



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO**

---

---

---

**DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA**

**INSTITUTO DE HORTICULTURA**

**CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA, MOLECULAR Y EVALUACIÓN DE  
RESPUESTAS DEL CULTIVO *IN VITRO* DE "COYOL" (*Acrocomia mexicana* Kraw  
ex Marti)**

**TESIS**

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA**



DIRECCION GENERAL ACADEMICA  
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES  
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

**PRESENTA:**

**ANTONIO MAGDIEL VELAZQUEZ MENDEZ**



**Instituto de Horticultura**

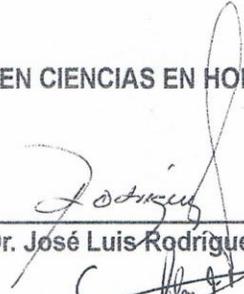
**NOVIEMBRE DEL 2013**

**Chapingo, Estado de México**

CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA, MOLECULAR Y  
EVALUACIÓN DE RESPUESTAS DEL CULTIVO *IN VITRO* DE  
"COYOL" (*Acrocomia mexicana* Kraw ex Marti)

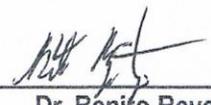
Tesis realizada por el M. en B. Antonio Magdiel Velázquez Méndez, bajo la  
dirección del Comité Asesor indicado, aprobado por el mismo y aceptada  
como requisito parcial para obtener el grado de :

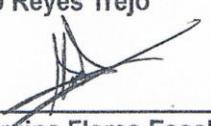
DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

Director:   
Dr. José Luis Rodríguez de la O

Asesor:   
Dr. Juan Porfirio Legaria Solano

Asesor:   
Dr. José Guadalupe Álvarez Moctezuma

Asesor:   
Dr. Benito Reyes Trejo

Lector externo:   
Dra. Georgina Flores Escobar

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo por las facilidades otorgadas en mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento otorgado para mis estudios de Doctorado en Ciencias en Horticultura en el Instituto de Horticultura del Departamento de Fitotecnia.

Al Dr. José Luis Rodríguez de la O por su dirección en este trabajo de investigación, por su impulso y apoyo incondicional siempre otorgado para con mi persona durante mis estudios y trayectoria académica.

Al Dr. Juan Porfirio Legaria Solano por su asesoría en la parte correspondiente a la Caracterización Molecular de esta Investigación, así como por sus valiosas aportaciones.

Al Dr. José Guadalupe Álvarez Moctezuma, por su apoyo y asesoramiento en esta investigación, así como por sus valiosos consejos.

Al Dr. Benito Reyes Trejo, por su valioso apoyo, consejos y disposición para desarrollar siempre la investigación del proyecto de investigación doctoral.

A la Dra. Georgina Flores Escobar por sus aportaciones durante la revisión de este trabajo de investigación.

A mis padres Emma Méndez de León y Guadalupe Arael Velázquez Calderón por darme la vida y todo el apoyo incondicional

A mis hermanas Teresa y Mayra por su apoyo y cariño

A mi esposa María del Socorro Chacón Martínez y mis hijos Antonio y Natalia por ser mi fortaleza.

A mi amigo el Dr. Davis Sigfrido por su amistad

A las autoridades de la Universidad Tecnológica de la Selva por otorgar el apoyo y las facilidades para poder realizar mis estudios Doctorales

## **DATOS BIOGRÁFICOS**

ANTONIO MAGDIEL VELÁZQUEZ MÉNDEZ; es originario del Estado de Chiapas, estudió la Licenciatura en Biología en la Universidad de Ciencias y Artes del Estado de Chiapas, obteniendo el grado en 1999. Estudió la maestría en Biotecnología en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chiapas, obtuvo el grado en el año de 2003.

Desde el año de 2000 a 2003 trabajó en Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez como docente en el área de Biotecnología y a partir del año 2003 a la fecha pertenece a la División Agroalimentaria como docente e investigador de Tiempo Completo en la Universidad Tecnológica de la Selva del Estado de Chiapas.

## CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA, MOLECULAR Y EVALUACIÓN DE RESPUESTAS DEL CULTIVO *IN VITRO* DE “COYOL” (*Acrocomia mexicana Kraw ex Marti*)

### CHARACTERIZATION PHYTOCHEMICAL, MOLECULAR AND EVALUATION OF RESPONSES *IN VITRO* CULTURE OF “COYOL” (*Acrocomia mexicana Kraw ex Marti*).

Antonio Magdiel Velázquez Méndez<sup>1</sup>

José Luis Rodríguez de la O<sup>2</sup>

#### RESÚMEN

Se realizó la caracterización, fitoquímica, molecular y cultivo *in vitro* de “coyol”, con el objetivo de conocer los metabolitos secundarios presentes en raíces y evaluar su potencial hipoglucémico, así mismo determinar las variaciones en las poblaciones de palmas silvestres en el Sureste de México utilizando la técnica de RAPDs. También realizar el cultivo *in vitro* de embriones cigóticos para el establecimiento de un protocolo de propagación. Mediante análisis cromatográfico de los extractos (hexano, cloroformo y metanol) preparados de esta planta, se aislaron e identificaron  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, y manitol identificado como su derivado acetilado por medio de un estudio de difracción de rayos-X. Así mismo en fracciones estudiadas del extracto de metanol, se encontró la mayor actividad hipoglucemiante en ratas Wistar. Se estudiaron 36 colectas de “coyol” del Sureste de México por medio de la técnica de RAPDs, permitió la separación en cuatro grupos discretos. El coeficiente de parentesco (CR) varió de 0.48 entre algunas poblaciones hasta el de 0.90 entre genotipos de otras poblaciones. Embriones cigóticos cultivados *in vitro* se desarrollaron completamente en plántulas a las 12 semanas con un  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de Bencil adenina con  $0.5 \text{ mg.L}^{-1}$  de cinetina. Se germinaron *in vitro* hasta un 77.7 % de embriones cigóticos.

#### PALABRAS CLAVE:

*Acrocomia*, caracterización, fitoquímica, hipoglucemiante,  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, *in vitro*.

#### ABSTRACT

Phytochemical characterization was performed, and evaluation molecular responses *in vitro* culture of “coyol”, in order to meet secondary metabolites present in roots of “coyol” and evaluate their potential hipoglucémico, also determine variations in populations of wild palms in Southeast Mexico, using the RAPDs technique. Also be cultured zygotic embryos *in vitro* to establish a protocol for transmission. By chromatographic analysis of extracts (hexane, chloroform and methanol) preparations of this plant were isolated and identified  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, and mannitol identified as their acetyl derivative through a study of X-ray diffraction. Also fractions of methanol extract studied. We found the highest activity hypoglycemic activity in Wistar rats. We studied 36 collections of “Southeastern Mexico “coyol” through RAPDs technique allowed the separation into four discrete groups. The kinship coefficient (CR) ranged from 0.48 among some populations to 0.90 between genotypes from other populations. *In vitro* cultured zygotic embryos developed into plantlets completely at 12 weeks of culture with  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  Bencil adenin combined with  $0.5 \text{ mg.L}^{-1}$  kinetin. Was obtained up to 77.71 % of germinated zygotic embryos,

#### KEYWORDS:

*Acrocomia*, Characterization, phytochemistry, hypoglycemic,  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, *in vitro*.

