agregándoles de 2 a 3 gotas de tetrazolio diluido (1g de tetrazolio en 100 mL de agua), se cubrieron con papel aluminio, dejándolos durante 12 h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se observó al microscopio estereoscopio el grado de tinción de los embriones. Esta técnica indica que si se observa que los embriones son teñidos de rojo por el tetrazolio, los tejidos están vivos; mientras que en las células muertas no se da ninguna reacción (Hartmann y Kester, 1992).

El porcentaje de viabilidad se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\text{Número de semillas coloreadas}}{\text{Número total de semillas}} \times 100$$

#### **4.3.2. Preparación de medios de cultivo y siembra del embrión**

Los medios de cultivo se prepararon adicionando 100 mL de macroelementos, 10 mL de microelementos, 10 mL de quelatos (Cuadro 1) y 20 g de azúcar en un matraz con 500 mL de agua destilada, con agitación constante, aforar a 1000 mL y ajustando el pH a  $5.6 \pm 1$ , añadir 2.5 g de phytigel y carbón activado (para evitar la oxidación), posteriormente calentamos a ebullición y vertir en los frascos que se esterilizaron y sellaron con polietileno (kleen pack®).

Con la ayuda de un martillo (previamente esterilizado) se eliminó el exocarpo, mesocarpo, endocarpo y la testa de la semilla, evitando dañar el embrión. Las semillas se desinfectaron con agua corriente y detergente, posteriormente se les aplicó una solución al 1% de agri-micyn 500 a base de estreptomicina+oxitetraciclina+sulfato tribásico de cobre durante 20 minutos en agitación constante, luego se enjuagaron con agua destilada estéril tres veces, posteriormente se sumergieron en alcohol al 70% durante 5 minutos con agitación constante, nuevamente se enjuagaron con agua destilada estéril 3 veces. En seguida se sumergieron en cloro comercial (cloralex®) al 10% durante 20 minutos con agitación constante, transcurrido el tiempo se enjuagaron 6 veces con agua destilada estéril, posteriormente en la campana de flujo laminar desinfectada, con la ayuda de un bisturí y pinzas sin dientes se separó el embrión del endospermo y cotiledón (Pierik, 1990).

Una vez sacado el embrión, con la ayuda de una pinza sin dientes se colocó un embrión sobre el medio de cultivo contenido en cada frasco, cerrándolo y sellándolo con polietileno (kleen pack®), y etiquetándolo para su incubación en la cámara bioclimática con temperatura de 25<sup>o</sup> 2<sup>o</sup> C y fotoperíodos controlados de 16/8 h-luz/obscuridad a 1500 lux (Hartmann y Kester, 1992). Sembrándose un total de 120 frascos, con la finalidad de obtener 80 plántulas para el experimento de crecimiento y desarrollo.

Después de 30 días se evaluó el porcentaje de germinación final (%G) para determinar el efecto de los tratamientos en la capacidad germinativa (proporción de semillas capaces de germinar en condiciones óptimas o en una condición

determinada) (Bewley y Black, 1994) y la germinación acumulada (GA), que muestra la forma en que se incrementa la germinación y el tiempo (días) de inicio de la germinación (González y Orozco, 1996).

Para determinar el porcentaje de germinación y germinación acumulada se utilizaron las siguientes formulas:

% n1= porcentaje de semillas que germinan en el tiempo 1\*

% n2= porcentaje de semillas que germinan en el tiempo 2\*

% nx= porcentaje de semillas que germinan en el último tiempo en que se presentó la germinación.

\*Siendo el tiempo 1 y 2, 10 y 20 días respectivamente.

Cuadro 1. Proporciones de los compuestos químicos que se encuentran en los macroelementos, microelementos y quelatos.

| Macroelementos 100x                             | Microelementos 10x   | Quelatos 10x  |
|---|--|---|
| <b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 16.5 g</b>      | <b>KI 0.083 g</b>  | <b>Na<sub>2</sub>EDTA * 2H<sub>2</sub>O 4.123 g</b> |
| <b>KNO<sub>3</sub> 19.0 g</b>                   | <b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.62 g</b>                      | <b>FeSO<sub>4</sub> * 7H<sub>2</sub>O 2.780 g</b>   |
| <b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.7 g</b>       | <b>MnSO<sub>4</sub> * 4H<sub>2</sub>O 1.69 g</b>               |   |
| <b>CaCl<sub>2</sub> * 2H<sub>2</sub>O 4.4 g</b> | <b>ZnSO<sub>4</sub> * 7H<sub>2</sub>O 0.86 g</b>               |   |
| <b>MgSO<sub>4</sub> * 7H<sub>2</sub>O 3.7 g</b> | <b>CuSO<sub>4</sub> * 5H<sub>2</sub>O 0.0025 g</b>             |   |
|   | <b>CoCl<sub>2</sub> * 6H<sub>2</sub>O 0.0025 g</b>             |   |
|   | <b>Na<sub>2</sub>MOO<sub>4</sub> * 2H<sub>2</sub>O 0.025 g</b> |   |

#### 4.3.3 Diseño experimental

Consistió en un experimento factorial completamente al azar, con un arreglo factorial de 4X4, que consta de 16 tratamientos (Cuadro 2) con 5 repeticiones cada uno. Cada frasco contenía una plántula, generándose en total 80 plántulas sembradas. Se utilizaron dos fitoreguladores 6-Benciladenina (BA) en

concentraciones de 0.0, 0.3, 1.0, 3.0 mg/L y ácido indolacético (AIA) en concentraciones de 0.0, 0.3, 1.0, 3.0 mg/L

Cuadro 2.- Arreglo factorial

| CONCENTRACION            |     | 6-Benciladenina (BA) |           |            |           |
|--------------------------|-----|----------------------|-----------|------------|-----------|
| mgL <sup>-1</sup>        |     | 0.0                  | 0.3       | 1.0        | 3.0       |
| ácido indolacético (AIA) | 0.0 | 0.0 / 0.0            | 0.3 / 0.0 | 1.0 / 0.00 | 3.0 / 0.0 |
|                          | 0.3 | 0.0 / 0.3            | 0.3 / 0.3 | 1.0 / 0.3  | 3.0 / 0.3 |
|                          | 1.0 | 0.0 / 1.0            | 0.3 / 1.0 | 1.0 / 1.0  | 3.0 / 1.0 |
|                          | 3.0 | 0.0 / 3.0            | 0.3 / 3.0 | 1.0 / 3.0  | 3.0 / 3.0 |

#### 4.3.4. Crecimiento y desarrollo de plántulas.

De acuerdo al diseño experimental se prepararon en frascos de cristal los tratamientos de MS adicionado con hormonas, posteriormente se cerraron, etiquetaron, y sellaron con polietileno (kleen pack®). Bajo condiciones asépticas en la cámara de aire de flujo laminar filtrado se transplantaron los explantes (previamente medidos) en cada frasco. Posteriormente los frascos fueron cerrados con tapas de polipropileno, sellados con polietileno, y etiquetados para su incubación. La incubación se llevó a cabo en la cámara bioclimática con control de temperatura de  $25^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$  y fotoperíodos controlados de 16/8 horas luz/oscuridad a una intensidad lumínica de 1800 lux (Hartmann y Kester, 1992)

Los parámetros observados durante esta etapa fueron: longitud de la raíz principal (mm), longitud de la hoja más grande (mm), número de hojas y número de raíces. Se tomaron datos cada semana, durante 42 días.

#### **4.3.5. Análisis estadísticos**

Los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) y se generaron graficas utilizando el paquete estadístico SPSS V. 15. Se realizó el Test de Tukey para las comparaciones estadísticas.

#### **4.4. Pruebas experimentales Genética del Paisaje**

##### **4.4.1. Extracción y visualización de ADN**

El ADN genómico se extrajo a partir de tejido de la hoja utilizando un método simplificado CTAB (Cullings 1992). La visualización del ADN extraído se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% empleando buffer TAE 1X donde el ADN de peso molecular alto aparece como una banda definida en la parte superior del gel a poca distancia de los pozos, mientras que el material parcialmente degradado forma un barrido similar a una mancha (Fig. 6).

En cada pozo se colocaron 5 µl de ADN y 3 µl de azul de bromofenol, este último es utilizado como un colorante indicador en el corrimiento del gel para ver la migración de los fragmentos, lo que ocurrió en un tiempo de 35 a 40 min con un voltaje de corrimiento de 100 V. Posteriormente, el gel se tiñó con bromuro de etidio (bromuro de 3,8 diamino-6-etil-5-fenilfenantridio) el cual se intercala con las moléculas de ADN y emite una radiación luminosa al ser expuesto a la luz ultravioleta. Se utilizó un transiluminador para determinar la calidad del ADN total obtenido en la extracción (Ramírez, 2002). La imagen fue captada con una cámara fotográfica Kodak EDAS 290® conectada por una interfase a una computadora, en donde con ayuda del software Id Image Analysis de la misma marca se editaron y almacenaron.

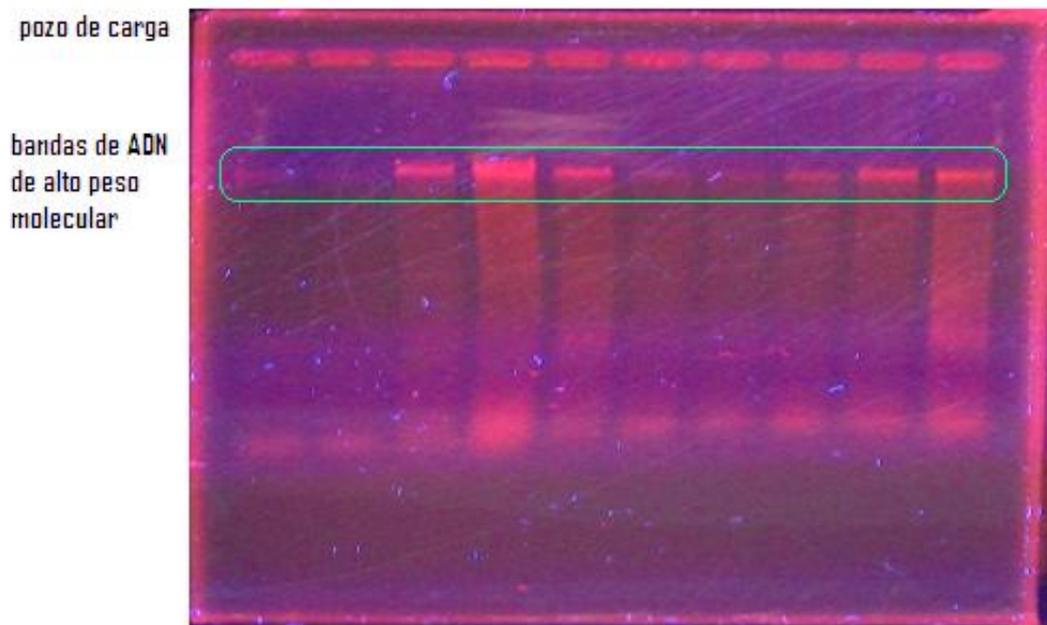


Figura 6.- Visualización de la extracción de ADN genómico por medio del método CTAB a partir de hojas de *Acrocomia aculeata*, observada a través de un gel de agarosa al 1%.

#### 4.4.2. Amplificación de microsatélites

La amplificación del ADN se realizó mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Se probaron los ocho pares polimórficos de cebadores para obtener microsatélites específicos para esta especie (Cuadro 3).

Cinco de los microsatélites mostraron productos de amplificación de ADN, aunque sólo cuatro resultaron con alelos detectables (ver Resultados). La amplificación se llevó a cabo utilizando un termociclador de gradiente MJ Mini (BIO-RAD), con un programa touchdown que consistió en una desnaturalización inicial 95° C por 5 min, seguido de 1 ciclo de 95° por 45 s, 62° por 45 s, 72° por 45 s; 30 ciclos de 95° por 45 s, un gradiente de 62 a 47° por 45 s, 72° por 45 s; 15 ciclos de 95° por 45 s, 47° por 45 s, 72° por 45s y una extensión final de 72° por 5

min. Las reacciones se realizaron con el kit comercial PCR Master Mix, que está constituido por una mezcla de solución Master Mix de PROMEGA y agua libre de nucleasas. Cada reacción incluyó 1.5 µl de ADN genómico, 12 µl de solución Master Mix, 10 µl de agua libre de nucleasas y 1 µl de cada primer (*forward* y *reverse*), con un volumen final 25.5 µl.

Cuadro 3. Secuencias de pares de cebadores de microsatélites diseñados por Nucci (2007) para poblaciones brasileñas de *Acrocomia aculeata*, con sus respectivas amplitudes alélicas, temperatura de reacción y número de acceso al Genbank, de acuerdo al autor.

| <b>Locus</b>  | <b>Motivo</b>    | <b>Secuencias de pares de <i>primes</i></b>      | <b>Amplitud alélica</b> | <b>Ta(°C)</b> | <b>No. Acceso al Genbank</b> |
|---------------|------------------|--|-------------------------|---------------|------------------------------|
| <b>Aacu07</b> | (GA)13           | F ATCGAAGGCCCTCCAATACT<br>R AAATAAGGGGACCCTCCAA  | 153-177                 | 56            | BV703504                     |
| <b>Aacu10</b> | (AG)16           | F TGCCACATAGAGTGCTTGCT<br>R CTACCACATCCCCGTGAGTT | 168-186                 | 56            | BV703505                     |
| <b>Aacu12</b> | (TC)20           | F GAATGTGCGTGCTCAAATG<br>R AATGCCAAGTGACCAAGTCC  | 190-202                 | 56            | BV703506                     |
| <b>Aacu18</b> | (TG)17           | F TCCACCTTTAATGGGAGTGC<br>R TAAACAGCGCCAGGTCTTCT | 173-193                 | 56            | BV703507                     |
| <b>Aacu26</b> | (AC)13<br>(AG)14 | F ACTTGCAGCCCCATATTCAG<br>R CAGGAACAGAGGCAAGTTC  | 273-316                 | 56            | BV703508                     |
| <b>Aacu30</b> | (CA)18           | F TGTGGAAGAAACAGGTCCC<br>R TCGCCTTGAGAAATTATGGC  | 148-158                 | 56            | BV703509                     |
| <b>Aacu32</b> | (TG)22           | F AGAAGCCGATTTCTAATTG<br>R TCTTGCTTACGCGTGGACTA  | 229-233                 | 52            | BV703510                     |
| <b>Aacu35</b> | (TG)20           | F CTTGCTTACGCGTGGACTAA<br>R TGTGATTTTCTTACGCGTGC | 380-430                 | 52            | BV703511                     |

Ta (°C): temperatura de reacción.

Con el fin de optimizar la reacción de PCR para los cebadores que carecían de señal detectable en agarosa, se realizaron experimentos con gradientes de temperatura, diferentes rangos de temperaturas de alineamiento en un programa touchdown y gradientes de MgCl<sub>2</sub> (1.5, 2, 2.5, 3, 3.3, 4 mM). Todos

los esfuerzos por hacer funcionar los marcadores Aacu18, Aacu30 y Aacu32 fueron infructuosos.

Los productos de amplificación fueron visualizados mediante electroforesis en gel de acrilamida al 2%. En cada pozo se añadió una mezcla de 5  $\mu$ l de ADN con 3  $\mu$ l de azul de bromofenol, en cada gel se utilizaron dos escaleras de 50 pares de bases (pb) mezclando 2  $\mu$ l de escalera con 3  $\mu$ l de azul de bromofenol. El tiempo de corrimiento fue de 50 a 60 min a 80 V. Posteriormente el gel se tiñó con bromuro de etidio (Figura 7).

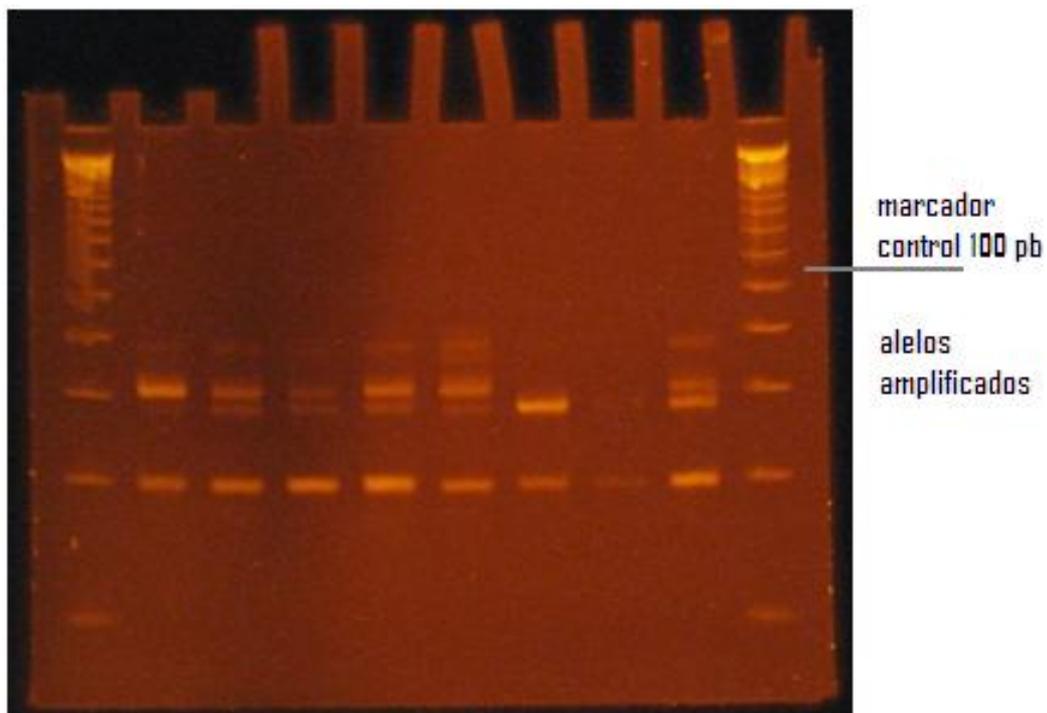


Figura 7. Ejemplo de gel de acrilamida al 2%, donde se observan los alelos amplificados del microsatélite Aacu07 (Rango 153-177 pb) de individuos de *A. aculeata* de Chiapas.

#### **4.4.3. Análisis de geles de acrilamida**

La interpretación de los geles de acrilamida se llevó a cabo mediante la localización de los alelos (bandas observadas en la amplificación) cercanos al tamaño aproximado de producto en pares de bases reportadas en la literatura (Nucci, 2007).

#### **4.4.4. Análisis genético**

Para realizar los análisis a nivel de genética del paisaje, se elaboró una base de datos con el genotipo de cada individuo por locus y las coordenadas georeferenciadas donde se localizó. La relación entre las distancia genéticas y las distancias geográficas a nivel individual, se determinó por medio de una autocorrelación espacial con el programa SPAGeDi versión 1.3 (Hardy and Vekemans, 2002). La distancia genética entre individuos utilizada en este análisis fue la propuesta por Rousset (2000). También se realizó una prueba de Mantel para determinar la correlación estadística entre las distancias genéticas y geográficas con el programa IBDWS versión 3.23. Así mismo, con el propósito de evaluar la correlación entre la altitud y las distancias genéticas entre individuos, se realizó una prueba parcial de Mantel controlando el efecto de la distancia geográfica (Aguirre, 2007).

Por otro lado, con el fin de determinar la homogeneidad genética y espacial a nivel del paisaje de los individuos colectados, se realizó un análisis de agrupamiento geográfico utilizando el programa TESS 2.3 (Francois y Duran, 2010). Este programa implementa un algoritmo bayesiano para determinar el la asignación espacial de individuos con base a su información geográfica y

genética. Se utilizaron los valores iniciales del programa por *default*. Los métodos tradicionales para analizar los datos genéticos provenientes de sistemas naturales se basan en la genética de poblaciones (Manel *et al.*, 2003) Para poder obtener estimaciones de diversidad y diferenciación genética que fueran comparables con estudios anteriores en *A. aculeata*, en este estudio se consideran como poblaciones ecológicas a los individuos encontrados en la misma región fisiográfica (Müllerried, 1957) en la que fueron colectados, puesto que una población ecológica agrupa a individuos que comparten la misma influencia de los factores ambientales físicos y biológicos, comprende los individuos de una misma especie que se encuentran dentro de un área prescrita (Krebs 1986; Ricklefs 1990). Debido a que las regiones fisiográficas están basadas en criterios topográficos y climáticos, se consideró representan una aproximación para el agrupamiento geográfico de los individuos. Los resultados fueron analizados en los siguientes programas: GenAlEx (*Genetic Analysis in Excel*) versión 6.4 (Peakall y Smouse 2006) para calcular la heterocigosidad esperada ( $H_E$ ) y la heterocigosidad observada ( $H_O$ ), el coeficientes de endogamia ( $F_{IS}$ ) y la diferenciación genética ( $F_{ST}$ ) (Wright, 1978), el equilibrio de Hardy-Weinberg. Con el programa FSTAT ver. 2.9.3.2 (Goudet, 2002) se estimó la riqueza alélica ( $R_t$ ). Para el análisis de varianza molecular (AMOVA, Excoffier *et al.*, 1992) y la diferenciación genética entre pares de poblaciones ( $F_{ST}$ ) se utilizó el programa ARLEQUIN ver. 3.5.1.2 (Excoffier y Lischer 2010). Los valores de significancia estadística fueron calculados utilizando la corrección Bonferroni para comparaciones múltiples, implementada en los programas.

## V. RESULTADOS

### 5.1. Micropropagación y organogénesis

#### 5.1.2. Prueba de viabilidad

En la prueba de viabilidad con tetrazolio se obtuvo que un 98% de las semillas de Villaflores (Depresión Central) fueron viables, 66% en La Sepultura (Sierra Madre) y un 43% en El Ocote (Montañas del Norte) (Fig. 8).

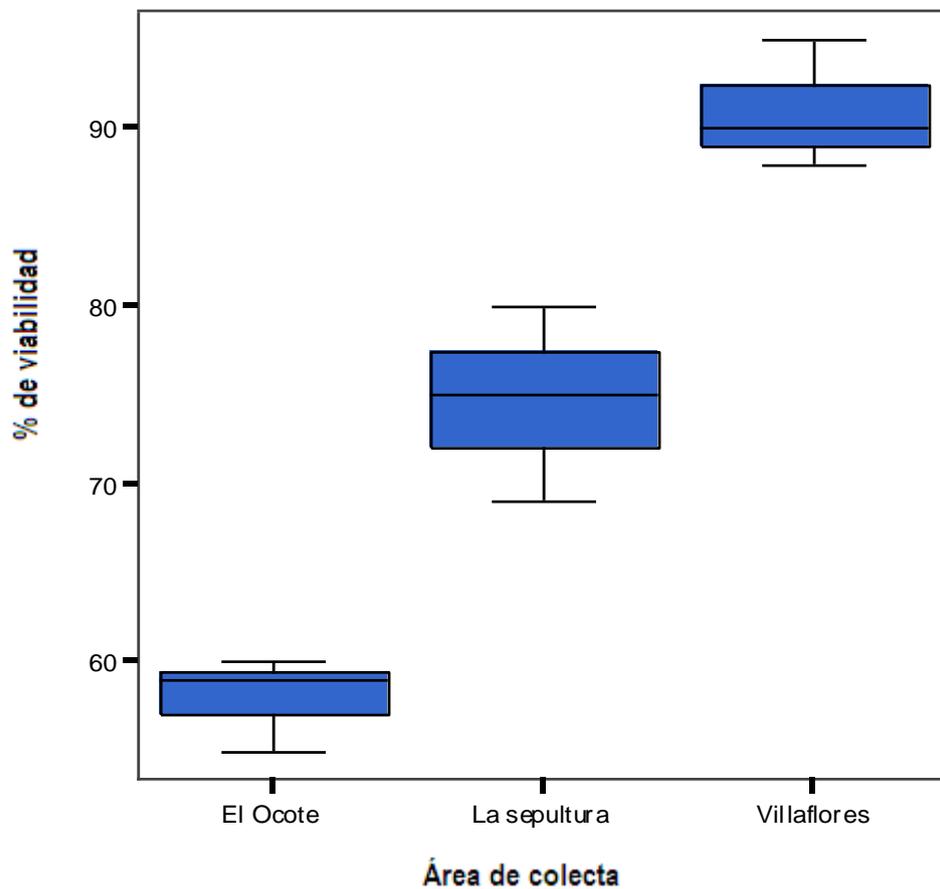


Figura 8.- Porcentaje de viabilidad de embriones de *A. aculeata*.

### 5.1.3. Porcentaje de germinación final

Después de 30 días en medio MS (Cuadro1) los embriones de *A. aculeata* provenientes de semillas de Villaflores (Depresión Central) presentaron un porcentaje de germinación final del 100%, los provenientes de semillas de La Sepultura (Sierra Madre) germinaron en un 55% y los embriones del Ocote (Montañas del Norte) fueron las que presentaron el menor porcentaje de germinación, 37% (Fig. 9) (Apéndice 4).

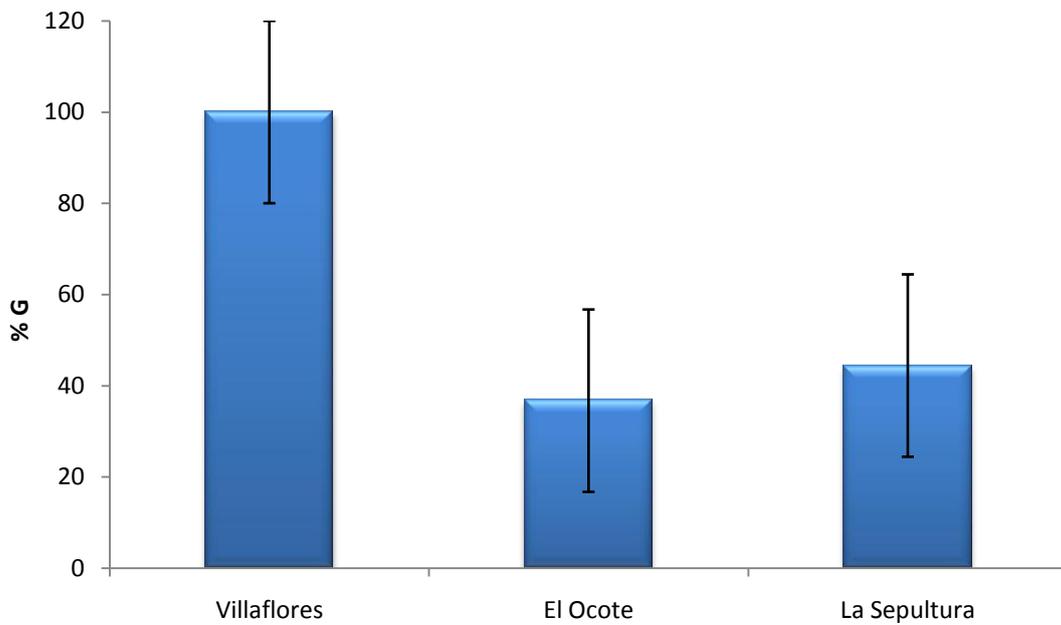


Figura 9.- Porcentaje de germinación final (%G) de embriones de *A. aculeata*

#### 5.1.4. Germinación acumulada

Los embriones de Villaflores fueron los que presentaron el mayor porcentaje de germinación en un menor tiempo, germinaron en un 25% a los 11 días posteriores a la siembra y a los 17 días germinaron en un 100%. Los embriones de La sepultura germinaron en un 24% a los 17 días posteriores a la siembra y a los 30 días germinaron en un 55%. Los embriones de El Ocote germinaron en un 22% a los 16 días posteriores a la siembra y a los 30 días germinaron en un 37% (Fig.10).

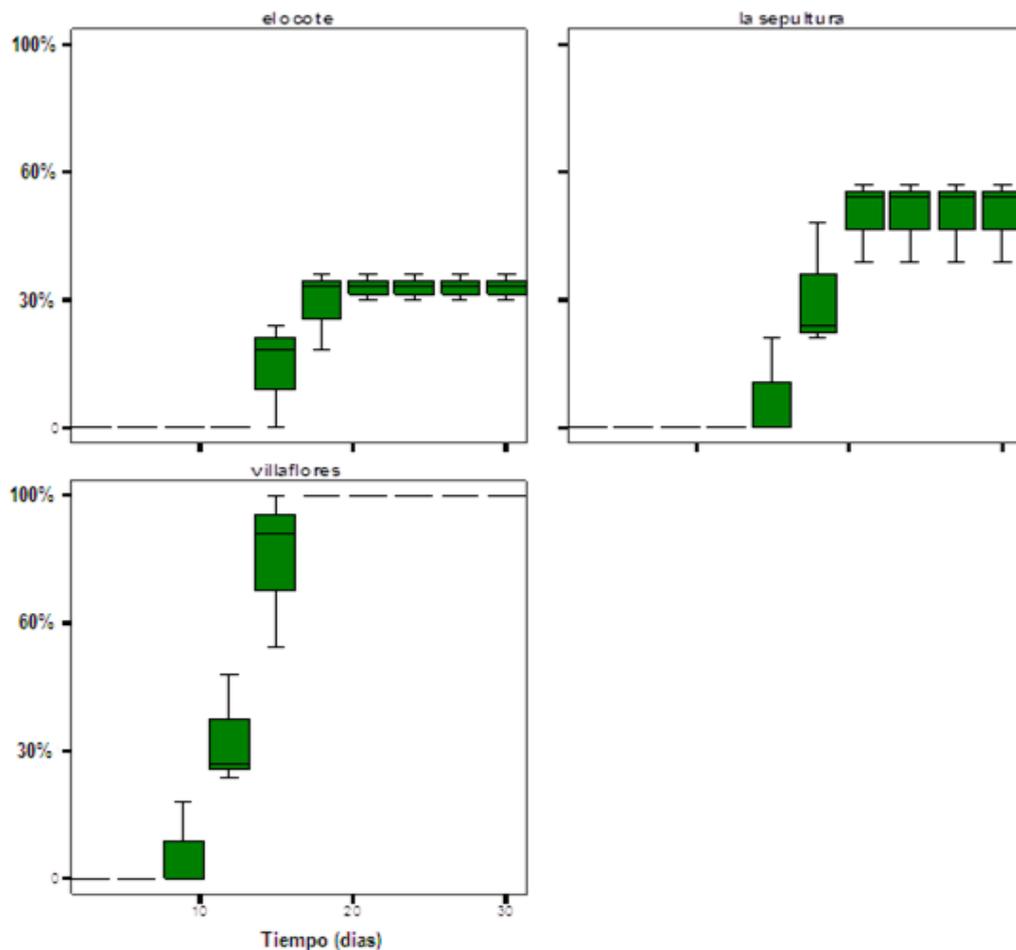


Figura 10.- Germinación acumulada (GA) de embriones de *A. aculeata*

### 5.1.5. Crecimiento y desarrollo de plántulas

Una vez obtenida la germinación de los embriones se tomaron las plántulas generadas de semillas de Villaflores por ser las que obtuvieron el mayor porcentaje de germinación para la siguiente fase de este estudio.

Cuadro 4. Valores promedio por tratamiento de los parámetros observados en *A. aculeata* cultivada in vitro durante 42 semanas. La desviación estándar se observa entre paréntesis.

| Número de Tratamiento | AIA | BA  | Longitud de la raíz en cm | Número de raíces | Longitud de la hoja en cm | Número de hojas |
|-----------------------|-----|-----|---------------------------|------------------|---------------------------|-----------------|
| 1                     | 0   | 0   | 3,004 (2.37)              | 3,75 (2.38)      | 5,383 (3.79)              | 1,88 (1.30)     |
| 2                     | 0.3 | 0   | 2,267 (1.03)              | 3,25 (2.44)      | 4,617 (3.04)              | 3,00 (1.77)     |
| 3                     | 1.0 | 0   | 2,867 (1.49)              | 2,38 (1.61)      | 4,500 (3.13)              | 3,75 (2.44)     |
| 4                     | 3.0 | 0   | 2,000 (1.86)              | 3,00 (3.06)      | 4,042 (2.58)              | 3,00 (1.77)     |
| 5                     | 0   | 0.3 | 2,000 (1.29)              | 3,38 (2.22)      | 3,000 (2.36)              | 2,25 (1.68)     |
| 6                     | 0.3 | 0.3 | 3,267 (2.23)              | 2,63 (1.97)      | 2,500 (1.93)              | 3,25 (1.75)     |
| 7                     | 1.0 | 0.3 | 4,392 (2.63)              | 2,88 (2.36)      | 6,083 (5.62)              | 2,42 (1.49)     |
| 8                     | 3.0 | 0.3 | 3,150 (1.86)              | 1,50 (0.89)      | 4,713 (3.05)              | 2,63 (1.61)     |
| 9                     | 0   | 1.0 | 2,483 (1.68)              | 2,00 (1.45)      | 6,604 (2.36)              | 2,63 (2.16)     |
| 10                    | 0.3 | 1.0 | 3,750 (2.82)              | 1,50 (0.89)      | 4,465 (2.16)              | 1,88 (1.30)     |
| 11                    | 1.0 | 1.0 | 1,350 (0.94)              | 3,50 (2.23)      | 3,317 (2.06)              | 2,00 (2.04)     |
| 12                    | 3.0 | 1.0 | 1,996 (1.69)              | 3,00 (2.28)      | 4,433 (2.34)              | 2,75 (1.75)     |
| 13                    | 0   | 3.0 | 3,150 (1.64)              | 1,88 (1.49)      | 4,617 (2.81)              | 1,75 (1.23)     |
| 14                    | 0.3 | 3.0 | 1,600 (1.31)              | 2,00 (2.50)      | 3,767 (2.15)              | 2,00 (2.04)     |
| 15                    | 1.0 | 3.0 | 1,963 (1.02)              | 2,50 (2.23)      | 4,083 (2.59)              | 2,00 (1.45)     |
| 16                    | 3.0 | 3.0 | 1,983 (1.42)              | 3,00 (2.29)      | 5,133 (3.18)              | 2,88 (1.73)     |
| <b>Total</b>          |     |     | 2,576 (1.93)              | 2,63 (2.17)      | 4,454 (3.07)              | 2,50 (1.80)     |

**Longitud de la raíz.** Después de 42 días posteriores a la siembra, de las plántulas en el medio adicionado con los fitoreguladores 6-Benciladenina (BA) y ácido indolacético (AIA) en concentraciones de 0 a 3 mg/L según el diseño experimental (Cuadro 2). Las plántulas del tratamiento 7 (AIA 1.0 y BA 0.3) fueron

las que presentaron el mayor tamaño en la longitud de la raíz con un promedio de 4.392 ( $\pm 2.63$ ) mm y las del tratamiento 11 (AIA 1.0 y BA 1.0) fueron las que presentaron el menor tamaño en la longitud de la raíz con 1.350 ( $\pm 0.94$ ) mm (Cuadro 4, Fig. 11), la prueba de tukey mostro una diferencia entre los tratamientos, catalogándolos en 6 grupos, siendo el tratamiento 7 el que se diferenció de los demás de manera favorable (Fig. 11). El tratamiento 1 (testigo) sin adición de fitoreguladores presento una raíz de 3,004mm (DS2.37) de longitud en promedio (F=5,15; P=,000; gl15).