Alumno<sup>1</sup>  
Director<sup>2</sup>

## CONTENIDO

	PÁGINA
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
Objetivos.....	3
Hipótesis.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Clasificación de “coyol”.....	7
Descripción.....	6
Distribución geográfica de “coyol”.....	7
Hábitat.....	7
Fenología.....	8
Polinizadores y dispersadores.....	8
Importancia económica.....	9
Multiplicación y cultivo.....	10
Uso de marcadores genéticos moleculares en palmas (Arecaceae).	11
I.FITOQUÍMICA Y EFECTO HIPOGLUCÉMICO DE EXTRACTOS DE “COYOL” ( <i>Acrocomia mexicana Kraw ex Marti.</i> ) EN RATAS WISTAR.....	16
RESÚMEN.....	16
ABSTRACT.....	16
INTRODUCCIÓN.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
Colecta.....	19
Preparación de extractos.....	19
Preparación de animales para experimento biodirigido.....	20
Efecto hipoglucémico de extractos.....	21
Percolación de extracto de metanol.....	22
Acetilación de la fracción F5.....	23
Aislamiento del exaacetato de manitol.....	23

Identificación del $\beta$ -sitoesterol y estigmasterol.....	24
Análisis estadísticos.....	24
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
CONCLUSIONES.....	34
LITERATURA CITADA.....	35
II. DETERMINACIÓN DE POLIMORFISMOS DE “COYOL” ( <i>Acrocomia mexicana Kraw ex Marti</i> ) MEDIANTE RAPDs.....	37
RESÚMEN.....	37
ABSTRACT.....	37
INTRODUCCIÓN.....	39
MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
Colecta de material vegetativo.....	41
Extracción del ADN.....	41
Purificación del ADN.....	42
Mezcla de reacción de la PCR para la obtención de los patrones RAPDs.....	43
Amplificación del ADN.....	44
Separación del ADN por medio de la electroforesis en geles.....	44
Análisis de datos.....	45
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
CONCLUSIONES.....	52
LITERATURA CITADA.....	53
III.- EVALUACIÓN DE RESPUESTAS DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE “COYOL” ( <i>Acrocomia mexicana Kraw ex Marti</i> ).....	55
RESÚMEN.....	55
ABSTRACT.....	55
INTRODUCCIÓN.....	57
MATERIALES Y MÉTODOS.....	60
Colecta y preparación del material vegetativo.....	60
Efecto de agentes antioxidantes en el control <i>in vitro</i> de fenolización de embriones cigóticos.....	61

Evaluación de desarrollo <i>in vitro</i> de embriones cigóticos procedentes de siete 7 regiones del sureste de México.....	62
Medio de cultivo.....	62
Influencia del efecto del tiempo de almacenamiento en el desarrollo <i>in vitro</i> de embriones cigóticos.....	62
Evaluación de la acción de fitorreguladores del cultivo <i>in vitro</i> de raíces y plántulas sin ápice de “coyol”.....	63
Evaluación del efecto de fitorreguladores en cultivo de <i>in vitro</i> de callos de “coyol”.....	66
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	68
CONCLUSIONES.....	76
LITERATURA CITADA.....	77
DISCUSIÓN GENERAL.....	78
CONCLUSIÓN GENERAL.....	80
LITERATURA CITADA.....	82

## ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO		PÁGINA
I.1	Niveles promedio de glucosa sanguínea en mg/dL en ratas Wistar normoglicémicas registrados en diferentes extractos desde 0 a 9 horas a intervalos de 1.5 cada uno, obtenidos de raíces de “coyol” (media aritmética $\pm$ desviación estándar).....	26
I.2	Niveles de glucosa sanguínea en mg/dL en ratas Wistar normoglicémicas registrados a diferentes intervalos de tiempo después del tratamiento con el extracto de MeOH obtenido de raíces de “coyol” (media aritmética $\pm$ desviación estándar.....	27
I.3	Niveles de glucosa sanguínea en mg/dL registrados a las 9 horas del tratamiento con la dosis de 177 mg/kg, al evaluar las fracciones F1-F5 percoladas de extracto de MeOH de raíces de “coyol”, en ratas Wistar normoglicémicas (media aritmética $\pm$ desviación estándar).....	28
II.1	Iniciadores, secuencias y número de bandas polimórficas obtenidas con los RAPDs en genotipos de “coyol” del Sureste de México.....	46
II.2	Bandas totales por genotipo con 12 iniciadores evaluados.....	47
III.1	Tratamientos aplicados en cultivo de plántulas desarrolladas <i>in vitro</i> sin ápice.....	64
III.2	Tratamientos evaluados con reguladores en raíces cultivadas <i>in vitro</i> .....	65
III.3	Tratamientos evaluados en raíces cultivadas en medio líquido con M.S. (1962).....	66
III.4	Efecto de diferentes agentes en el control de	

	oxidación de embriones cigóticos <i>In vitro</i> .....	68
III.5	Embriones germinados <i>in vitro</i> procedentes de siete regiones del Sureste de México.....	70
III.6	Efecto del tiempo de almacenamiento de semillas de “coyol” en la germinación de embriones cigóticos <i>in vitro</i> .....	70
III.7	Efecto de tratamientos con combinaciones de reguladores de crecimiento utilizando como explante, plántulas <i>in vitro</i> sin ápice.....	71

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINAS
I.1.	Diagrama del análisis cromatográfico de extractos de “coyol”.....	20
I.2	Estructura química de la coyolosa (1) su derivado octaacetilado (1a), manitol (2), su derivado hexaacetilado (2a), β-sitosterol (3) y estigmasterol (4), aislados de las raíces de “coyol”.....	29
II.1	Patrón de bandas de genotipos analizados con el iniciador OPA04, utilizando un marcador lateralmente de 1 kb en geles de agarosa al 1.2% p/v reveladas con bromuro de etidio.....	48
II.2	Agrupamientos obtenidos en 36 genotipos de 5 poblaciones del Sureste de México, estimadas con el coeficiente del índice de similitud de Jaccard...	48
II.3	UPGMA (Método de agrupamiento de pares no ponderado con la media aritmética) Dendograma mostrando el parentesco entre 36 accesiones de “coyol” correspondientes a 5 clusters en números romanos (I-V), estimadas de acuerdo al coeficiente del índice de similitud de Jaccard.....	49
III.1	Germinación <i>in vitro</i> de “coyol”. a. embrión de una semana de cultivo, b. plántulas de 12 semanas.....	69
III.2	Callos generados a partir de vástagos sin ápice provenientes de embriones germinados (a) callo generado con tratamiento III (b) callo generado con tratamiento IV.....	73
III.3	Raíces cultivadas en medio líquido con 0.3 mg.L <sup>-1</sup> de cinetina (CIN) en agitación constante donde se observa crecimiento de raíces secundarias.....	73

## INTRODUCCIÓN GENERAL

La palma de “coyol” (*Acrocomia mexicana* Karw. ex Mart). Es una especie que se extiende desde el Pacífico mexicano hasta Centro y Sudamérica. El fruto es apreciado desde la época prehispánica,. De esta especie se pueden obtener subproductos tales como aceites comestibles, alimento para ganado, artesanías, entre otros (Ramírez *et al.*, 2012).

Actualmente debido a la gran sobreexplotación y a la presencia de una enfermedad que afecta al 50% de sus poblaciones naturales en México, esta especie se encuentra amenazada, por lo que es importante realizar estudios a diferentes niveles que permitan diseñar estrategias para su conservación y aprovechamiento integral.

Para la conservación de la diversidad de los recursos genéticos es necesario el empleo de herramientas que la Biotecnología, ya que puede brindar importante información. Se destacan la micropropagación y la Biología Molecular. Los estudios sobre la variabilidad genética de “coyol” son escasos. Por lo que, conocer la diversidad genética natural de esta especie, permitirá el desarrollo de las estrategias de conservación y otros programas de mejoramiento. El objetivo de este trabajo fue estudiar la variabilidad genética de “coyol” en el Sureste de México, utilizando marcadores genético moleculares.

En México en los Estados de Veracruz y Yucatán, la infusión de raíces se ha empleado en la medicina tradicional para el tratamiento de la diabetes (Hernández *et al.*, 2002), enfermedad que ocasiona un grupo de desórdenes metabólicos caracterizados por una alteración en el metabolismo de los carbohidratos, proteínas y grasas provocando una insuficiencia relativa o

completa en la secreción de la insulina o en su acción. La diabetes es un padecimiento crónico de amplia distribución que actualmente afecta a más de 171 millones de personas en el mundo, pudiendo incrementarse hasta 366 millones en el 2030 (Sáenz y Alarcón, 2002). Se ha descrito la presencia de un disacárido denominado coyolosa (Figura I.1) en “coyol” (Toledano *et al.*, 2008). Dicho disacárido desarrolló un efecto hipoglucémico en ratones y ratas, obteniéndose del extracto metanólico de plantas recolectadas en el Noreste de México; sin embargo no ha sido posible establecer su estructura molecular por métodos sintéticos.

Estudios realizados por Zuart-Macías *et al.*, (1999) en el Estado de Chiapas, México, alertaron sobre una disminución drástica en el número de sus poblaciones de “coyol” debido a la falta de un manejo adecuado, presumiblemente por dos causas, una debido a que la semilla de esta especie tiene dificultades para su germinación debido principalmente a las características de su frutos la cual posee una testa muy dura y hace difícil romper el letargo de la semilla requiriendo a veces hasta 13 meses para su germinación, además se tiene tasas muy bajas de germinación, única forma de propagación natural, ya que esta especie no produce yemas adventicias, aunado esto se suma la presencia de la enfermedad que produce la muerte de un gran número de plantas silvestres, afectando aproximadamente un 50% de los individuos estudiados de las poblaciones naturales en Chiapas, México, el cual tiene como agente causante una nueva especie de hongo del género *Pastelotia*. (Zuart-Macías *et al.*, 1999).

Por lo anterior en esta investigación se realizó la caracterización fitoquímica, molecular y evaluación de respuestas en cultivo *in vitro*.

### **Objetivos**

Caracterizar fitoquímica, molecular y evaluar respuestas del cultivo *in vitro* para su propagación masiva.

### **Hipótesis**

Los metabolitos secundarios aislados de extractos de *Acrocomia mexicana* Kraw ex Marti, tienen efecto hipoglucémico.

Las poblaciones naturales de *Acrocomia mexicana* Kraw ex Marti en el Sureste de México presentan variaciones genéticas.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### Clasificación botánica de *Acrocomia mexicana*

**Familia:** Arecaceae (Palmae)

**Subfamilia:** Arecoideae

**Tribu:** Cocoeae

**Subtribu:** Bactridinae

**Genero:** *Acrocomia*

**Especie:** *Acrocomia mexicana* (Kraw ex Marti)

**Sinónimos Homotípicos:** (Check list Kew R.B. Garden 2008).

*Cocos aculeata* Jacq., Select. Stirp. Amer. Hist.: 278 (1763).

*Acrocomia sclerocarpa* Mart., Hist. Nat. Palm. 2: 66 (1824), nom. superfl.

### Sinonimos Heterotípicos

*Palma spinosa* - *Palma mocada* - *Bactris globosa* - *Bactris minor* - *Cocos fusiformis*

*Acrocomia fusiformis* - *Acrocomia sphaerocarpa* - *Acrocomia guianensis*

*Acrocomia minor* - *Acrocomia lasiospatha* - *Acrocomia totai* - *Bactris pavoniana*

*Acrocomia globosa* - *Acrocomia horrida* - *Acrocomia mexicana* - *Acrocomia*

*tenuifrons* - *Acrocomia cubensis* - *Acrocomia vinífera* - *Acrocomia antioquiensis*

- *Acrocomia zapotecis* - *Astrocaryum sclerocarpum* - *Acrocomia glaucophylla* -

*Acrocomia intumescens* - *Acrocomia sclerocarpa* var. *Wallaceana*.

**Nombres comunes:** Nombres comunes para denominar a *A. mexicana* en Nayarit, México son coyul, coyol o palma coyol; en Paraguay se le denomina palma gru-gru; en Francia, Nuez de coyol; en Alemania, Palma coyoli; en España, amankayo, corajo, corozo, coyol baboso, totai, tucuma; cocotero o mbokajá en Paraguay; coquito en Argentina; totaí en Bolivia; bocaiúva, macaúba en Brasil; en centroamérica se le conoce como corozo o tamaco coyol, coconave, cocuyol, Totai, Macauba, Corajo, Corozo, Tamaco, Coyol, Macaw palm, Grugru palm, Mbocaya y muchos otros según la región

**Sinonimia:** El género *Acrocomia* ha sido resumido en solo 4 especies, según Kew Royal Botanical Garden, son: *Acrocomia aculeata*, *Acrocomia mexicana*, cuyos sinónimos se hallan listados más arriba. *Acrocomia crispa*, endémica de Cuba y cuyos sinónimos homotípicos son *Cocos crispa*, *Astrocaryum crispum* y *Gastrococos crispa*. *Acrocomia hassleri*, oriunda de Brasil y Paraguay cuyo sinónimo es *Acanthococos hassleri*. *Acrocomia media* nativa desde Puerto Rico hasta las Islas Vírgenes y que no posee sinónimos conocidos. *Acrocomia aculeata* desde Brazil

Muchas discusiones ha desatado esta clasificación, en especial el caso de la palma de “coyol”, ya que se puede apreciar significativas diferencias entre ejemplares que vegetan en distintas regiones como: vainas de hojas viejas persistentes en el tronco, corona de frondas de mayor tamaño, frutos más voluminosos.