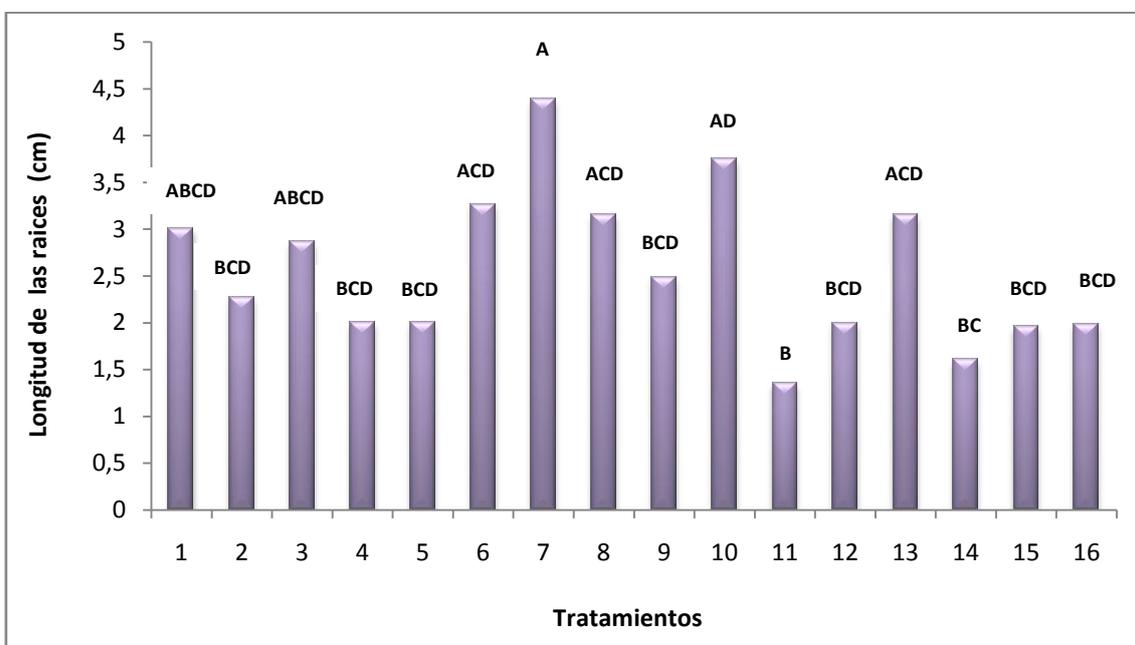


Figura 11. Valores promedio de la longitud de las raíces a los 42 días en plántulas cultivadas *in vitro* de *A. aculeata* para 16 tratamientos adicionados con reguladores de crecimiento (AIA y BA) conforme a un gradiente de concentración. Se realizaron tres replicas por tratamiento. Las letras indican grupos que no difieren estadísticamente entre sí (Test de Tukey,  $p < 0.05$ ).

**Numero de raíces** En medio adicionado con los fitoreguladores 6-Benciladenina (BA) y ácido indolacético (AIA) en concentraciones de 0 a 3 mg/L según el diseño

experimental (Cuadro 2), el mayor número de raíces a los 42 días (Cuadro 4, Fig. 12), se observó en el tratamiento 1 (testigo) con un promedio de 3.75 de raíces (DE=2.38), seguido del tratamiento 11 (AIA 1.0 y BA 1.0) que presento un promedio de 3.50 raíces (DE=2.23). Los tratamiento 8 (AIA 3.0 y BA 0.3) y 10 (AIA 0.3 y BA 1.0) fueron los que presentaron el menor número de raíces de 1.50 (DE=0.89) en promedio (F=2,695; P=,001; gl15). La prueba de tukey concentro en tres grupos estadísticos a los 16 tratamientos, mostrando que el tratamiento 1 fue el que presento un mejor desarrollo (Fig. 12).

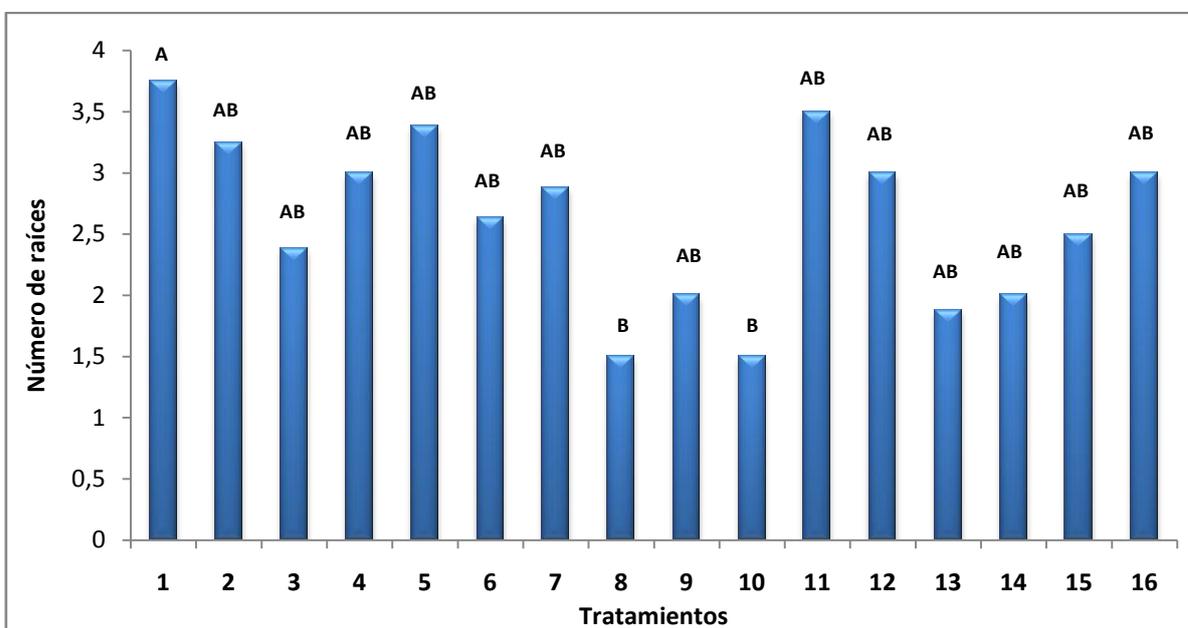


Figura 12. Valores promedio del número de raíces en plántulas cultivadas *in vitro* de *A. aculeata* durante 42 días para 16 tratamientos adicionados con reguladores de crecimiento (AIA y BA) conforme a un gradiente de concentración. Se realizaron tres replicas por tratamiento. Las letras indican grupos que no difieren estadísticamente entre sí (Test de Tukey,  $p < 0.05$ ).

**Longitud de la hoja** En cuanto a la longitud de la hoja a los 42 días de cultivo de las plántulas (Cuadro 4, Fig. 13) en medio adicionado con los fitoreguladores 6-

Benciladenina (BA) y ácido indolacético (AIA) en concentraciones de 0 a 3 mg/L según el diseño experimental (Cuadro 2), el tratamiento 9 (AIA 0 y BA 1.0) fue el que mostro el mayor desarrollo con un promedio de 6.604 mm (DE=2.36) mientras que en el tratamiento 7 (AIA 1.0 y BA 0.3) se observó un promedio de 6.083 mm (DE=5.62), el tratamiento 6 (AIA 0.3 y BA 0.3) fue el que presento el menor desarrollo en la longitud de la hoja, 2.500 mm (DE=1.93) en promedio (F=3,064; P=,000; gl15). La prueba de tukey agrupo a los tratamientos en 6 grupos (Fig. 13).

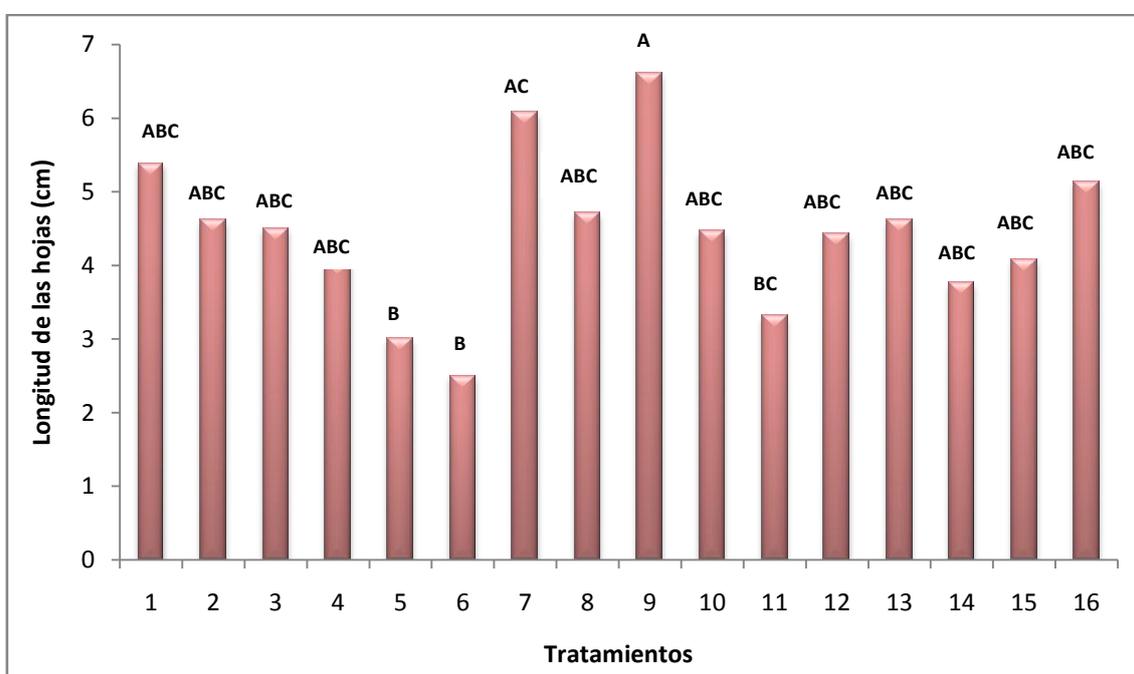


Figura 13. Valores promedio de la longitud de las hojas en plántulas cultivadas *in vitro* de *A. aculeata* durante 42 días para 16 tratamientos adicionados con reguladores de crecimiento (AIA y BA) conforme a un gradiente de concentración. Se realizaron tres replicas por tratamiento. Las letras indican grupos que no difieren estadísticamente entre sí (Test de Tukey,  $p < 0.05$ ).

**Numero de hojas** Después de 42 días posteriores a la siembra de las plántulas (Cuadro 4, Fig. 14) en el medio adicionado con los fitoreguladores 6-Benciladenina (BA) y ácido indolacético (AIA) en concentraciones de 0 a 3 mg/L

según el diseño experimental (Cuadro 2). El tratamiento 3 (AIA 1.0 y BA 0) mostro el mayor número de hojas con un promedio de 3.75 (DE=2.44) hojas, seguido del tratamiento 6 (AIA 0.3 y BA 0.3) con un promedio de 3.25 (DE=1.75), el tratamiento 13 (AIA 0 y BA 3.0) fue el que mostro el menor número de hojas, 1.75 (DE=1.23) en promedio ( $F=2,630$ ;  $P=,001$ ;  $gl15$ ). La prueba de tukey clasifico en tres grupos a los tratamientos, observándose que el tratamiento 3 fue el que obtuvo mayor número de hojas y es estadísticamente diferente a los demás (Fig. 14).

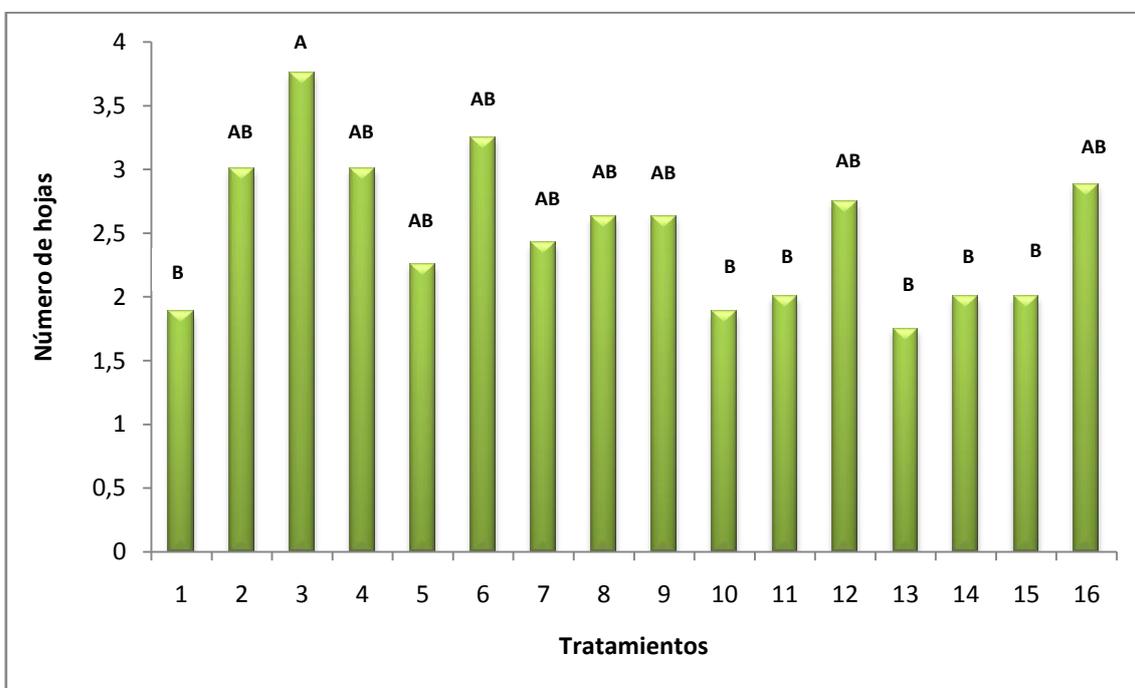


Figura 14. Valores promedio del número de hojas en plántulas cultivadas *in vitro* de *A. aculeata* durante 42 días para 16 tratamientos adicionados con reguladores de crecimiento (AIA y BA) conforme a un gradiente de concentración. Se realizaron tres replicas por tratamiento. Las letras indican grupos que no difieren estadísticamente entre sí (Test de Tukey,  $p<0.05$ ).

## **5.2. Análisis genético**

### **5.2.1. Amplificación de microsatélites**

Se obtuvo ADN a partir de 54 individuos (10 de la Depresión Central, 9 de la Llanura Costera del Pacifico, 13 de Montañas del Norte, 6 de la Sierra Madre, 8 de la Altiplanicie Central y 8 de la Llanura Costera del Golfo). Al realizar las colectas se observó que la distribución espacial de los individuos era, por lo general muy discontinua; es decir, los organismos se encuentran aislados unos de otros y son pocos los que se distribuyen en grupos. Generalmente, los individuos se localizaban en lugares altamente impactados como potreros, localidades rurales y agrícolas. Se utilizaron ocho marcadores microsatélites Aacu07, Aacu10, Aacu12, Aacu18, Aacu26, Aacu30, Aacu32 y Aacu35 (cita de origen), de los cuales solo cinco amplificaron (Aacu07, Aacu10, Aacu12, Aacu26 y Aacu35), sin embargo el cebador Aacu10 dio un patrón de bandas difíciles de interpretar por lo que fue omitido.

Los cebadores Aacu07 y Aacu12 presentaron cuatro alelos (138, 140, 150, 156 y 158, 166, 176, 184, respectivamente); el cebador Aacu35 presento tres alelos (200, 220, 230) y el cebador Aacu26, dos alelos (276, 300).

### **5.2.2. Pruebas genéticas**

La auto-correlación espacial entre distancias genéticas y geográficas no presentó un patrón lineal por lo que se rechaza la hipótesis de aislamiento por distancia, el coeficiente de la correlación ( $r^2$ ) fue de 0.03. En la gráfica se observa que la distancia causa un efecto en la diferenciación genética hasta los 90 km de distancia entre individuos. A una distancia mayor de 90km los valores promedio de diferenciación disminuyen (Fig. 15). La distancia genética entre los individuos

según el análisis de Roussets (2000) mostró que no hay una correlación significativa entre la distancia geográfica y la diferenciación genética.

Respecto a la prueba de Mantel, la correlación de las distancias genéticas y geográficas fue no significativa ( $r = -0.0324$  y  $P = 0.303$ ). En la prueba parcial de Mantel, la correlación entre las distancias genéticas y altitudinales controlando la distancia geográfica también careció de significancia estadística ( $r=0.0492$  y  $P=0.2500$ ).

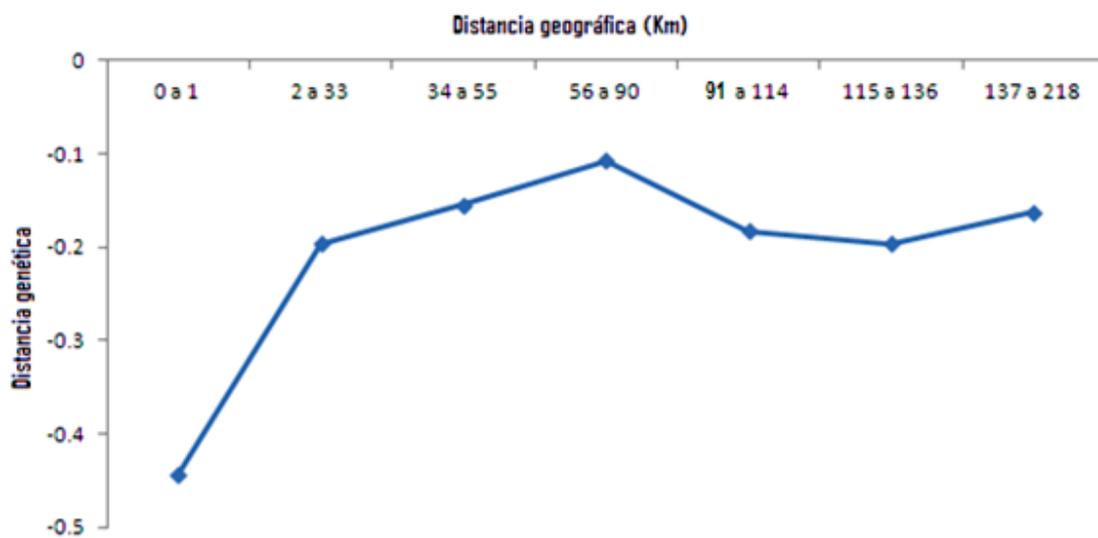


Figura 15.- Relación entre las distancias geográficas (km) y distancias genéticas Rousset, 2000) de *A. aculeata* en Chiapas

Para el análisis de asignamiento geográfico de poblaciones por método bayesianos y con base en la información genética de los individuos se generaron mapas considerando una K (número de poblaciones) con valores de 2 a 6. Los mapas de K=2, K=3 y K=4 mostraban una similitud genética entre la Llanura Costera del Golfo y la Llanura Costera del Pacifico, siendo diferentes de la Depresión Central. Los mapas de K=5 y K=6 mostraban patrones inconsistentes, por lo que no fueron considerados.

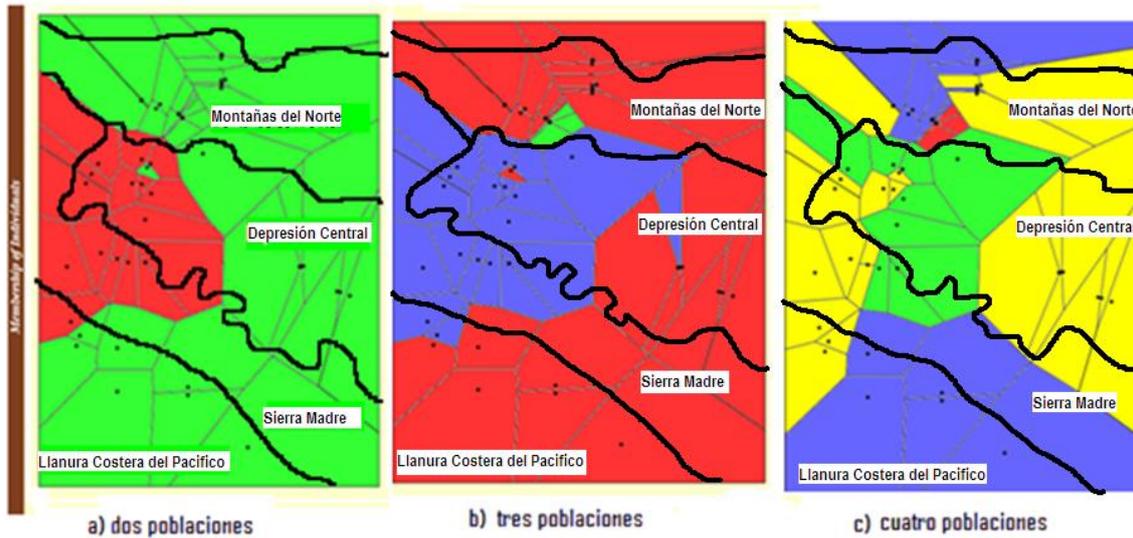


Figura 16. Mapas de agrupamiento geográfico y genético de poblaciones naturales de *A. aculeata* para diferente número de poblaciones,  $K=2, 3$  y  $4$ , respectivamente de acuerdo con el programa TESS 2.3 (Francois y Duran, 2010).

El mapa que agrupa a los individuos en dos y tres poblaciones (Fig. 16a y 16b, respectivamente) considera a los individuos de la Sierra Madre y Depresión Central como un grupo y los individuos de la Llanura Costera del Pacífico, Montañas del Norte, Altiplanicie Central y Llanura Costera del Golfo como otro grupo.

El mapa que agrupa en cuatro poblaciones (Fig. 16c) muestra que la Llanura Costera del Pacífico, las Montañas del Norte y la Llanura Costera del Golfo conforman un grupo, mientras que la Depresión Central, la Sierra Madre (NW) y la Meseta Central conforman el segundo grupo, una parte de la Depresión Central (NW), parte de la Sierra Madre y una muy pequeña parte de la Meseta Central (NE) conforman el tercero y un fragmento pequeño de las Montañas del Norte el cuarto y último grupo.

Con respecto a los análisis basados en genética de poblaciones, a nivel global la heterocigosidad observada ( $H_O$ ) fue de 0.557 (Error estándar,  $ES=0.060$ ), la heterocigosidad esperada ( $H_E$ ) fue de 0.429 ( $ES=0.031$ ), la riqueza alélica ( $R_t$ ) fue de 2.176 ( $ES=0.056$ ) y el coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) fue de -0.273 ( $ES=0.085$ ).

Al igual que a nivel global, la heterocigosidad observada ( $H_O$ ) en cada región fisiográfica fue mayor que la esperada ( $H_E$ ); siendo la Altiplanicie Central la que presentó los valores más altos ( $H_O =0.760$  y  $H_E =0.458$ ) y la Llanura Costera del Golfo los valores más bajos ( $H_O =0.469$  y  $H_E =0.400$ ) (Cuadro 5). La Sierra Madre tuvo el valor más alto de riqueza alelica ( $R_t=2.241$ ) y la Llanura Costera del Pacifico el valor más bajo ( $R_t=1.935$ )

Cuadro 5 .Valores de diversidad genética de *Acrocomia aculeata* en las regiones fisiográficas de Chiapas: Riqueza alélica ( $R_t$ ), heterocigocidad observada ( $H_O$ ), heterocigocidad esperada ( $H_E$ ) y coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ). Los valores entre paréntesis corresponden al error estándar.

|            | <b>DC</b>         | <b>SM</b>         | <b>LLCP</b>       | <b>AC</b>         | <b>MN</b>         | <b>LLCG</b>       |
|------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| <b>Rt</b>  | 2.023<br>(0.086)  | 2.241<br>(0.061)  | 1.935<br>(0.078)  | 2.170<br>(0.093)  | 2.117<br>(0.057)  | 2.154<br>(0.079)  |
| <b>Ho</b>  | 0.517<br>(0.152)  | 0.558<br>(0.117)  | 0.535<br>(0.178)  | 0.760<br>(0.200)  | 0.505<br>(0.135)  | 0.469<br>(0.148)  |
| <b>He</b>  | 0.392<br>(0.101)  | 0.446<br>(0.038)  | 0.391<br>(0.098)  | 0.458<br>(0.105)  | 0.490<br>(0.040)  | 0.400<br>(0.079)  |
| <b>FIS</b> | -0.276<br>(0.151) | -0.260<br>(0.232) | -0.289<br>(0.202) | -0.567<br>(0.186) | -0.106<br>(0.316) | -0.137<br>(0.185) |

El coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) para cada región fisiográfica presentó valores negativos, siendo la Altiplanicie Central la que presentó el valor más bajo con  $F_{IS}= -0.567$ , seguido de la Llanura Costera del Pacifico con un valor de  $F_{IS}= -0.289$

y la Depresión Central con  $F_{IS} = -0.276$  y el valor más alto lo presentaron las Montañas del Norte con  $F_{IS} = -0.106$ . Las pruebas de HW a nivel global y dentro de cada región resultaron no significativas.

La diferenciación genética a nivel global entre todas las regiones fisiográficas es moderada con un  $F_{ST} = 0.102$  ( $ES = 0.025$ ). En la comparación de diferenciación genética entre regiones, la Depresión Central presentó diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ , después de la corrección Bonferroni) con las Montañas del Norte ( $F_{ST} = 0.118$ ), con la Llanura Costera del Golfo ( $F_{ST} = 0.076$ ), con la Altiplanicie Central ( $F_{ST} = 0.070$ ) y con la Llanura Costera del Pacífico ( $F_{ST} = 0.030$ ), mientras que La Sierra Madre las presentó con las Montañas del Norte ( $F_{ST} = 0.083$ ) y la Llanura Costera del Golfo ( $F_{ST} = 0.088$ ) y finalmente la Llanura Costera del Pacífico con Altiplanicie Central ( $F_{ST} = 0.038$ ) y las Montañas del Norte ( $F_{ST} = 0.065$ ) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Valores de la diferenciación genética de *A. aculeata* entre las regiones fisiográficas en Chiapas. Los valores en negritas corresponden a los que resultaron significativos.

|             | <b>DC</b>    | <b>SM</b>    | <b>LLCP</b>  | <b>AC</b> | <b>MN</b> | <b>LLCG</b> |
|-------------|--------------|--------------|--------------|-----------|-----------|-------------|
| <b>DC</b>   | 0            |              |              |           |           |             |
| <b>SM</b>   | -0.109       | 0.000        |              |           |           |             |
| <b>LLCP</b> | <b>0.030</b> | 0.005        | 0.000        |           |           |             |
| <b>AC</b>   | <b>0.070</b> | -0.009       | <b>0.038</b> | 0.000     |           |             |
| <b>MN</b>   | <b>0.118</b> | <b>0.083</b> | <b>0.065</b> | -0.009    | 0.000     |             |
| <b>LLCG</b> | <b>0.076</b> | <b>0.088</b> | -0.028       | -0.010    | -0.025    | 0.000       |

El análisis de varianza molecular (AMOVA) muestra que el 3.49% de la variación genética se encuentra entre regiones y el 96.51% dentro de las regiones (Cuadro

7). El  $\Phi_{ST}$  (análogo a  $F_{ST}$ ) global estimado con AMOVA fue bajo de 0.035, pero estadísticamente significativo.

Cuadro 7. Análisis molecular de varianza (AMOVA) para *Acrocomia aculeata* en Chiapas. El valor de  $\Phi_{ST}$  es significativo ( $P < 0.01$ ).

| Fuente de variación                     | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Porcentaje de variación |
|---|--------------------|-------------------|-------------------------|
| Entre regiones                          | 5                  | 5.65              | 3.49                    |
| Dentro de las regiones                  | 102                | 70.2              | 96.51                   |
| <b>Total</b>                            | <b>107</b>         | <b>75.86</b>      |                         |
| <b><math>\Phi_{ST} = 0.03487</math></b> |                    |                   |                         |

## VI. DISCUSIÓN

### 7.1. Micropropagación y organogénesis

#### 7.1.1. Germinación

Las semillas de Villaflores de *A. aculeata* germinan en un 100% a los 17 días en medio MS (Murashige y Skoog, 1962), el porcentaje de germinación fue menor en semillas de La Sepultura y El Ocote (24% y 22% respectivamente).

Aunque los mecanismos que controlan la germinación y la latencia son desconocidos para la mayoría de las especies de *Arecaceae* (Meerow, 1990; Orozco-Segovia *et al.*, 2003), hay pruebas de latencia morfológica de algunas especies debido a la inmadurez del embrión (Baskin y Baskin, 1998; Hartmann *et al.*, 2002; Aguiar y Mendonça, 2002), dormición física impuesta por el endocarpo y latencia fisiológica (Hussey, 1958; Rees, 1962; Orozco-Segovia *et al.*, 2003; Pérez, 2009). Respecto a *A. aculeata* varias investigaciones han demostrado la viabilidad del cultivo *in vitro*. Sittolin y Cunha (1987) utilizan esta

técnica para generar plántulas con el propósito de generar un banco de germoplasma para evaluar el potencial de cultivo para la producción de aceite.

Flag (2008) observó que los embriones germinan fácilmente cuando son aislados de las semillas y cultivados *in vitro*, para evitar la existente posibilidad de que el embrión sea asociado con el entumecimiento por sustancias inhibitorias en la semilla u otros factores. Sin embargo, Ribeiro *et al.* (2010) observaron que estas estructuras con sustancias inhibidoras adyacentes al embrión no influyen en la germinación *in vitro* en la especie. Además, la producción de plántulas por esta ruta puede ser optimizada mediante el uso de reguladores de crecimiento (Ledo *et al.*, 2007), sin embargo, se sabe poco sobre el uso de estas sustancias en el desarrollo de las plantas cultivadas *in vitro* de *A. aculeata*.

Los resultados de este estudio son consistentes con trabajos de micropropagación en palmeras (Pereira *et al.*, 2006; Steinmacher *et al.*, 2007; Ledo *et al.*, 2007; Bandera, 2008, Soares *et al.*, 2011), puesto que se obtiene la germinación de todos los embriones viables y el tiempo de germinación *in vitro* es mucho menor que en condiciones *in situ*. Tabai *et al.* (1990) utilizaron el cultivo de embriones cigóticos para reducir el tiempo de germinación de las semillas de esta especie y obtuvieron al igual que Bandeira (2008) que los embriones germinan fácilmente con ayuda de la micropropagación. Rodríguez y Soares *et al.* (2011) obtuvieron la germinación de los embriones a los 60 días en medio MS, en su concentración y composición original, sin el uso de fitoreguladores, en este estudio se obtuvo un mayor porcentaje de germinación en menor tiempo bajo las mismas condiciones respecto al medio de cultivo.

Debido a que en condiciones naturales las poblaciones silvestres tardan hasta dos años para germinar, y la tasa de germinación es muy baja hasta del 5%

por racimos (Santiago, 1994); se han implementado diversos mecanismos de escarificación para elevar la tasa de germinación, donde el adelgazamiento de la testa a través del tracto digestivo de ganado vacuno (*Bos taurus* var. Holandes ) permitió que la germinación inicie a los 7 meses posteriores a la siembra, presentándose en un 6% (Orantes, 1999), otra forma para facilitar la germinación es limando la cáscara hasta adelgazarla, al remojar las semillas en agua tibia durante 2 o 3 semanas se observa la germinación al cabo de 4-6 meses (Santiago,1994). Con base en lo anterior la técnica de la micropropagación implementada es una herramienta eficaz para acelerar el tiempo de germinación de la especie.

Los datos de prueba de viabilidad, porcentaje de germinación (%G) y germinación acumulada (GA) de este estudio fueron consistentes, las semillas de la Sepultura fueron las que presentaron menor porcentaje de germinación posiblemente debido a que en la mayoría el embrión estaba muerto o existieron problemas de letargo. Las semillas pueden disminuir su porcentaje de viabilidad y germinación debido a la humedad, tipo de suelo, hongos y bacterias, García (2007) en su estudio sobre germinación y desarrollo de plántulas de especies forestales no logró obtener germinación de *A. aculeata* ni en el laboratorio ni en el invernadero, posiblemente por problemas de letargo o falta de algún requisito específico. Efectuó pruebas de campo que le permitieron obtener plántulas dos años después de haber sembrado las semillas. En la naturaleza la propagación de las semillas también es limitada debido a la inactividad, causada por la impermeabilidad de los tejidos de la semilla o fruto (Teixeira, 2005; Bandera, 2008) y al alto contenido de aceite (Hiane *et al.*, 2006), también son susceptibles al deterioro (Marcos Filho, 2005), retrasando así la producción de la germinación y

plántula. Santiago-Marroquín (1994) en su investigación sobre la germinación en *A. aculeata* en la región frailescana; observo que las semillas desnudas (escarificadas) sufrieron mayor daño por hongos y bacterias que las que se pusieron con el pericarpio y estaban protegidas por el endocarpio duro. Los mecanismos de deshidratación y rehidratación de semillas relacionados con la viabilidad del embrión pudieron tener un efecto en ausencia de germinación en las semillas. Rubio, *et al* (2012) observaron que los frutos que se secan durante nueve días son viables; pero después de 15 días de deshidratación, la semilla presenta pérdida de viabilidad y la imbibición de las semillas en agua destilada provoca la muerte de estas debido a los hongos.

### **7.1.2. Crecimiento y desarrollo**

#### ***Longitud de raíces***

La longitud de las raíces en plántulas de *A. aculeata* cultivadas en medio MS fue de 3,004cm (DS 2.37), en medio adicionado con 1.0 mg/L de ácido indolacético (AIA) y 0.3 mg/L de 6-Benciladenina (BA) la longitud de la raíz aumento en 1.388cm.

La producción de plántulas mediante la micropropagación se puede optimizar adicionando al medio de cultivo fitoreguladores (Ledo *et al.*, 2007). Las auxinas son un factor esencial en la promoción del crecimiento de las raíces, debido a que, en general, el AIA puede incrementar significativamente la elongación de segmentos aislados de raíces, tanto *in vitro* como *in vivo*, además de que incrementan su crecimiento (Pérez *et al.*,1999). Rojas y Ramírez (2001) observaron en raíces que se les inhibió el crecimiento radical pueden reanudarlo si se les aplican auxinas, o bien la inhibición del crecimiento radical provocado por

las mismas auxinas puede ser revocado, y aun puede ser estimulado el crecimiento con la adición de antagonistas auxínicos o antiauxinas. La principal auxina endógena en las plantas es el ácido indol acético, que se encuentra en niveles que varían la velocidad de las reacciones de síntesis, inactivación y destrucción y, a su vez, se ve afectada por varios factores fisiológicos tales como la edad y el desarrollo de la planta, las condiciones ambientales, y parte de la planta (Fachinello *et al.*, 1995). Hartmann y Kester (2000), especifican que la adición de auxinas a bajas concentraciones estimula el crecimiento de las plántulas

En este estudio las plántulas de *A. aculeata* en medio adicionado únicamente con AIA tuvieron un retraso en el crecimiento radicular (hasta en un 33.5%) esto se debe posiblemente a que la aplicación de un regulador a la planta no garantiza necesariamente un aumento en el enraizamiento, esto puede deberse a que la cantidad de auxina endógena ya es suficiente para promover el enraizamiento de los mismos (Kersten y Tavares Nachtigal, 1994). La respuesta a la aplicación de auxina exógena no sólo depende de la concentración, sino también la duración del tratamiento. Las variaciones entre el tiempo y las concentraciones pueden generar gran porcentaje de tratamientos de enraizamiento o llegar a ser tóxicos para las plantas (Ono y Rodrigues, 1996). Un exceso de auxinas puede suprimir la división y aun el crecimiento celular, provocando inhibición del crecimiento longitudinal, de hojas y de raíces tal como sucedió en plántulas de *Chysis bractescens* (Toledo, 2008).

En medio suplementado con BA el crecimiento de la raíz aumentaba a medida que la concentración de citocinina aumentaba, observándose un retraso

en el crecimiento de las raíces con respecto al medio sin reguladores, excepto en el medio adicionado con 3.0 mg/L de BA donde se obtuvo un incremento de 0.146cm, sin embargo representa solo el 71.72% del crecimiento obtenido en medio adicionado con 1.0 mg/L y 0.3 mg/L de BA, el cual presento el mayor crecimiento radicular.