Evidentemente que estudios más profundos y determinación de ADN podrían aclarar el tema y determinar si se trata de iguales o distintas especies o solo de fenotipos y/o ecotipos.

### **Descripción**

La palma de “coyol”, es una planta monoica de doce a quince metros de altura y aproximadamente cuarenta centímetros de diámetro; el tronco está cubierto por una corteza con espinas de hasta quince centímetros de largo. Posee grandes hojas pinnadas, verde-grisáceo y de aspecto plumoso. La Palma de “coyol” se dá en racimos de doscientos a setecientos frutos. El pericarpio del fruto es coriáceo y envuelve a una parte carnosa y fibrosa que se adhiere fuertemente a la semilla, muy dura; contiene un centro de sabor parecido al de coco, hojas pinnadas, de 2.5-3 m de longitud, con segmentos verdes grisáceos y envés algo blanquecino que nacen en planos diferentes, sobre un pecíolo espinoso de 40-80 cm de longitud. El raquis de la hoja igualmente espinoso por ambas caras soporta más de 100 foliolos de una longitud entre 40 y 70 cm y de 1-2 cm de ancho, reduplicados, dispuestos en varios planos y bífidos en el ápice. La base foliar es abierta, con indumento e igualmente espinosa. Inflorescencia de hasta 1.2 m de longitud, naciendo de entre las hojas y parcialmente oculta por éstas, soportadas por un pedúnculo tomentoso y espinado, y cubierta por una espata tomentosa, rojiza y terminada en una púa afilada; flores diclino-monoicas en la misma inflorescencia. Las femeninas en la base de la inflorescencia, en triadas, mientras que el resto de la inflorescencia presenta flores masculinas, amarillentas. Fruto globoso, epicarpio verde amarillento y castaño al madurar,

de 2.5-5 cm de diámetro, liso. El mesocarpio es carnoso, amarillento y abundante, muy rico en aceites. Endocarpio marrón oscuro a negro, duro, y de aprox. 3-4 mm de espesor con tres poros ubicados casi en el ecuador. La semilla tiene un diámetro de 1.5-2 cm de diámetro y germina en unos 18 meses.

### **Distribución geográfica**

El “coyol”, tiene una amplia distribución en América, hallándose desde México hasta el Norte de Argentina en las provincias de Chaco, Corrientes, Misiones, Formosa y Salta. También está presente en las Antillas, Bolivia, Paraguay y Brasil aunque no se la halla en Perú y Ecuador.

### **Hábitat**

La palma de “coyol”, se desarrolla de forma silvestre o en cultivos de poca extensión comparada con otras especies introducidas y con uso más bien local. Además, el género *Acrocomia*, se reporta como uno de los menos estudiados por instituciones mexicanas.

*A. mexicana*, no forma grandes palmares sino que se desarrolla en pequeños grupos o individuos aislados. El ganado y otros mamíferos (algunos murciélagos) ayudan en su dispersión y las quemazones de los pastizales aparentemente favorecen su germinación, haciendo que sea especie pionera en la regeneración de la flora quemada. Suele encontrársela dispersa y con separación entre individuos que va desde algunas decenas hasta miles de metros. Prefiere suelos profundos y arenosos no anegables, con napas de agua no demasiado profundas. Tolera bien los suelos modificados algo arcillosos y

suele vérselas creciendo en bosques espinosos compartiendo el hábitat con distintas especies.

Normalmente habita en sabanas abiertas o en tierras desforestadas, son muy frecuentes en campos perturbados, en áreas con época lluviosa bien definida normalmente en bajas elevaciones aunque en los Andes colombianos se ha encontrado hasta 1200 msnm. El rango de distribución está muy influenciado por los humanos. Lentz (1990) reportó que la planta de “coyol” fue llevada desde otros países de Sudamérica a algunas áreas de México y Centroamérica por los Mayas.

### **Fenología**

La palma de “coyol” florece desde comienzos de la primavera hasta mitad del verano y sus frutos maduran hacia finales del invierno.

### **Polinizadores y dispersadores.**

Más allá de la acción del viento, los principales polinizadores son Curculionidae, Nitidulidae, Escarabaeidae y abejas, en especial las melíferas. En relación con los animales dispersadores de las semillas es interesante tener en cuenta que además del ganado bovino y porcino intervienen otros mamíferos como *Didelphus albiventris* (Comadreja), *Nectomys squamipes* (Rata de agua), *Cebus apella* (Mono Cai); y aves tales como *Turdus* sp., *Anodorhynchus hyacinthinus* (Lentz, 1990).

### **Importancia económica.**

La forma en la que se consume el coyol es en fresco o preferentemente enmielado (el coyol se pela y se cuece en agua con piloncillo y canela formando un almíbar); esta receta es muy similar a la realizada por los antiguos mayas que lo almibaraban en una cocción con miel (Lentz, 1990). La forma de preparación se realiza para autoconsumo, sin embargo, aún se puede encontrar en las tiendas escolares o algunos tianguis, y una vez que la "carne" (mesocarpo o pulpa del fruto) se consume, el endocarpo (cubierta de la semilla) se parte con una piedra o martillo para consumir el "coquito", que se dice tiene propiedades vermífugas. Otro uso es para la elaboración de artesanías (e.g. anillos a partir de endocarpo, el uso de las espinas como aguja, aunque esta última tradición se ha perdido y de ella se conserva solo la referencia de conocimiento por comunicación de personas mayores). La especie también se emplea con fines medicinales de forma similar a la del Sureste de México, ya que los frutos cocidos se emplean como remedio para la tos y cólicos; la semilla masticada es un remedio para combatir parásitos intestinales; la raíz se emplea para tratar la diabetes. La especie es explotada en otras partes de México y el mundo, así en el Sureste Mexicano se usa para elaborar licor denominado "taberna" (Quero, 1992). Las palmas son empleadas como adorno para festividades y elaboración de artesanías. En otros países, como en Honduras, la savia se destina a la elaboración de vino de escaso valor nutritivo y con un contenido en alcohol de 12.86% v/v (Balick, 1990).

## **Multiplicación y cultivo**

Se multiplica por semillas que pueden tardar hasta más de 18 meses en germinar. Se recomienda quitar el epicarpio y mesocarpio (cáscara y pulpa), escarificar el endocarpio mediante algún medio mecánico y ponerlas en remojo en agua durante unos 20 días a temperatura ambiente, cambiando el agua periódicamente. Luego del remojo y sin dejar secar, sembrar superficialmente en arena o turba, colocar a la sombra a temperatura entre 20° C y 30 °C. y mantener siempre húmedo.