En medios adicionados con 3.0 mg/L de AIA y 0.3 mg/L de BA, 0.3 mg/L de AIA y de BA, y 0.3 mg/L de AIA y 1.0 mg/L de BA se observo un incremento de 0.146cm, 0.263cm y 0.746 respectivamente (4.86%, 8.75% y 24.83% más que el medio sin adición de reguladores) pero este crecimiento sigue siendo menor que el obtenido en el medio adicionado con 1.0 mg/L y 0.3 mg/L de BA (representan un 71.72%, 74.38% y 85.38% respectivamente). En medio adicionado con 1.0 mg/L de AIA y de BA se observa un retraso del 55.1% (1.654cm) en el crecimiento de las raíces. El balance auxina-citocinina es un factor muy importante en la regulación del crecimiento por alargamiento o por división celular, siendo los efectos auxínicos en las plantas muchos y muy variados (Bidwell, 1979). En ausencia de citocininas la auxina provoca el alargamiento celular en los tejidos cultivados, pero en presencia de éstas se obtiene una división celular (Rojas y Ramírez, 2001).

Así también García *et al.*, (1993) mencionan que al cultivar en un medio donde la concentración menor sea de citocinina que de auxina o, en muchos casos, carente de citocininas se induce a la formación de raíces en la base de los tallos (rizogénesis), lo anterior es consistente con lo obtenido en este estudio. Una de las maneras más comunes para promover el equilibrio hormonal es la aplicación exógena de reguladores de crecimiento, con el objetivo de aumentar el

porcentaje de enraizamiento en el menor tiempo, con mayor número de raíces y mayor uniformidad en el enraizamiento (Boliani y Sampaio, 1998). Estas características reducen en última instancia, el tiempo dedicado a la participación en las camas de enraizamiento (Ferri, 1997) y la formación de plántulas (Alvarenga y Carvalho, 1983) que permite la producción de plántulas en menor tiempo (Fachinello *et al.*, 1995).

### **Número de raíces**

Respecto al desarrollo de las raíces, en este estudio se observó el mayor número de raíces en las plántulas que se encontraban en el medio MS sin adición de reguladores del crecimiento (3,75 raíces, DS 2.38). Los medios adicionados con AIA y/o BA mostraron un retraso en el desarrollo de las raíces. La interacción de citocinina/auxina provocó un efecto negativo en producción de raíces. Los medios adicionados con 3.0 mg/L de AIA + 0.3 mg/L de BA, y 0.3 mg/L de AIA +1.0 mg/L de BA fueron los que presentaron el mayor retraso en el desarrollo, un retraso del 60% (2.25 raíces), de tal manera que para que se desarrollen las raíces en *Acrocomia aculeata* no es necesario adicionar fitoreguladores, puesto que la adición es desfavorable.

Aunque la auxina AIA es muy inestable en las plantas y tal como sostiene Pierik, *et al.* (1984), con el tiempo AIA se descompone a la luz lo que significa que los primordios radicales producidos pueden desarrollarse posteriormente con facilidad, por lo que esta auxina se utiliza frecuentemente para el enraizado de las plantas herbáceas (Pierik, 1990), en *A. aculeata* la adición de la auxina AIA no es necesaria, puesto que en medios adicionados con AIA el crecimiento de las raíces representaba el 63.46% y 86.6% del crecimiento obtenido en el medio sin adición

de esta auxina. Hay especies en las que la adición de AIA no resulta favorable para el desarrollo y crecimiento de las raíces, Pierik y Sprenkels (1984), encontraron al trabajar con *Gerbera jamesonii* que la auxina AIA a altas concentraciones (5mg/L) provoca un bajo crecimiento de raíces mientras que ANA a bajas concentraciones (1mg/L) provocó un crecimiento favorable de raíces adventicias en raíces *in vitro* (Pierik, 1990).

Pese a que demostraron también que la mayor parte de las plantas necesitan auxinas para conseguir una regeneración radial eficaz, afirman que esta necesidad no es constante ya que después de la iniciación de la raíz (para la que se necesita elevada concentración de auxina) el desarrollo de los primordios radicales requiere una baja concentración, por ejemplo, en *Asparagus officinalis*, el alargamiento de las raíces adventicias disminuyó a medida que se fue aumentando la concentración de ANA. Al igual que en este estudio donde el aumento de AIA provocó menor desarrollo en las raíces. En *Chysis bractescens* (Orchidaceae) concentraciones de AIA y ANA elevadas causaron un efecto de inhibición sobre la aparición de raíces. Lo anterior concuerda con lo dicho por Thiman y Went (1934) quienes señalan que las auxinas generalmente ejercen el control primario en la formación de las raíces.

La adición de citocininas al medio no influyó en el desarrollo favorable de las raíces, el desarrollo disminuyó a medida que se aumentaba la concentración de BA, en *A. aculeata* la adición no es necesaria, puesto que en medios adicionados el crecimiento de las raíces fue menor que el obtenido en el medio sin adición de esta citocinina (en un 50.13% y 90.13%), esto coincide con lo obtenido por Hurtado y Merino (1987) quienes afirman que el papel de las citocininas en el crecimiento de las raíces es extremadamente limitado, pues al

tratar secciones de cultivo de raíz adicionadas con una citocinina combinada con auxinas da como resultado una estimulación de la división celular, lo que, sin embargo, normalmente no conduce a un incremento en la elongación de la raíz pero si a una estimulación en la división de las células que están destinadas a diferenciarse en tejidos vasculares. Bidwell (1994), menciona que probablemente las citocininas participan en el control del desarrollo del sistema vascular en las raíces, aspecto que no se ha determinado exactamente. En *Rubus* spp se observó mayor número de raíces en ausencia de BAP, el medio adicionado con 4 mg/L de BAP fue el que presento el menor número de raíces. Grattapaglia, *et al.* (1987) observo en especies de *Eucalyptus* que hay una correlación negativa entre el aumento de las concentraciones de BAP con la multiplicación y el número de raíces en las fases del enraizamiento *in vitro* (Villa, *et al.*, 2007). Weaver (1976), sostiene que aun cuando no se puede esperar que las citocininas estimulen el desarrollo de las raíces, ya que por lo común estimulan el desarrollo de brotes y se oponen al enraizamiento, se han presentado algunos informes en el sentido de que las bajas concentraciones de citocininas estimulan la iniciación de las raíces.

Aunque en este estudio la interacción de AIA y BA provocaron un retraso en el desarrollo de raíces en *Acrocomia aculeata*, es necesario experimentar con otras concentraciones para comprobar su efecto sobre esta especie, puesto que con otras especies se han observado resultados satisfactorios, Skoog y Miller (1957), demostraron *in vitro* que los cultivos de medula de tabaco requieren tanto citocininas como auxinas para su crecimiento, cuando la cantidad de citocininas es baja en proporción con las auxinas se produce el desarrollo en las raíces, cuando la cantidad de auxinas es elevada se forman primordios de raíces.

### **Longitud de hojas**

La longitud de las hojas en plántulas de *A. aculeata* cultivadas en medio MS fue de 5.383cm (DS 3.79), mientras que en medio adicionado con 1.0 mg/L de BA se observó un incremento de 1.221cm en la hoja (22.68%), lo cual coincide con Hurtado y Merino (1987) pues las citocininas estimulan el alargamiento de las hojas. Asimismo los resultados concuerdan con Velásquez (1999) quien al adicionar 1mg/L de BA en *Nicolaia elatior* obtuvo desarrollo de hojas largas y Miceli (1999) al trabajar con la orquídea *Encyclia cochleata* encontró que con respecto a la longitud de la hoja el uso de 2,4-D demostró efecto inhibitorio y la cinetina (0.5, 2.5 y 5 mg/L) influyo de manera proporcional en la longitud, estos incrementos fueron inversamente proporcionales a la concentración de la auxina. Weaver (1976) sostiene que probablemente las citocininas se sintetizan en las puntas de las raíces y se desplazan por el xilema hacia las hojas donde desempeñan importantes funciones en el metabolismo y envejecimiento.

En *A. aculeata* el desarrollo en la longitud de las hojas disminuyó a medida que se fue aumentando la concentración de AIA, tal como sucedió con *Chysis bractescens* donde un exceso de auxinas (3mg/L AIA+3mg/L ANA) provocó inhibición del crecimiento longitudinal, de hojas y de raíces en las plántulas (Toledo, 2008). *A. aculeata* posiblemente ya contiene de manera endógena las auxinas que requiere por lo cual la adición provocó un efecto negativo en su desarrollo. Aunque es necesario experimentar con concentraciones diferentes de auxinas y/o citocininas para determinar su efecto en esta especie. Torres (1987) menciona que los altos niveles de auxinas tienden a suprimir o reducir la

morfogénesis, siendo comúnmente el ANA menos inhibitorio para la morfogénesis que el AIA.

En este estudio en el medio adicionado con 0.3 mg/L de BA y 1.0 mg/L de AIA el incremento fue de 0.7cm (13%). La interacción de AIA y BA mostro un efecto negativo en el crecimiento longitudinal de la hoja, siendo la combinación de 0.3 mg/L de AIA y de BA donde se observó el retraso más significativo, un 53.4% que corresponde a 2.883cm menos. Salisbury (1978), considera que comúnmente la auxina AIA promueve el crecimiento de hojas, tal es el caso de los resultados obtenidos por Coello (2007) quien obtuvo que los reguladores ANA, AIA y BA (3:3:3 mg/L) promovieron una mayor longitud de las hojas en *Guariathe skinneri*. De igual forma Paek y Yeung (1991), obtuvieron formación y desarrollo de hojas en rizomas de *Cymbidium Forrestii* al aplicar la auxina ANA y la 6-benciladenina favoreció la formación de tallos y hojas. En plántulas de *Chysis bractescens* las concentraciones óptimas para la producción de hojas es 3 mg/L AIA + 3 mg/L BA (Toledo, 2008). Por tanto se observa que el efecto de las auxinas no es genérico para todas las especies y se comprueba que existe especificidad en tipo y concentración de la auxina adicionada.

### **Numero de hojas**

El número de hojas de *A. aculeata* en medio MS fue de 1.88 hojas (DS 1.30), se observó el mayor número de hojas en las plántulas que se encontraban en el medio adicionando con 1.0 mg/L de AIA, obteniéndose 3.75 hojas.

La adición de auxinas al medio, en proporciones de 0.3 mg/L y 1.0 mg/L provocaron un aumento en la proliferación de hojas en un 59.57% (1.12 hojas), siendo la adición de 1.0 mg/L de AIA donde se observo el mejor desarrollo, un

aumento del 99.46% respecto al medio sin adición de reguladores, lo cual se traduce en un incremento de 1.87 hojas.

La adición de citocininas al medio, en proporciones de 0.3 mg/L y 1.0 mg/L de provocaron un aumento de 0.37 y 0.75 hojas respectivamente (19.68% y 39.89%), aunque sigue siendo un porcentaje por debajo del obtenido adicionando al medio auxinas, adicionar 3.0 mg/L de BA causó un efecto negativo en la proliferación de hojas; un retraso del 7% (0.13 hojas) en el desarrollo de las hojas. En *Rubus* spp hubo mayor número de hojas en medio adicionado con 1,0 mg/L de BA, con el aumento en los niveles de BA hubo una disminución en el número de hojas (Villa *et al.*, 2008). Se obtuvieron resultados similares trabajando con el crisantemo, Oliveira (1994) observó disminución en el número de hojas con el aumento de las concentraciones de BA. Esto se puede atribuir al hecho de que BAP estimula la formación de más brotes, sin embargo, se observó la reducción de tamaño, con menor número de nodos y hojas (Villa, *et al.*, 2008)

Las interacciones de AIA y BA mostraron un efecto positivo en cuanto al número de hojas, excepto el medio adicionado con 0.3 de AIA y 3.0 de BA que arrojó el mismo resultado que el medio sin adición de reguladores, el exceso de BA provocó un efecto negativo al igual que lo obtenido con Costa y Aloufa (2007) donde no se observó crecimiento de hojas en el medio adicionado con 0.2 mg/L de AIA y 20 mg/L de BA. A diferencia de lo obtenido con *Chysis bractescens* (Orchidaceae), donde con una alta concentración de citocinina y baja de auxina (1mg/L ANA+3mg/L BA) se obtuvo una mayor proliferación de hojas (Toledo, 2008), al igual que Hurtado y Merino (1987) donde las citocininas estimulan el alargamiento de las hojas. En *Phoenix dactylifera* L donde la interacción de AIA y

BA en medio adicionando con 0.05 mg/L de AIA y 5 mg/L de BA provoco la aparición de las hojas (Costa y Aloufa, 2007) y no difiere significativamente del medio adicionado con 0.1 mg/L de AIA y 10 mg/L de BA (Costa y Aloufa, 2007, Aloufa y Oliveira, 1989).

## **7.2 Análisis genético**

A pesar del potencial económico, social y ecológico, poco se sabe acerca la biología reproductiva, y la estructura genética de en *A. aculeata*. La ausencia de resultados de amplificación de los cebadores Aacu18, Aacu30 y Aacu32 se debe posiblemente a que los linajes de *A. aculeata* de Brasil y Chiapas están ampliamente diferenciados; por ello los cebadores carecieron de la capacidad de anillarse al lugar del marcador en el genoma. Este resultado confirma la necesidad de una revisión sistemática detallada de la especie y que incluya elementos de sistemática molecular, para determinar si las poblaciones ubicadas en Chiapas y las de Sudamérica pueden ser consideradas como la misma especie.

### **7.2.1. Diferenciación genética**

El análisis mostró que hay diferenciación genética baja pero significativa entre las regiones fisiográficas de Chiapas para esta especie. Esta diferenciación entre regiones puede deberse a la existencia de adaptaciones locales de la especie o a una huella genética por efectos de cambios geológicos y paleoclimáticos. Debido a esto, la creación de un banco de germoplasma de las diferentes regiones

fisiográficas del Estado de Chiapas sería muy recomendable para conservar la diversidad genética de cada región.

El análisis de varianza molecular mostró una alta variación genética entre individuos dentro de las regiones, lo cual concuerda con otros estudios en la misma especie (Oliveira, *et al.*; 2012, Gonçalves, *et al.*, 2012). En su estudio Nucci *et al.* (2008) observaron que la diversidad genética entre las poblaciones fue mayor dentro de las regiones que entre ellas, con un  $F_{ST}=0.25$ .

En este estudio, se rechazó el modelo de aislamiento por distancia para *A. aculeata*. De acuerdo con los resultados obtenidos, los individuos localizados en regiones lejanas están menos diferenciados que algunos localizados en regiones cercanas. Estos resultados podrían deberse a que se traten de linajes independientes con un nivel de diferenciación alto, por tanto habría que realizar estudios sobre linajes poblacionales basados en secuencias para poder establecer si hay un origen común entre los grupos. Según los resultados de  $F_{ST}$  (diferenciación) y de asignamiento bayesiano, los individuos de *A. aculeata* de la región Llanura Costera del Pacífico y las Montañas del Norte (regiones ampliamente separadas geográficamente) son más similares entre sí que con regiones aledañas. Este resultado fue confirmado también con la carencia de correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica. Gonçalves *et al.* (2012) en su estudio en São Paulo y Minas Gerais, Brasil, agruparon las poblaciones en dos o tres grupos cercanos geográficamente. Mientras que Nucci *et al.* (2008) observaron tres agrupamientos distintos relacionados con la distancia geográfica. Por su lado, Oliveira *et al.* (2008) encontraron que las poblaciones más cercanas genéticamente eran las que estaban más cerca geográficamente.

### 7.2.2. Diversidad genética

En este estudio se detectó un exceso de heterocigotos dentro de cada región y en el análisis global. Las causas más probables para el exceso de heterocigotos son la selección a favor de heterocigotos, la polinización cruzada exclusiva (como en especies auto-incompatibles) y la poliploidia (Stevens *et al*; 2007). El exceso de heterocigotos observados aquí es poco probable que se explique por la hipótesis de selección a favor de heterocigotos puesto que los loci de los microsatélites carecen de función aunque alguno podría estar ligado a los genes bajo el efecto de selección. La poliploidia no ha sido reportada para *Acrocomia*. Respecto al sistema de polinización, esta palma tiene un sistema de apareamiento mixto pues puede efectuar la autopolinización al igual que la polinización cruzada (Nucci, 2007). Scariot *et al* (1991) observó en su trabajo que la autopolinización es observada en palmas aisladas, especialmente las cultivadas, que producen semillas fértiles. Sin embargo, Linhart (2000) sostiene que es posible que *A. aculeata* posea algún tipo de mecanismo de auto-incompatibilidad que limita la auto-polinización; considero que, este último escenario es el más probable para explicar los resultados que señalan exceso de heterocigotos.

Se podría pensar que la presencia de heterocigotos en exceso se debió a que para ese análisis se están considerando como poblaciones a los individuos colectados en la misma región geográfica los cuales no representan una población biológica. Sin embargo, está ampliamente demostrado por la teoría de la genética de poblaciones que el analizar individuos de poblaciones diferenciadas como pertenecientes a una misma población provoca una deficiencia de heterocigotos; a lo cual se le conoce como el efecto de Wahlund (Hartl, 2000)

Las pruebas de equilibrio HW para cada región fisiográfica fueron no significativas, a pesar de que los datos muestran exceso de heterocigotos. Lo anterior puede deberse a que el número de marcadores utilizados resultaron insuficientes para detectar la desviación del equilibrio de manera estadística. En este estudio se utilizaron todos los marcadores disponibles para la especie (Nucci, 2007), por lo que se recomienda el diseño de más marcadores para la evaluación de poblaciones norte y centroamericanas.