Una vez germinados, las plántulas deben ser repicadas cuando aparece la primer aerófila a envase de 20 cm de profundidad como mínimo. Presenta la particularidad que en los primeros estadios del crecimiento, el pecíolo cotiledonar se dirige hacia abajo para luego emerger de la tierra dando lugar a la aparición de la primera lígula y aerófila. En este cambio de dirección, se forma un pliegue apretado que sigue desarrollándose a medida que transcurre el tiempo, constituyendo una suerte de “bulbo” que es parte del estípite de la palma y como el resto del tronco desarrolla espinas. Se estima que estas espinas subterráneas son una estrategia de defensa contra los mamíferos escaradores, como el “cerdo salvaje”, “la mulita” (*Dasypus septemcinctus*).

Por otra parte se encontró que el aceite de “coyol” puede ser usado en la industria cosmética y farmacéutica, y en la elaboración de productos alimenticios tales como galletas, coberturas, glaseados y productos análogos de cacao, debido a que su composición es semejante a los aceites de coco. Sirva como dato que *Jatropha curcas* que posee 30 % v/v de aceite en semilla, sólo

puede rendir 4000 Kg/Ha arrojando un total de 1240 litros de Biodiesel por Ha, en cambio, la palmera “coyol”, rinde 19.000 Kg/Ha lo que representa más de 2800 litros de Biodiesel por Ha (Hernández, 2007).

### **USO DE MARCADORES GENÉTICOS EN PALMAS (ARECACEAS)**

En la actualidad, mediante el empleo de marcadores de ADN, se busca hacer más eficiente la selección de plantas y de variedades para ser empleadas en programas de mejoramiento genético (metodología conocida como selección asistida por marcadores). Este tipo de selección hace posible la predicción de los genotipos a obtener en un cruzamiento con base en la información de los parentales empleados. Además, los marcadores moleculares pueden ser usados para identificar plantas individuales que contienen características (alelos) de interés particular (Mohan *et al.*, 1997; Ribaut y Hoistong, 1998). Como consecuencia, la selección de las plantas con características de interés puede ser hecha en plántulas de vivero o previvero, lo cual ayuda a reducir significativamente los costos de manejo de un programa de mejoramiento (Dreher *et al.*, 2003; Morris *et al.*, 2003). Adicionalmente, en otros sistemas vegetales, los marcadores moleculares se están utilizando para el aislamiento, caracterización y seguimiento de genes específicos empleados en transgenia (Kuiper *et al.*, 2001). Para determinar la localización de un fragmento de ADN y su cercanía a un gen particular dentro del genoma o para establecer las relaciones de parentesco entre individuos o poblaciones se hace necesario el apoyo del mejoramiento tradicional y de disciplinas como la genética cuantitativa y la estadística (Nei y Li, 1979). Una de las estrategias más

utilizadas para generar información de utilidad en programas de mejoramiento genético es determinar los marcadores presentes en cruces F2 y retrocruzas.

Marcadores moleculares basados en PCR (Polymerase Chain Reaction) la PCR es la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa la mayoría de los marcadores moleculares empleados en la actualidad se basan en esta metodología. La técnica de PCR fue desarrollada por Kary B. Mullis en 1984 (Saiki *et al.*, 1988), quien recibió el Premio Nobel de Medicina y Fisiología en 1993 por esta invención. Esta técnica permite obtener millones de copias de un fragmento de ADN que sirve como molde gracias a la acción de la enzima *Taq* polimerasa. Esta enzima, aislada de la bacteria *Thermus aquaticus*, es una proteína termoestable (que actúa a altas temperaturas), que polimeriza nucleótidos de manera fiel y permite la formación de nuevas moléculas de ADN. En las especies de palmas en virtud de su baja de tasa de evolución molecular y la evolución convergente entre algunos caracteres morfológicos han limitado la resolución filogenética de la familia de las palmeras por lo cual se han realizado estudios tanto con ADN nuclear como de cloroplastos. Se han realizado diversos estudios utilizando varias técnicas de marcadores genético moleculares. Hann J.W. (2002), realizó estudios de filogenética molecular en 33 géneros de la familia *Palmae* (Arecaceae) basada en secuencias *atpB*, *rbcl*, y 18S rDNA, en el cuales varios taxa mostraron ramas relativamente largas con datos 18s, pero la resolución filogenética fue muy similar tanto para 18s y para cpDNA.

Los RFLP son marcadores moleculares codominantes, es decir, pueden detectar tanto, individuos homocigotos como heterocigotos y pueden ser usados

en todos los miembros de una especie o especies relacionadas. Con RFLP es posible obtener entre uno y cinco puntos (bandas) de información por cada muestra analizada. El uso de RFLP ha sido reportado en un amplio rango de especies. En palma de aceite, esta técnica ha sido empleada para el estudio de diversidad genética (Barcelos *et al.*, 2002), en la construcción de mapas genéticos y en la identificación de marcadores asociados con características deseables (Villegas y Gómez, 1998).

Los RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA). Esta técnica está basada en la metodología del PCR y consiste en la amplificación de fragmentos de ADN con un sólo cebador de diez nucleótidos que se hibrida al ADN molde de manera aleatoria (Williams *et al.*, 1990), a diferencia de una reacción de PCR típica que emplea dos cebadores (uno por cada cadena). La corta longitud del cebador RAPDs hace que su secuencia se hibride aleatoriamente a lo largo del genoma. Con RAPDs se pueden generar entre tres y diez puntos de información por cada muestra analizada (Ranade *et al.*, 2001).

Los marcadores se han utilizado en plantas de la familia Arecaceas: En palma de aceite, se usaron marcadores tipo RAPDs se han empleado para estudios de diversidad genética (Shah *et al.*, 1994), así como caracterización de materiales (Villegas *et al.*, 2000).

La tecnología de marcadores moleculares se está utilizando exitosamente en los programas de biotecnología de palma de aceite. Por ejemplo, en estudios de diversidad, Barcelos *et al.* (2002) encontraron que la divergencia genética entre *E. guineensis* y *E. oleifera* era muy baja y de la misma magnitud que la encontrada entre miembros de *E. oleifera*. Estos resultados sugirieron que, en

términos evolutivos, estas dos especies poseen un origen común y un genoma conservado para el género *Elaeis*.

Zehdi *et al.* (2004), estudiaron catorce loci empleando microsatélites de *Phoenix dactylifera* para estudiar la diversidad genética en germoplasma de palmas datileras. Los estudios mostraron un alto nivel de polimorfismo en 49 accesiones de tres oasis principales de Túnez. Se detectaron huellas digitales con éxito distinguiéndose fácilmente con la ayuda de sólo tres loci.

En *Acrocomia aculeata* Oliveira *et al.* (2012), empleó marcadores tipo RAPDs para determinar variabilidad genética en poblaciones silvestres del Norte de Brazil encontrando tanto niveles altos de diversidad genética entre poblaciones, como niveles bajos en algunas poblaciones específicas, lo que sugiere un aislamiento genético entre estas últimas, determinando el requerimiento de planes para su conservación de ciertos genotipos. En México no se han realizado trabajos con marcadores genético moleculares en palmas.

# I. FITOQUÍMICA Y EFECTO HIPOGLUCÉMICO DE EXTRACTOS DE “COYOL” (*Acrocomia mexicana* Kraw ex Marti.) EN RATAS WISTAR

## RESÚMEN

Previamente se estudió la palma de “coyol” (*Acrocomia mexicana* Kraw ex Marti), colectada en Tamaulipas, de la que se aisló la “coyolosa”, sustancia que disminuyó los niveles de glucosa sanguínea en rata y ratón. En este estudio se evaluó el efecto hipoglucémico de los extractos de hexano, cloroformo y metanol de raíces de “coyol” en ratas Wistar por administración oral. Dichos extractos, redujeron los niveles de glucosa en sangre en ratas normoglicémicas. El extracto de metanol fue percolado por cromatografía en columna para dar las fracciones F1 a F5, donde la fracción F5 fue la más activa. Del análisis cromatográfico de los extractos preparados de esta planta, se aislaron e identificaron  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, y manitol identificado como su derivado acetilado por medio de un estudio de difracción de rayos-X.

**Palabras clave:** *Acrocomia mexicana*, coyol, diabetes, taberna, efecto hipoglucemiante.

PHYTOCHEMICAL AND EFFECT HYPOGLYCEMIC OF EXTRACTS "COYOL"  
(*Acrocomia mexicana* Kraw ex Marti.) In Wistar Rats

**ABSTRACT**

A previous study of "coyol" palm (*Acrocomia Mexicana Kraw ex Marti*) of an accession localized at Tamaulipas afforded coyolosa, this substance decreased the blood glucose level in rats and mice. In the present study, the hypoglycemic effect of hexane, chloroform and methanol extracts from roots of *A. mexicana* collected from Chiapas State was evaluated. Oral administration of these extracts in normoglycemic rats resulted in a significant decrease in blood glucose. The methanol extract was percolated over a silica gel column to afford five fractions F1 to F5, which decreased the blood glucose levels in rats. Fraction 5 (F5) was the most active. All the extracts were analyzed over column chromatography to yield  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, and mannitol identified as its acetyl derivative by means of an X-ray diffraction study.

**Key words:** *Acrocomia mexicana*, coyol, diabetes, taberna, hypoglycaemic effect.

## INTRODUCCIÓN

En México, existe una gran biodiversidad de recursos fitogenéticos los cuales son utilizados en diversos aspectos cotidianos por los habitantes de los pueblos de México y muchos son empleados en la medicina tradicional. La palma de “coyol”, es un planta que llega a medir hasta 20 m de alto, nativa de México y América Central donde se le conocen diversos usos: como alimento para humanos, se aprovechan los frutos y su médula; de sus hojas y fibras se elabora ropa; el fruto también se utiliza como forraje para ganado. En el Sureste de México (Estado de Chiapas) y Centroamérica (Honduras), año con año se utilizan miles de plantas adultas para la producción de una bebida de coyol denominada “taberna” o vino de sabia de palma (Balick, 1990; Zuart-Macías, 1999) En México en los Estados de Veracruz y Yucatán, la infusión de raíces se ha empleado en la medicina tradicional para el tratamiento de la diabetes (Hernández-Galicia, 2002), enfermedad que ocasiona un grupo de desórdenes metabólicos caracterizados por una alteración en el metabolismo de los carbohidratos, proteínas y grasas provocando una insuficiencia relativa o completa en la secreción de la insulina o en su acción. La diabetes es un padecimiento crónico de amplia distribución que actualmente afecta a más de 171 millones de personas en el mundo, pudiendo incrementarse hasta 366 millones en el 2030 (Toledano *et al.*, 2008). Se ha descrito la presencia de un disacárido denominado “coyolosa” (Figura I.1) en “coyol” (Pérez *et al.*, 1997). Dicho disacárido desarrolló un efecto hipoglucémico en ratones y ratas, obteniéndose del extracto metanólico de plantas recolectadas en el Noreste de

México, sin embargo no ha sido posible establecer su estructura molecular por métodos sintéticos (Haines, 2003). Por lo que es importante realizar estudios más amplios sobre la fotoquímica para conocer los metabolitos secundarios y su posible potencial terapéutico de esta especie. En el presente trabajo se evaluó el efecto hipoglucemiante de los extractos de hexano, cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ) y metanol (MeOH) obtenidos de una accesión de “coyol” colectada en Chiapas, por administración oral a ratas Wistar; así mismo, se identificaron diversas sustancias en los extractos analizados que antes no habían sido descritos para esta planta.

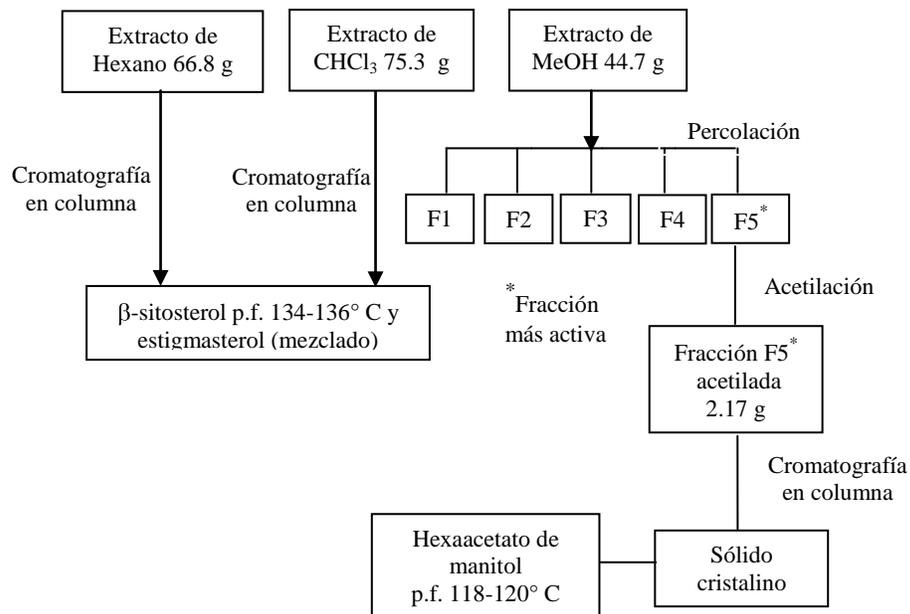
## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Colecta de la planta**

Las raíces de “coyol” fueron recolectadas en Junio de 2007 en la localidad de San Fernando, ubicada en la Región Central de Chiapas, México. Se recolectaron 20 kg de raíces frescas y material vegetativo (hojas, flores y frutos). Una muestra de herbario fue depositada en el Herbario del Instituto de Historia Natural “Faustino Miranda” del Gobierno del Estado de Chiapas, México con registro número 12230.