Nucci (2007) en su evaluación de poblaciones brasileñas de *A. aculeata* encontró la presencia de altos niveles de endogamia, con desviaciones significativas de HW. Esto contrasta con lo observado en el presente estudio. Esta diferencia podría deberse a que las poblaciones muestreadas por Nucci (2007) pese a encontrarse aisladas presentan una escasez de polinizadores, otra causa podría ser que existan diferencias intrínsecas de los linajes de la especie o hasta podrían tratarse de especies diferentes lo cual puede ser confirmado mediante estudios genéticos.

### **7.3 Implicaciones para el manejo de *A. aculeata***

Según la norma oficial (NOM-059-SEMARNAT-2011), *A. aculeata* se encuentra bajo la categoría de amenazada. Entre los motivos para ello encontramos que las poblaciones naturales de esta especie estén siendo seriamente disminuidas por su aprovechamiento, además que presenta baja tasa de germinación y a que es poco común que llegue a formar grandes palmares (Quero 1994; Cabrera 1991). A pesar de que una palma de cuatro años de edad puede producir anualmente de cuatro a seis racimos, que contienen en promedio 200 a 400 frutos (Santiago,1994), la semilla necesita un proceso de escarificación para poder

germinar (Orantes, 1999; Cabrera, 1991) y exhibe una baja tasa de sobrevivencia porque es atacada por el hongo *Pestalotia sp.* que le causa la muerte (Zuart-Macías *et al.*, 1999). Con base en lo anterior y en lo observado en este estudio, se considera necesaria la implementación de estrategias para un manejo adecuado de la especie.

La embriogénesis es una vía de desarrollo *in vitro* que presenta una serie de ventajas sobre otras técnicas utilizadas para la regeneración de palmas. Esta técnica tiene gran potencial para superar las limitaciones observadas al tratar de propagar clonalmente estas plantas utilizando yemas basales (Viñas y Jiménez, 2011). En este estudio, el cultivo de embriones bajo las condiciones *in vitro* implementadas promovió la germinación de *A. aculeata* en menos de tres semanas; es una alternativa para la producción y uso comercial de esta especie puesto que se obtiene una germinación uniforme y acelerada, al mismo tiempo que se generan plántulas que posteriormente pueden establecerse en plantaciones para ser aprovechadas. Otra ventaja es que adicionar AIA o BA al medio incrementa la longitud o el número de hojas o raíces lo cual puede ser muy útil cuando se desea producir dichas estructuras; las hojas se utilizan en la confección de arreglos florales, prendas de vestir y sogas, las raíces para tratar padecimientos como la diabetes ya que contienen un hipoglucémico también llamado coyolosa (Pérez *et al.*, 1997).

En este estudio, los individuos de *A. aculeata* se encontraron como plantas aisladas, en las que predomina la fertilización cruzada (inferida por la tendencia a la exogamia) posiblemente por autoincompatibilidad (Gonçalves *et al.*, 2012; Scariot *et al.*, 1995). La autoincompatibilidad puede provocar la extinción de poblaciones aisladas, fragmentadas o dispersas (Weller, 1994; Peñas *et*

*al.*, 2011). En mi opinión, el patrón de distribución espacial altamente aislado y fragmentado, así como la presencia de autoincompatibilidad unido a la baja tasa de germinación y al aprovechamiento descontrolado de la especie en Chiapas hacen necesaria la creación de un banco de germoplasma y un programa de regeneración con base a la tecnología *in vitro* demostrada en el presente trabajo. El banco de germoplasma debe de considerar las sutiles diferencias en diversidad encontradas entre las regiones del estado de Chiapas para su adecuada conservación (Reed *et al.*, 2004). Así mismo, es necesario que el programa de regeneración de las poblaciones considere la diferenciación genética detectada en este estudio.

Finalmente, se requieren estudios futuros para establecer si la especie *A. aculeata* de México es la misma que la que se encuentra en Centro y Sudamérica, puesto que la ausencia de resultados en la amplificación de los cebadores puede sugerir que se trate de un linaje diferente, haciendo necesario el diseño de marcadores específicos para poblaciones Mexicanas que arrojen los datos precisos para poder establecer los criterios a considerar en su manejo. El género *Acrocomia* se reporta como uno de los menos estudiados por instituciones mexicanas (Molina y Córdova, 2006).

## VII. CONCLUSIONES

- Se observó presencia de *A. aculeata* en la Llanura Costera del Golfo, Sierra Madre, Depresión Central, Meseta Central, Montañas del Norte y la Llanura Costera del Pacifico del Estado de Chiapas.
- Los embriones de semillas de *A. aculeata* que presentan un 98% de viabilidad, germinan bajo condiciones *in vitro* en 11 días.
- Se obtienen plántulas de *A. aculeata* en 17 días a partir de embriones cultivados *in vitro*.
- Adicionando 1.0 mg/L de ácido indolacético y 0.3 mg/L de 6-Benciladenina la longitud de la raíz aumenta en 1.388cm.
- La interacción de citocinina/auxina provoco un efecto negativo en producción de raíces. Para obtener un mayor número de raíces no es necesario adicionar reguladores del crecimiento.
- En medio adicionado con 1.0 mg/L de BA se observa un incremento de 1.221cm en la longitud hoja.
- La adición de 1.0 mg/L de AIA se traduce en un incremento de 1.87 hojas.
- Es necesario el diseño de marcadores específicos para poblaciones Mexicanas y Centroamericanas de *A. aculeata*, debido a que los marcadores publicados (Nucci *et al.*, 2008) tuvieron baja eficiencia de amplificación y uno resultó en un patrón difícil de interpretar.
- Se requieren estudios futuros para establecer si la especie *A. aculeata* de México es la misma que la que se encuentra en Sudamérica, puesto que la ausencia de resultados en la amplificación de los cebadores puede sugerir que no se trate de la misma especie.

- La diferenciación genética de *A. aculeata* a través del paisaje en Chiapas es baja pero detectable, y está poco influenciada por la distribución espacial; se rechaza el modelo de aislamiento por distancia y se detectaron niveles mayores de diferenciación entre grupos de individuos aledaños que entre grupos alejados entre sí.
- Existe una alta variación entre individuos dentro de la región, pero muy poca variación entre regiones. Se considera que los individuos de la Sierra Madre y Depresión Central conforman un grupo genético y los individuos de la Llanura Costera del Pacífico, Montañas del Norte, Altiplanicie Central y Llanura Costera del Golfo otro, a pesar de su distanciamiento geográfico.
- Las regiones fisiográficas se encuentran en equilibrio HW, presentan exogamia.

## VIII. LITERATURA CITADA

- Aguilar M. y Mendonça M. S. 2002. Aspectos morfo anatómicos de embriones de *Euterpe precatória* Mart. durante el proceso germinativo. *Acta Basílica Botánica* 16: 241-249
- Aguirre, P. E. 2007. Flujo Genético: Métodos Para Estimarlos y Marcadores Moleculares. Pp. 49-61. En: Ecología Molecular. Eguiarte, L., V. Souza y X. Aguirre (Compiladores). 1ª Edición. Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT y CONABIO. México, D. F.
- Al-Khayri J.M. 2005. Date Palm *Phoenix dactylifera* L. In Protocols of Somatic Embryogenesis in Woody Plants, Jain, S.M. and P.K. Gupta (Eds.) Berlin. Springer 309-318.
- Aloufa M. A. I. & L. M. A. Oliveira. 1989. *In vitro* embryo culture of date palm. In Congresso de Ciências da UFRN, 1. Natal, Rio Grande do Norte. Anais.
- Alvarenga L. R y Carvalho V.D. 1983. Uso de substâncias promotoras de enraizamiento de estacas frutíferas. Informe Agropecuario, *Belo Horizonte* v.9, 101: 47-55.
- Andrade-Cetto A. y Heinrich M. 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J. Ethnopharmacol* 99: 325–248

- Aristone F. 2006. Farinha da polpa de macaúba guia completo e livro de receitas (Manual didático). UFMS/CNPq, Campo Grande, MS.
- Balick M. J. 1990. Production of coyol wine from *Acrocomia mexicana* (Arecaceae). *Economic Botany* January–March v. 44, 1: 84-93.
- Bandeira F. S. 2008. Cultivo *in vitro* e embriogênese somática de embriões zigóticos de macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Loddiges). Viçosa, Minas Gerais – Brasil. Tese (Doutorado em Ciência Florestal) Curso de Pós-graduação em Ciência Florestal, Universidade Federal de Viçosa, MG.
- Baskin C.C y Baskin J.M. 1998. *Seeds. Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. San Diego, CA, USA: Academic Press.*
- Belén-Camacho D.R., Herrera S., Castillo A., Moreno-Álvarez M.J., García D. y Medina C. 2005. Características físicas y químicas del fruto de la coroba (*Jessenia polycarpa* Karst): una especie oleífera venezolana. *Grasas y Aceites* 56(4): 317-323.
- Belén-Camacho D. R., López I., García D., González M., Moreno-Álvarez M. J. y Medina C. 2005. Evaluación fisico-química de la semilla y del aceite de corozo (*Acrocomia aculeata* Jacq.). Venezuela.

- Bewley J.D. y Black M. 1994. *Seeds: Physiology of Development and Germination*. Plenum Press, New York.
- Bidwell R. G. S. 1979. *Plant Physiology*. MacMillan Publishing Co., New York.
- Boliani A. C. y Sampaio V. R. 1998. Efeitos do estiolamento basal e do uso do ácido indol-butírico no enraizamento de estacas de nespereira (*Eriobotrya japonica* Lindley). *Cultura Agronômica*, ilha solteira, v.7, 1: 51-63.
- Borcioni-Elis B. N. y Raquel R. B.N. 2012. Aplicação de análogo de brassinosteróide (Biobras 16®) sobre a germinação e crescimento *in vitro* de embriões zigóticos e aclimatização de plântulas de bocaiuva. Brasil. *Ciência Rural Santa Maria* v.42, 2: 270-275.
- Cabrera C. T. 1991. *Plantas de Chiapas, Coyol*. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. México. *YASHTE IHN* 6:1-4.
- Chorfi B. L. E. y Colombo C. A. 2009-2012. *Macaúba: palmeira nativa como opção bioenergética*. *Pesquisa & Tecnologia*, vol. 9:2.
- Coello, G. C. Y. 2007. Tesis: Cultivo *in vitro* de la orquídea *Guarianthe skinnery* Lindel (Flor de candelaria). UNICACH. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Pp. 31-42

- Colombo C. A. 2011. "Diversidade genética e seleção de matrizes com ensaios de progênies da palmeira macaúba para produção biodiesel". *Pesquisa & Tecnologia*, vol. 9:2.
- Costa N. M. y Aloufa M. A. 2007. Desenvolvimento in vitro de embriões zigóticos de tamareira. *Revista Ciência Agronômica*, Fortaleza-Ceará, v.38, 3: 276-279.
- Cullings, K.W. 1992. Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. *Molecular Ecology* 1:233-240.
- Dransfield J, Uhl NW, Amussen CB, Baker WJ, Harley M, Lewis CL. 2008. Genera Palmarum. The evolution and classification of palms. Kew: *Royal Botanic Gardens*.
- Eeuwens C. J. 1978. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured in vitro. *Physiologia Plantarum*, v. 36:23-28.
- Esquivel Humberto., Ibrahim Muhammad., Harvey Celia A., Villanueva Cristóbal., Tamara Benjamín y Fergus L. Sinclair. 2003. Árboles dispersos en potreros de fincas ganaderas en un ecosistema seco de Costa Rica. *Agroforestería en las Américas*, vol 10, 39: 40.

Excoffier L., Smouse P.E. and Quattro J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.

Excoffier L. y Lischer H. E. L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour* 10:564-567

Fachinello J. C., Hoffmann A., Nachtigal J. C., Kersten E. y Fortes G.R. 1995. Propagação de plantas frutíferas de clima temperado. 2a ed. Ufpel, Pelotas, Brasil.

Ferri C. P. 1997. Enraizamento de estacas de citrus. Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Cruzadas Almas, v.19, 1:113-121.

François O. & Durand E. 2009. Tess version 2.3 - Reference Manual [Documentation file, online]. Document last modified in August, 2009 (accessed on June 13, 2012). Available at <http://membres-timc.imag.fr/Olivier.Francois/manual.pdf>

García J. L., Troncoso J., Sarmiento R., Troncoso A. 2002. Influence of carbon source and concentration on the in vitro development of olive zygotic embryos and explants raised from them. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* v. 69: 95-100.

García J. L. 2007. Influence of carbon source and concentration on the in vitro development of olive zygotic embryos and explants raised from them. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, 69:95-100. Golstein y Pollock.

Gonçalves A. A., Geribello P. R. E., Azevedo-Filho J. A., Nucci S. M., Maria I maculada Zucchi M. I., Marques C. R. M. and Colombo C. A. 2012. *Genetics and Molecular Biology Online Ahead*. Sociedade Brasileira de Genética. Printed in Brazil.

Goudet J. 2002. FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). Lausanne: University of Lausanne, Department of Ecology & Evolution, 2002.

Grattapaglia, D., Nassar, N.M.A. and Dianese, J.C. (1987). Biosistemática de espécies brasileiras do gênero *Manihot* baseada em padrões de proteína de semente. *Ciênc. Cult.* 39: 294-300.

Haines A. H. 2004. Evidence on the structure of coyolosa. Synthesis of 6,6'-ether linked hexoses. *Tetrahedron Letters* 45: 835–837.

Hardy, O.J. & X. Vekemans. 2002. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes* 2(4): 618-620.

- Hartl, D. L. 2000 Fly meets shotgun: Shotgun wins. *Nature Genetics* 24: 327-328.
- Hartmann, H. T y D. E. Kester. 1994. Propagación de plantas. 2ª edición. Editorial CECSA. México. Pp.74-197.
- Hamilton, M., E. Pincus, A. Di Fiore y R. C. Fleischer. 1999. Universal Linker and Ligation Procedures for Construction of Genomic DNA Libraries Enriched for Microsatellites. *BioTechniques* 27: 500-507.
- Hartmann H. T., Kester D. E.; Davis Junior F. T., Genever R. L. 2002. *Plant propagation: principles and practices*. 7 ed. New York: Englewood Clippis.
- Henderson A, Galeano G, Bernal R. 1995. Palms of the Americas. Princeton University Press, Princeton.
- Hiane P.A., Baldasso P. A., Marangoni S y Macedo R. M. L. 2006. Bocaiúva, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd., pulp and kernel oils: characterization and fatty acid composition. *Brazilian Journal of Food Technology, Campinas*, v.8, 3: 256-259.
- Holderegger R, Wagner HH. 2008. Landscape genetics. *BioScience*, 58, 199–207.

- Holderegger R, Kamm U, Gugerli F. 2010. Adaptive vs. neutral genetic diversity: implications for landscape genetics. *Landscape Ecology*, 21, 797–807.
- Hurtado D. M. y Merino. 1987. Cultivo de Tejidos Vegetales. 1ª edición. Trillas. México.
- Hussey G. 1958. An analysis of the factors controlling the germination of the seed of the oil palm, *Elaeis guineensis* (Jacq.). *Annals of Botany*, v.22, p.259-286.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2012. Base de datos. México, INEGI.
- Kersten E.; Tavares S. W. y Nachtigal J.C. Influência do ácido indolbutírico no enraizamento de estacas de ameixeira (*Prunus salicina* Lindl). *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.16, n.1, p.215-222, 1994.
- Ledo A. S., Lameira O. A., Benbadis A. K., Menezes I. C., Ledo C. A. & Oliveira M. P. 2001. Cultura *in vitro* de embriões zigóticos de açaizeiro. Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 23 (3): 468-472
- Ledo A. S., Gomes K. K. P., Barboza S. B. S. C., Vieira G. S. S., Tupinambá E. A. y Aragao W. M. 2007. Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e aclimatação de plântulas de coqueiro-anão. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.42, 2:147-154.

- Linhart Y. B. 2000. Variation in woody plants; molecular markers, evolutionary processes and conservation biology. In: Jain SM and Minocha SC (eds) Molecular Biology of Woody Plants. Kluwer, Dordrecht, pp 341-373.
- Lorenzi H., Souza H. M., Costa J. T. M., Cerqueira L. S. C., Ferreira E. 2004. Palmeiras brasileiras e exóticas cultivadas. Instituto Plantarum, Nova Odessa.
- Lorenzi G. M. A. C. 2006. *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex. Mart.—  
Arecaceae: bases para o extrativismo sustentável. Universidade Federal do Paraná, Brasil.
- Ly C. J., Sarmiento F. L. y Santos R. R. 2005. Las palmas como fuente de alimento de los cerdos en el trópico. Universidad autónoma de Yucatán. México.
- Manel S., Schwartz M., Luikart G. y Taberlet P. 2003. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. Trends in Ecology & Evolution, 18, 189–197.
- Marcos Filho J. M. 2005. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Piracicaba: Fealq. 495p.
- Meerow A. W. Palm seed germination. Florida: Institute of Food and Agricultural Sciences, 1991.

Melo B., Pinto J. E. B. P., Luz J. M. Q., Peixoto J. R. y Juliatti F. C. 2001. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura *in vitro* de embriões da guarirobeira (*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc). *Ciência e Agrotecnologia*, v. 25 (6): 1301-1306

Missouri Botanical Garden. 2005. *Acrocomia aculeata* Disponível em: <<http://www.mobot.mobot.org/cgi-bin/search>>

Molla M. M. H. *In vitro* coconut (*Cocos nucifera* L.) embryo culture in Bangladesh. *Biotechnology*, v.3, p.98-101, 2004.

Moraes M., Galeano G., Bernal R., Balslev H. & Henderson A. 2001. Tropical Andean palms. In: Churchill, S., Balslev, H, Forero, E. & J.L. Luteyn (eds.), *Biodiversity and Conservation of Neotropical Montane Forests*. New York Botanical Garden Press, New York, pp. 473-488,

Moura E. F., Ventrella E. y Yoshimitsu M. S. 2010. Anatomia, histoquímica e ultra-estrutura da semente e do embrião somático de *Acrocomia aculeata* (Arecaceae).