### **Preparación de extractos**

Se emplearon 5 kg de raíces secas, las cuales fueron molidas utilizando un molino manual. Los extractos fueron obtenidos vía maceración empleando hexano (3 veces, 15 L, 3 días), luego con  $\text{CHCl}_3$  (3 veces, 15 L, 3 días), y finalmente con MeOH (3 veces, 15 L, 3 días). Los disolventes fueron evaporados al vacío empleando un rotavapor (Büchi Modelo R111, Waterbath B-461), para obtener 66.8 g, 75.3 g y 150.6 g de los extractos de hexano,  $\text{CHCl}_3$  y MeOH, respectivamente (Figura I .1).



**Figura I.1. Diagrama del análisis cromatográfico de extractos de “coyol”**

### **Preparación de animales para experimento biodirigido**

Se utilizaron ratas Wistar macho, de 170 a 220 g de peso corporal y alimentadas con dieta normal (Nutricubos Purina<sup>MR</sup>), las ratas fueron mantenidas y cuidadas en condiciones normales de Bioterio del Área de Biología del Departamento de Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH) a temperatura ambiente (23 a 25° C), humedad y ciclos de luz y oscuridad ambiental de 12 horas por 12 horas. Previo al estudio las ratas fueron puestas a 18 horas en ayuno, con libre acceso al agua. El uso y manejo de estos animales fueron llevados a cabo de conformidad con la Norma Oficial Mexicana para su Cuidado y Manejo (NOM-062-ZOO-1999) y de acuerdo con las reglas internacionales relativas al cuidado y manejo de animales de laboratorio.

## **Efecto hipoglucémico de extractos**

Se evaluó el efecto hipoglucémico de los extractos de hexano,  $\text{CHCl}_3$  y MeOH en ratas Wistar normoglicémicas administrados por vía oral, obtenidos de una muestra de raíces de “coyol”. Los extractos fueron suspendidos en Tween 80 (0.05 % v/v), Las dosis evaluadas para cada tipo de extracto fueron: 100, 177, 300 y 579 mg/kg de peso corporal, más el control, consistente en el vehículo de agua destilada y tween 80. Se emplearon lotes de 8 individuos por tratamiento y un total de 5 lotes por cada extracto incluyendo el lote de control. Las dosis de extractos fueron administradas por vía oral (0.5 mL/100 g) a ratas en ayuno de 18 horas, mediante una sonda flexible. El efecto hipoglucémico, se evaluó con el método de la glucosa oxidasa empleando un glucómetro modelo One Touch ultra II (American Life Scan Co., Milpitas, CA, USA). Las muestras de sangre fueron obtenidas por medio de un corte de la parte final de la cola (vena caudal) de la rata (Sumergiendo la cola en baño de agua a  $39\pm 1$  °C durante 30 segundos). Los niveles de glucosa basal en los animales fueron medidos antes de administrar los extractos y después a intervalos de tiempo de 1.5 horas, suministrando las dosis correspondientes y registrando las seis lecturas para cada animal a las 0, 1.5, 3.0, 4.5, 6.0 y 9.0 horas. Todos los extractos provocaron disminución de los niveles de glucosa en rata y en especial el extracto de metanol a la dosis de 579 mg/kg de peso corporal (Cuadro I.1), disminuyó dichos niveles del estado basal de 70.50 a 58.62 mg/dL después de 9.0 horas de administración, este extracto fue revaluado empleando dosis de 100, 177, 300 y 579 mg/kg de peso corporal, y administrados en intervalos de tiempo descritos anteriormente (Cuadro I.2), con la finalidad de

aislar la “coyolosa” (Figura I.1) y/o algún otro metabolito activo, se efectuó una percolación y evaluación del extracto de metanol.

### **Percolación del extracto de metanol**

Una parte del extracto metanólico (44.7 g) obtenido de las raíces de *A. mexicana* fue sometido a una percolación empleando una columna empacada con gel de sílice (0.063–0.200 mm, 230 g) utilizando como eluyente hexano (1.1 L, F1), hexano/EtOAc (9:1, 1.1 L, F2), hexano/EtOAc (7:3, 1.1 L, F3), hexano/EtOAc (1:1, 1.1 L, F4) y acetato de etilo (EtOAc) (1.1 L, F5) (figura 1). Las fracciones obtenidas (F1 a F5) fueron evaluadas en ratas Wistar normoglicémicas, se utilizaron 6 lotes de ratas cada uno con 8 individuos. 5 lotes fueron evaluados con cada fracción obtenida, más un lote que se utilizó como control haciendo un total de 48 animales (Cuadro I.3).

La dosis evaluada de cada fracción suministrada por lote fue de 177 mg/kg de peso corporal administradas por vía oral (0.5 mL/100 g) en ratas con 18 horas de ayuno. Ya que esta dosis presentó de manera general el nivel más bajo de glucosa en la sangre (tabla I.3). Los niveles de glucosa en la sangre fueron evaluadas por el método de la glucosa oxidasa, tomando muestras en la vena caudal cada 1.5 h después de medir el nivel de glucosa basal. Los valores más bajos de glucosa, se obtuvieron en la fracción F5 (Cuadro I.3), con base en la prueba de comparación de medias de rango múltiple de Duncan  $p \leq 0.005$  y después de nueve horas de aplicarse los tratamientos, entonces dicha fracción fue sometida a un proceso de acetilación.

### **Acetilación de la fracción F5**

A la fracción F5 (5 g) se le adicionaron anhídrido acético (50 mL) y piridina (50 mL), manteniéndose en agitación vigorosa durante 12 horas. Enseguida, se agregó hielo picado (100 g) y se realizaron 3 extracciones con acetato de etilo (50 mL) reuniéndose las fases orgánicas, mismas que fueron lavadas con HCl al 10% (v/v) por tres veces; después la fase orgánica se lavó con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 10% (p/v) tres veces y finalmente con agua y secada con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtró y evaporó en un rotavapor a presión reducida para dar 2.17 g de la fracción F5 acetilada (figura I.1), misma que fue analizada mediante cromatografía en columna.

### **Aislamiento del hexaacetato de manitol**

La fracción F5 acetilada (2.17 g) fue aplicada a una columna empacada con silica gel (40 g), misma que fue eluida con hexano e incrementando su polaridad con mezclas de Hexano/AcOEt, con AcOEt puro y al final con MeOH. Se colectaron fracciones de 15 mL y fueron evaporadas en baño de vapor y aplicadas a placas analíticas (Cromatofolios Al de silicagel F<sub>254</sub>, Merck), revelando con luz UV y enseguida por aspersion de una disolución de sulfato cérico amoniacal 2N en  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , desarrollando color en una placa de calentamiento (Marca Corning) durante 30 s y a 100-105 °C, reuniéndose fracciones semejantes en número y de valores de Rf iguales. De las fracciones 121-165 eluidas con hexano/AcOEt (9:1) se observó un sólido cristalino cuyo p.f. fue de 118-120 °C, identificado por análisis de su diagrama de difracción de

rayos-X, como hexaacetato de manitol (**2a**) cuya estructura propuesta por Stein y colaborador por primera vez en 1992, se muestra en la Figura 1.2 .