Moura E. F. Embriogênese somática em macaúba: indução, regeneração e caracterização anatômica. 2008. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento), Viçosa: UFV.

- Mulleried, F.K.G. 1957. La geología de Chiapas. Gobierno Constitucional del Estado de Chiapas. Chiapas, México. 180 pp
- Murashige, T. & F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 15 v.15, p.473-497
- Nucci S. M. Desenvolvimento, caracterização e análise da utilidade de marcadores microssatélites em genética de população de macaúba. 2007. 84f. Dissertação (Mestrado em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia) – Curso de Pós-graduação em Agricultura Tropical e Subtropical – Instituto Agrônômico de Campinas – IAC, Campinas, SP.
- Nucci S. M., Azevedo-Filho J.A., Colombo C.A., Priolli R.H.G., Coelho R.M., Mata T.L. and Zucchi M.I. 2008. Development and characterization of microssatellites markers from the *Acrocomia aculeata*. *Molecular Ecology Notes*, Online Early Articles.
- Oliveira D. A., De Paula M. F. B., Pimenta M. A. S. y Braga R. F. 2008. Variabilidade genética de populações de fava d'anta (*Dimorphandra mollis*) da região norte do estado de Minas Gerais. *Rev. Árvore* 32: 355-363.
- Oliveira F. A. Produção de óleos vegetais de macaúba e seus co-produtos na região metropolitana de Belo Horizonte. 1994. In: 3º Congresso

Brasileiro de Plantas Oleaginosas, óleos, Gorduras e Biodiesel, Varginha.

Ono, E. O.; Rodrigues, J. D. 1996. Aspectos da fisiologia do enraizamento de estacas caulinares. FUNEP, Jaboticabal, Brasil, 83 pp.

Orantes - García, C. 1999. Importancia de la testa y el endocarpo en la latencia de *Acrococomicia mexicana* ex martius (Coyol). Tesis Licenciatura. Escuela de Biología. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas.

Orozco-Segovia A., Batis M., Rojas-Aréchiga A. Mendoza. 2003. Seed biology of palms: a review. *Principes*. 47:79-94.

Paek y Yeung. 1991. Protocorm or rhizome? The morphology of seed germination in *Cymbidium dayanum* Reichb. Department of Botany, National Museum of Natural Science, Taichung, Taiwan 404, Republic of China.

Peakall R., & Smouse P. E. 2006. GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes* 6:288-295

Pech-Ake A., Maust B., Orozco-Segovia A., Oropeza C. 2007. The effect of gibberellic acid on the *in vitro* germination of coconut zygotic embryos

and their conversion into plantlets. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, v. (43):247-253, 2007.

Pennigton T. y J. Sarukhan, 1968. Manual para la identificación de campo de los principales árboles tropicales de México. 1ª edición. Editorial INIFFAO. Mexico. Pp.94-95.

Pérez-Núñez, M. T.; Chan J. L., Saénz L., González J. L., Verderil

J. L., Oropeza C. 2006. Improved somatic embryogenesis from *Cocos nucifera* (L.) plumule explants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, v. 42:37-43.

Pereira J.E.S., Ribeiro B.i I., Jessé R. Y., Silva M.L. y Karle dos Santos E. 2006. Germinação de embriões zigóticos de murmuru (*Astrocaryum ulei*). *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v.30 (2):251-256.

Pierik RLM, Steegmans HHM (1984) Vegetative propagation of *Nidularium fulgens* Lem. in vitro. *Netherl. J. Agric. Sci.*32: 101-106. Pierik RLM, Steegmans HHM, Hendriks J. 1984. The influence of naphthaleneacetic acid on the growth of in vitro-cultivated seedling of Bromeliaceae. *Sci. Hort.* 24: 193-1

Pierik, R. L. M. 1990. Cultivo in vitro de las plantas superiores. 3ª edición, Editorial Mundi-prensa, Madrid España. 326pp.

- Pierik RLM, Sprenkels PA (1984) Micro-propagation of *Tilland-sia cyanea*. J. Bromel. Soc. 28: 9-12
- Pott, A. & Pott, V.J. 1994. Plantas do Pantanal. Embrapa-CPAP/Embrapa-SPI, Corumbá/Brasília
- Puker, Anderson, Rodrigues, Sérgio Roberto, Floriano Tiago, Elison, Teixeira dos Santos, Wilson. 2009. Espécies de Scarabaeidae fitófagos (Insecta: Coleoptera) associadas ao sistema radicular de *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Mart. (Arecaceae) *Biota Neotropica* [en línea] 2009, 9 (Septiembre-Sin mes).
- Quero J. H. 1994. Flora de Veracruz. Fascículo 81, octubre. Instituto de ecología. A.C. Jalapa. Veracruz. Pp. 10-15
- Quero J. H. 1994. Las palmas de México: Presente y Futuro. Boletín de la sociedad de México. No.55.. Pp.123-127
- Quero J. H. 1999. Currents status of mexican palms. Principes. Vol 36(4). Pp. 203-216.
- Ramírez, N. 2002. Reproductive phenology, life forms, and habitats of the Venezuelan central plain. *Am. J. Bot.* 89: 836–842

Ramos, M. I. L.; Ramos Filho, M. M.; Hiane, P. A.; Braga Neto, J. A.; Siqueira, E. M. A. Qualidade nutricional da polpa de bocaiúva *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 28, p. 90 - 94, 2008.

Rarepalmseed, 2005. *Acrocomia aculeata* Disponível em: <<http://www.rarepalmseeds.com/pix/AcrAcu.shtml>>. Acesso em: 10 out. 2011

Rees, A.R. High-temperature pre-treatment and the germination of seed of the oil palm, *Elaeis guineensis* (jacq.). *Annals of Botany*, London, v.26, p.569-581, 1962.

Ribeiro L. M., Garcia Q. S. y Oliveira D. M. T. 2010 .Estruturas da semente e germinação in vitro de embriões de macaúba *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex. Mart. Universidade Estadual de Montes Claros (Unimontes). Campus Universitário Professor Darcy Ribeiro, Montes Claros, MG. Anais., Montes Claros, MG.

Rodrigues, F. A.; Soares, J. D. R.; Pasqual, M.; Nunes, C. F.; Araujo, A. G. Germinação de embriões e crescimento inicial in vitro de macaúba. *Ciência Rural* , Santa Maria, v.41, n.5, p.1-6, 2011

Rodríguez, G.A.; Rodríguez, J.P. ; Ferrer-Paris, J.F. & Sánchez, J.R. 2012. A nation-wide standardized bird survey scheme for Venezuela. *TheWilsonJournal of Ornithology*, 124: 230-244.

Rojas - Garcidueñas M. y H. Ramírez. 2001. Control Hormonal del Desarrollo de las Plantas. 2ª edición. Limusa Noriega Editores. México.

Rousset F. 2000. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol Ecol Resources* 2008;8:103-106. [cited 2010 December 1]. Available from

Rubio Neto, A.; Silva, F.G.; Sales, J.F.; Reis, E.F.; Silva, M.V.V.; Souza, A.L. Effect of drying and soaking fruits and seeds on germination of macaw palm (*Acrocomia aculeata* [Jacq.] Loddiges ex MART.). *Acta Scientiarum Agronomy*, v. 34, n. 2, p. 179-185, 2012

Sáenz, L., Herrera-Herrera, G., Uicab-Ballote, F., Chan, J. L. and Oropeza, C. 2010. Influence of form of activated charcoal on embryogenic callus formation in coconut (*Cocos nucifera*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 100: 301-308.

Salisbury E .J. 1978. The reproductive capacity of plants. G. Bell and Sons, London

- Samosir, Y. M. S., Godwin, I. D. and Adkins, S. W. 1998. An improved protocol for somatic embryogenesis in coconut (*Cocos nucifera* L.). *Acta Horticulturae* 461: 467-474.
- Santiago-Marroquín G. 1994. El coyol, un recurso fitogenético de la Frailesca, Chiapas. Tesis Licenciatura, Ciencias Agronómicas Campus 5, Universidad Autónoma de Chiapas.
- Sarasan, V., Ramsay, M. M. and Roberts, A. V. 2002. *In vitro* germination and induction of direct somatic embryogenesis in 'Bottle Palm' [*Hyophorbe lagenicaulis* (L. Bailey) H.E. Moore], a critically endangered Mauritian palm. *Plant Cell Reports* 20: 1107-1111.
- Scariot A. O., Lleras E and Hay J. D. 1991. Reproductive biology of the palm *Acrocomia aculeata* in Central Brazil. *Biotropica* 23:12-22.
- Scariot A.O., Lleras E and Hay J. D. 1998. Flowering and fruiting phenologies of the palm *Acrocomia aculeata*: patterns and consequences. *Biotropica* 27:168-173.
- SEMARNAT [Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales]. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-ECOL-059-2010, que determina las especies nativas de México de flora y fauna silvestres-categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo. *Diario Oficial de la Federación*.

- Silva V. dos S. 2002. Regeneração *in vitro* de embriões de *Cocos nucifera* L. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, São Paulo.
- Silva B. L. A. 2005. Análise físico-química lipídica e morfologia das amêndoas das sementes da munguba (*Pachira aquatica* aubl.). Revista UNI - Imperatriz (MA), v. 1(1): 63-74.
- Sittolin I. M., Cunha L. H. S. 1987. Cultura de embriões de macaúba (*Acrocomia sp.*) *in vitro* visando a implantação de um banco ativo de germoplasma. In: Simposio Nacional de Cultura de Tecidos Vegetais, Brasília.
- Skoog, F., and Miller, C.O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures *in vitro* . Symp. Soc. Exp. Biol. 11, 118–131
- Soares J. D. R., Rodrigues F. A., Pasqual M., Nunes C. & Araujo A. G. D. 2011. La germinación y el crecimiento temprano de los embriones *in vitro* macaúba. *Ciencia Rural Santa María*, V.41, 5: 773-778.
- Sosnowska, Joanna, Balslev, Henrik. American palms used for medicine, in the ethnobotanical and pharmacological publications *Revista Peruana de Biología [en línea]* 2008, 15 (Noviembre-Sin mes)

- Spera, S. P., Buhrfeind, E. D. & Pennebaker, J. W.. 2001. Expressive writing and coping with job loss. *Academy of Management Journal*, 37, 722–733
- Stevens, M. T., Waller, D. M., and Lindroth, R. L. 2007. Resistance and tolerance in *Populus tremuloides*: genetic variation, costs, and environmental dependency. *Evol. Ecol.* 21:829–847
- Steinmacher D.A. 2005. Germinação *in vitro*, criopreservação e embriogênese somática em pupunha. 2005, 125p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais), Florianópolis: UFSC.
- Sugimura y Salvaña M. 1989. Induction and growth of callus derived from rachilla explants of young inflorescences of coconut palm. *Canadian Journal of Botany* 67: 272-274.
- Tabai S., Melo M., Crocomo O.J. 1990. Control of somatic embryos formation the palm macaúba (*Acrocomia aculeata*). In: *international congress plant tissue and cell culture 7*, Amsterdam.
- Tabai S. A. 1992. Propagação da palmeira macaúba *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Loddiges. através de métodos *in vitro*. Dissertação (Mestrado em Ciências), Piracicaba: ESALQ.

- Teixeira J. B., Söndhal, M. R. y Kirby, E. G. 1994. Somatic embryogenesis from immature inflorescences of oil palm. *Plant Cell Reports*, v. 13: 247-250.
- Teixeira L. C. 2005. Potencialidades de oleaginosas para produção de biodiesel. *Informe Agropecuário*, v. 26, 229:18-27.
- Thiman, K.V. and F.W. Went. 1934. On the chemical nature of the root-forming hormone. *Proc. K. Ned. Acad. Wet. Ser. C Biol. Med. Sci.* **37**: 456-459
- Toledo E. X. E. 2008. Micropropagación de *Chysis bractescens* Lindley. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Escuela de Biología. Tuxtla Gutierrez, Chiapas.
- Torres K. C. 1989. Tissue Culture Techniques for horticultural crops, Ed. An A VI Book U. S. A. 66.
- Trénel P., M.M. Hansen, S. Normand & F. Borchsenius 2008. Landscape genetics, historical isolation and cross-Andean gene flow in the wax palm *Ceroxylon echinulatum* (Arecaceae). *Molecular Ecology* (en prensa).
- Tzec-Sima MA, Orellana R & Robert ML (2006) In vitro Rescue of isolated embryos of *Bactris major* Jacq. and *Desmoncus orthacanthos* Mart., potentially useful native palms from the Yucatan Peninsula (Mexico). *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 42:54-58.

- Vendramin, G.G., Anzidei, M., Madaghiele, A. & Bucci, G. 1996. Distribution of genetic diversity in *Pinus pinaster*. A it. As revealed by chloroplast microsatellites. *Theoretical and Applied Genetics*, 97, 446 –563
- Velásquez, H. E. 1996. Cambios en el uso del suelo y pérdida de la biodiversidad en el siglo XX en la Sierra de Santa Marta. En R. Cervigni y F. Ramírez (coords.): *Desarrollo sustentable y conservación de la biodiversidad: un estudio de caso en la Sierra de Santa Marta, Veracruz*. Proyecto Sierra de Santa Marta/Global Environment Facility/Centro Internacional para el Mejoramiento de Maíz. México. pp. 28-52
- Wright S. 1978. Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16:97-159.
- Zuart-Macías J. L., Ponce-Díaz P., Santiago-Marroquín G. and Quiroga- Madrigal R. 1999. Coyol palm (*Acrocomia mexicana*), a phylogenetic resource from Chiapas, México. *Acta Hort. (ISHS)* 486: 305-312
- Zucchi MI, Brondani RV, Pinheiro, JB, Coelho ASG, Chaves LJ and Vencovsky R 2003. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian cerrado utilizing SSR markers. *Genetics and Molecular Biology* 26:449-458

## IX. APÉNDICES

### Apéndice 1. Semillas de *A. aculeata*



Apéndice 2. Palmas de *A. aculeata*

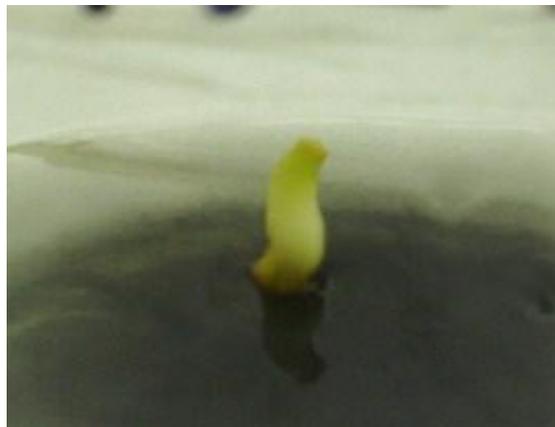


### Apéndice 3. Datos de colecta

| <b>Muestras</b> | <b>Región</b> | <b>Coordenadas geográficas</b> |                |
|-----------------|---------------|--------------------------------|----------------|
| 1               | p1            | 16° 45' 47.7"                  | 93° 27' 29.7"  |
| 2               | p1            | 16° 45' 42.6"                  | 93° 30' 44.9"  |
| 3               | p1            | 16° 45' 47"                    | 93° 45' 6.9"   |
| 4               | p1            | 16° 48' 29.3"                  | 93° 43' 38.6"  |
| 5               | p1            | 16° 51' 25.3"                  | 93° 41' 54.5"  |
| 6               | p1            | 16° 42' 32.9"                  | 93° 24' 21.3"  |
| 7               | p1            | 16° 34' 7.1"                   | 93° 26' 54.6"  |
| 8               | p1            | 16° 52' 9.8"                   | 93° 27' 8.5"   |
| 9               | p1            | 16° 50' 58.4"                  | 93° 25' 39.1"  |
| 10              | p1            | 16° 51' 46.1"                  | 93° 24' 34.8"  |
| 11              | p2            | 16° 21' 22.5"                  | 93° 26' 33.4"  |
| 12              | p2            | 16° 21' 3.9"                   | 93° 26' 51.4"  |
| 13              | p2            | 16° 21' 16.3"                  | 93° 31' 31.6"  |
| 14              | p2            | 16° 22' 14.5"                  | 93° 35' 20.4"  |
| 15              | p2            | 16° 22' 31.3"                  | 93° 35' 47.4"  |
| 16              | p2            | 16° 24' 18"                    | 93° 40' 2.4"   |
| 17              | p3            | 16° 03' 20.3"                  | 93° 50' 45.8"  |
| 18              | p3            | 15° 59' 33.5"                  | 93° 47' 58.9"  |
| 19              | p3            | 15° 56' 18.2"                  | 93° 48' 21.7"  |
| 20              | p3            | 16° 20' 55.5"                  | 93° 51' 57.6"  |
| 21              | p3            | 15° 55' 12.05"                 | 93° 35' 12"    |
| 22              | p3            | 15° 41' 6.91"                  | 93° 12' 44.32" |
| 23              | p3            | 15° 43' 23.8"                  | 93° 12' 43.75" |
| 24              | p3            | 15° 42' 22.3"                  | 93° 35' 12"    |
| 25              | p3            | 15° 25' 56.38"                 | 92° 53' 52.8"  |
| 26              | p4            | 16° 20' 46.2"                  | 92° 36' 3.7"   |
| 27              | p4            | 16° 20' 46.2"                  | 92° 36' 3.7"   |
| 28              | p4            | 16° 20' 46.2"                  | 92° 36' 3.7"   |
| 29              | p4            | 16° 20' 43.5"                  | 92° 35' 15.6"  |
| 30              | p4            | 16° 12' 45.8"                  | 92° 24' 12.6"  |
| 31              | p4            | 16° 12' 37.5"                  | 92° 23' 20"    |
| 32              | p4            | 16° 11' 57.5"                  | 92° 20' 50"    |
| 33              | p4            | 16° 54' 39.9"                  | 93° 7' 33.4"   |
| 34              | p5            | 17° 5' 37.4"                   | 93° 14' 18.5"  |
| 35              | p5            | 17° 5' 47.9"                   | 93° 14' 36.5"  |
| 36              | p5            | 17° 5' 47.9"                   | 93° 14' 36.5"  |
| 37              | p5            | 17° 5' 37.4"                   | 93° 14' 18.5"  |
| 38              | p5            | 17° 6' 21.3"                   | 93° 15' 13.4"  |
| 39              | p5            | 17° 6' 21.3"                   | 93° 15' 13.4"  |
| 40              | p5            | 17° 6' 21.3"                   | 93° 15' 13.4"  |
| 41              | p5            | 17° 6' 21.3"                   | 93° 15' 13.4"  |
| 42              | p5            | 17° 6' 21.3"                   | 93° 15' 13.4"  |

|    |    |                |                |
|----|----|----------------|----------------|
| 43 | p5 | 17° 10' 31.8"  | 93° 27' 5.8"   |
| 44 | p5 | 17° 10' 31.8"  | 93° 27' 5.8"   |
| 45 | p5 | 17° 9' 8.1"    | 93° 21' 58.2"  |
| 46 | p5 | 17° 08' 35.6"  | 93° 22' 38.2"  |
| 47 | p6 | 17° 14' 17.64" | 93° 01' 20.21" |
| 48 | p6 | 17° 15' 04.17" | 93° 01' 26.78" |
| 49 | p6 | 17° 16' 17.92" | 93° 01' 18.95" |
| 50 | p6 | 17° 16' 53.57" | 93° 00' 40.04" |
| 51 | p6 | 17° 1' 55.81"  | 93° 01' 01.83" |
| 52 | p6 | 17° 23' 14.71" | 93° 01' 23.31" |
| 53 | p6 | 17° 24' 10.63" | 93° 01' 48.72" |
| 54 | p6 | 17° 24' 10.63" | 93° 01' 48.72" |

Apéndice 4. Semillas desnudas de *A. aculeata* y embriones germinando.



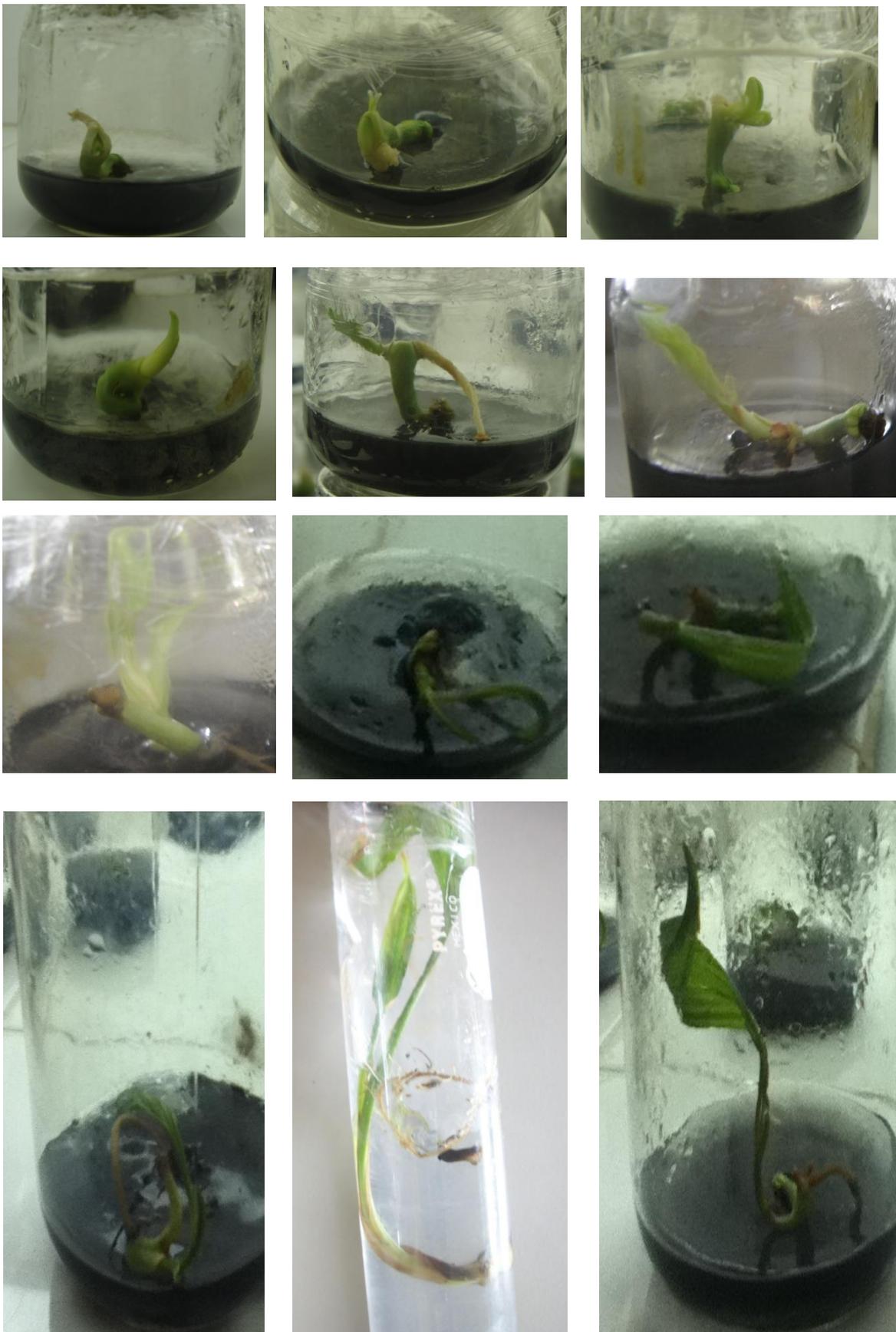
Apéndice 5. Taxonomía de *A. aculeata*

|                      |                |
|----------------------|----------------|
| <b>Reino</b>         | <b>Plantae</b> |
| <b>Subreino</b>      | Tracheobionta  |
| <b>Superdivision</b> | Spermathophyta |
| <b>Division</b>      | Magnoliophyta  |
| <b>Clase</b>         | Liliopsida     |
| <b>Subclase</b>      | Arecidae       |
| <b>Orden</b>         | Arecales       |
| <b>Familia</b>       | Arecaceae      |
| <b>Subfamilia</b>    | Arecoideae     |
| <b>Tribu</b>         | Cocoeae        |
| <b>Subtribu</b>      | Bactridinae    |
| <b>Género</b>        | Acrocomia      |
| <b>Especie</b>       | Aculeata       |

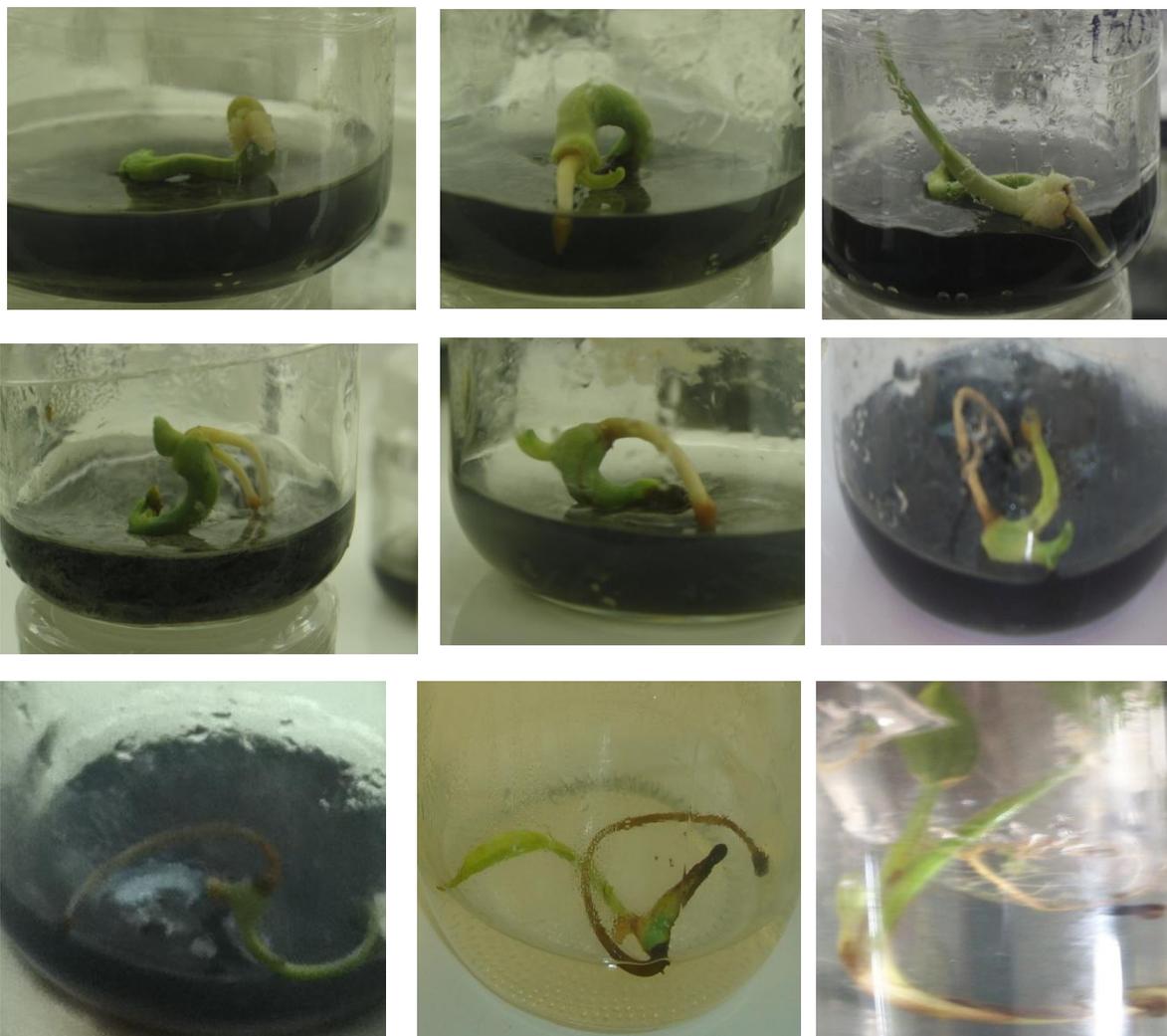
Apéndice 6. Sinonimia de *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. (Henderson et al., 1995)

- ❖ *Acrocomia antiguana* L.H. Bailey
- ❖ *Acrocomia antioquensis* Posada-Arango
- ❖ *Acrocomia belizensis* L.H. Bailey
- ❖ *Acrocomia christopherensis* L.H. Bailey
- ❖ *Acrocomia chunta* Covas & Ragonese
- ❖ *Acrocomia erisacantha* Barb. Rodr.
- ❖ *Acrocomia fusiformis* Sweet
- ❖ *Acrocomia glaucophylla* Drude
- ❖ *Acrocomia grenadana* L.H. Bailey
- ❖ *Acrocomia hospes* L.H. Bailey
- ❖ *Acrocomia ierensis* L.H. Bailey
- ❖ *Acrocomia intumescens* Drude
- ❖ *Acrocomia karukerana* L.H. Bailey
- ❖ *Acrocomia lasiospatha* Mart.
- ❖ *Acrocomia media* O.F. Cook
- ❖ *Acrocomia mexicana* Karw. ex Mart *Acrocomia microcarpa* Barb. Rodr.
- ❖ *Acrocomia mokayayba* Barb. Rodr.
- ❖ *Acrocomia odorata* Barb. Rodr.
- ❖ *Acrocomia panamensis* L.H. Bailey
- ❖ *Acrocomia pilosa* León
- ❖ *Acrocomia quisqueyana* L.H. Bailey
- ❖ *Acrocomia sclerocarpa* Mart.
- ❖ *Acrocomia sclerocarpa* var. *wallaceana* Drude
- ❖ *Acrocomia spinosa* (Mill.) H.E. Moore
- ❖ *Acrocomia subinermis* León ex L.H. Bailey
- ❖ *Acrocomia totai* Mart.
- ❖ *Acrocomia ulei* Dammer
- ❖ *Acrocomia viegasii* L.H. Bailey
- ❖ *Acrocomia vinifera* Oerst.
- ❖ *Acrocomia wallaceana* (Drude) Becc.
- ❖ *Bactris globosa* Gaertn.
- ❖ *Cocos aculeatus* Jacq.
- ❖ *Cocos fusiformis* Sw.
- ❖ *Palma spinosa* Mill.

Apéndice 7.- Desarrollo de hojas en plántulas micropropagadas de *A. aculeata*



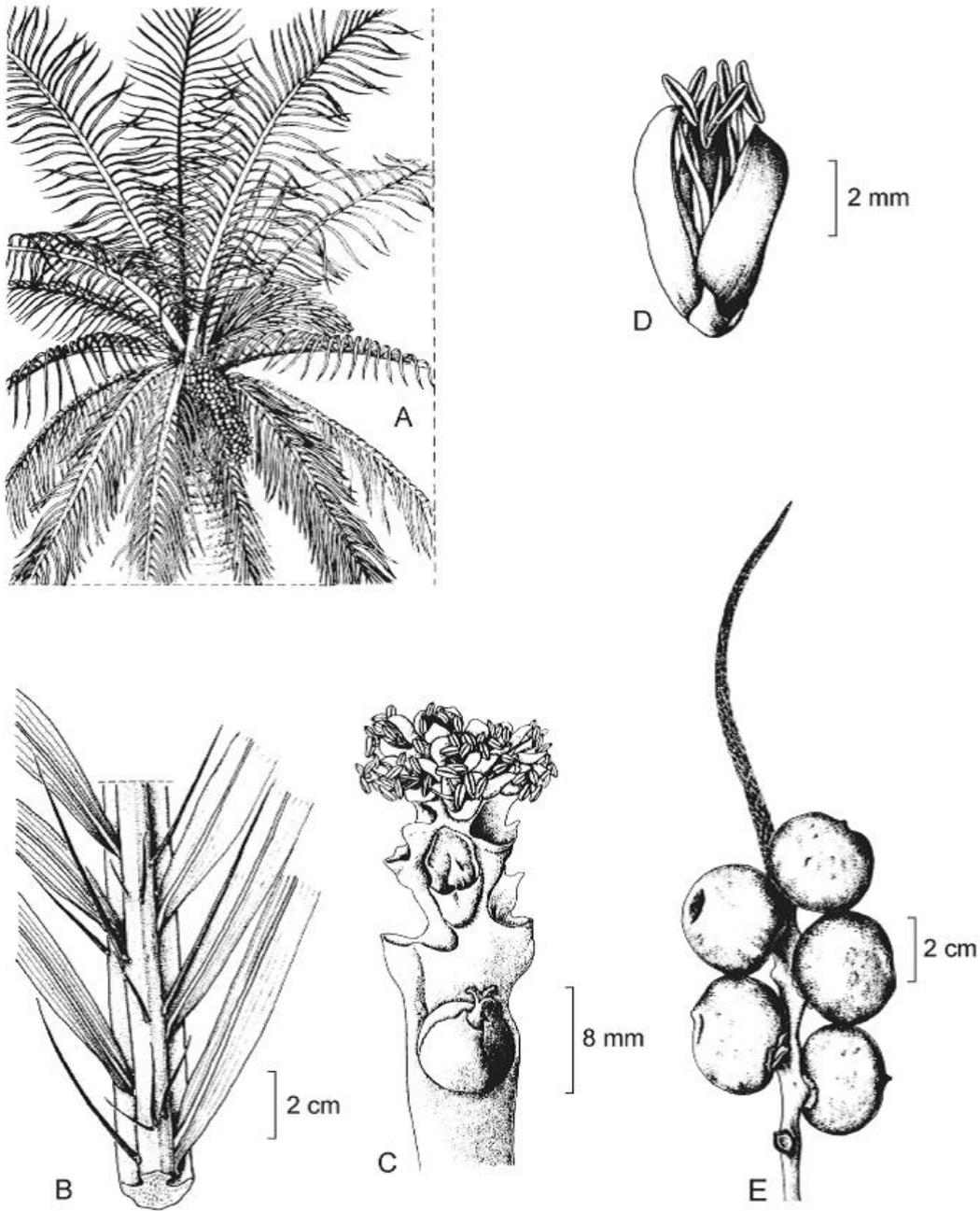
Apéndice 8. Desarrollo de raíces en plántulas micropropagadas de *A. aculeata*.



Apéndice 9. Análisis de varianza (ANOVA)

|                  |              | Suma de cuadrados | gl  | Media cuadrática | F     | Sig. |
|------------------|--------------|-------------------|-----|------------------|-------|------|
| Longitud de raíz | Inter-grupos | 248,794           | 15  | 16,586           | 5,159 | ,000 |
|                  | Intra-grupos | 1183,040          | 368 | 3,215            |       |      |
|                  | Total        | 1431,834          | 383 |                  |       |      |
| Número de raíz   | Inter-grupos | 178,102           | 15  | 11,873           | 2,695 | ,001 |
|                  | Intra-grupos | 1621,125          | 368 | 4,405            |       |      |
|                  | Total        | 1799,227          | 383 |                  |       |      |
| Longitud de hoja | Inter-grupos | 401,546           | 15  | 26,770           | 3,064 | ,000 |
|                  | Intra-grupos | 3206,606          | 367 | 8,737            |       |      |
|                  | Total        | 3608,153          | 382 |                  |       |      |
| Número de hojas  | Inter-grupos | 120,539           | 15  | 8,036            | 2,630 | ,001 |
|                  | Intra-grupos | 1124,458          | 368 | 3,056            |       |      |
|                  | Total        | 1244,997          | 383 |                  |       |      |

Apéndice 10. Flor masculina y femenina de *A. aculeata*.



*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. A. aspecto general de la copa de la planta; B. sección de una hoja; C. raquilla de la inflorescencia mostrando una flor femenina en la parte inferior y varias masculinas en la superior; D. flor masculina; E. raquilla con frutos. Ilustrado por Manuel Escamilla y reproducido del fascículo 81 de la Flora de Veracruz.