### **Identificación de $\beta$ -sitosterol y estigmasterol**

Tanto el extracto de hexano como el de  $\text{CHCl}_3$  desarrollaron actividad hipoglucemiante en rata Wistar, por lo que una parte de cada extracto se analizó por cromatografía en columna empacada en silica gel, se empezó a eluir con hexano y cantidades crecientes de mezclas de hexano/AcOEt y al final con MeOH. Del extracto, se observó en las fracciones 91-160 eluidas con hexano/AcOEt (9:1) un sólido cristalino cuyo p.f. fue de 134-136 °C, que al ser comparado por cromatografía en capa delgada con una muestra auténtica de  $\beta$ -sitosterol (**3**) y por cotejo de sus datos de su espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno ( $^1\text{H}$  RMN) con los de la literatura se concluyó que se trataba de este esteroide. De la misma manera el extracto de  $\text{CHCl}_3$  fue analizado por cromatografía en columna, del que se identificaron por medio de su espectro de  $^1\text{H}$  RMN tanto  $\beta$ -sitosterol (**3**) y estigmasterol (**4**) (Jamaluddin *et al.*, 1994)

### **Análisis estadísticos**

Los resultados se expresan como medias, DMS (desviación mínima significativa), C.V. (coeficiente de variación),  $n= 8$  y sometidos a una prueba de comparación de medias (Duncan  $p \leq 0.005$ ) para la evaluación del efecto hipoglucémico de los tres extractos, evaluación de percolados de metanol a

diferentes intervalos de tiempo, así como para evaluación de niveles de glucosa total en ambos experimentos.

Para el análisis de datos y realizar los diferentes análisis de varianza (ANOVA) así como las pruebas de comparación de medias se utilizó el programa estadístico denominado SAS versión 9.0

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se presentan los resultados de la evaluación de los diferentes extractos sobre el nivel de la glucosa sanguínea en un experimento biodirigido, usando ratas Wistar; así como las diferentes fracciones obtenidas del extracto de metanol de “coyol”, se presentan a continuación:

**Cuadro I.1. Niveles promedio de glucosa sanguínea en mg/dL en ratas Wistar normoglicémicas registrados en diferentes extractos desde 0 a 9 horas a intervalos de 1.5 cada uno, obtenidos de raíces de “coyol” (media aritmética  $\pm$  desviación estándar)**

Tratamiento (mg/kg)	Niveles promedio de glucosa en sangre (mg/dL)		
	Extractos		
	Hexano	CHCl <sub>3</sub>	MeOH
0.0 (control)	69.8 $\pm$ 7.4 a	69.8 $\pm$ 7.4a	69.8 $\pm$ 7.4 b
100	72.7 $\pm$ 11.2 <sup>a</sup>	69.9 $\pm$ 9.9a	74.1 $\pm$ 8.2a
177	61.5 $\pm$ 9.8c	63.6 $\pm$ 9.3b	63.5 $\pm$ 1.8c
300	66.0 $\pm$ 9.0b	64.9 $\pm$ 8.5b	68.0 $\pm$ 1.3b
579	59.6 $\pm$ 10.6c	61.7 $\pm$ 10.7b	62.6 $\pm$ 9.9c
C.V	13.1	12.42	12.4
D.M.S.	3.6	3.3	3.3

Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Duncan  $\alpha$  0.05  $p \leq$  0.005. C.V: Coeficiente de variación; DMS: Desviación mínima significativa.

**CUADRO I.2. Niveles de glucosa sanguínea en mg/dL en ratas Wistar normoglicémicas registrados a diferentes intervalos de tiempo después del tratamiento con el extracto de MeOH obtenido de raíces de “coyol” (media aritmética  $\pm$  desviación estándar).**

		Niveles de glucosa en sangre (mg / dL)						
		Tiempo (h)						
Trata- miento mg/kg	Valor basal	1.5	3.0	4.5	6.0	7.5	9.0	
control	66 $\pm$ 3b	74 $\pm$ 7b	70 $\pm$ 10ab	71 $\pm$ 10a	72 $\pm$ 7a	67 $\pm$ 6ab	66 $\pm$ 5ab	
100	80 $\pm$ 6a	86 $\pm$ 8 <sup>a</sup>	74 $\pm$ 4 <sup>a</sup>	70 $\pm$ 7a	73 $\pm$ 8a	69 $\pm$ 9a	71 $\pm$ 5a	
177	70 $\pm$ 11b	67 $\pm$ 15b	72 $\pm$ 4ab	59 $\pm$ 9b	56 $\pm$ 7b	59 $\pm$ 8bc	60 $\pm$ 8c	
300	73 $\pm$ 9ab	78 $\pm$ 8ab	67 $\pm$ 10ab	67 $\pm$ 9ab	61 $\pm$ 10b	67 $\pm$ 8ab	61 $\pm$ 8bc	
579	70 $\pm$ 8ab	67 $\pm$ 7b	62 $\pm$ 15b	64 $\pm$ 9ab	59 $\pm$ 2b	57 $\pm$ 9c	59 $\pm$ 7c	
C.V	11.4	13.6	14.3	13.5	11.7	13.2	10.8	
DMS	9.3	11.5	11.2	10.2	8.5	9.6	7.8	

Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Duncan  $\alpha$  0.05  $p \leq 0.005$

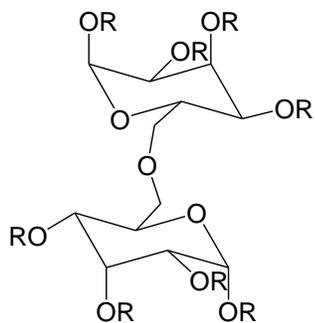
C.V: Coeficiente de variación; DMS: Desviación mínima significativa.

**CUADRO I.3. Niveles de glucosa sanguínea en mg/dL registrados a las 9 horas del tratamiento con la dosis de 177 mg/kg, al evaluar las fracciones F1-F5 percoladas de extracto de MeOH de raíces de “coyol”, en ratas *Wistar* normoglicémicas (media aritmética  $\pm$  desviación estándar)**

<b>Tratamientos</b> (177 mg/kg de peso corporal)	<b>Glucosa en sangre</b> (mg/dL)
Control	78.7 $\pm$ 11.6 b
Fracción 1	84.8 $\pm$ 11.2a
Fracción 2	77.3 $\pm$ 9.3 b
Fracción 3	76. 1 $\pm$ 12.2 b
Fracción 4	77.2 $\pm$ 13.9 b
Fracción 5	69.8 $\pm$ 13.2 c
C.V.	14.3
D.M.S.	4.6

Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Duncan  $\alpha$  0.05  $p < 0.005$ . C.V: Coeficiente de variación; DMS: Desviación mínima significativa.

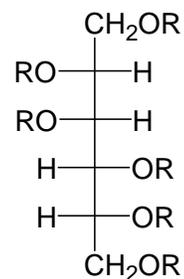
A continuación se presentan las diferentes estructuras químicas correspondientes a los diversos compuestos y sus derivados encontrados en extractos de raíces en “coyol”



Coyolosa R = H (1)

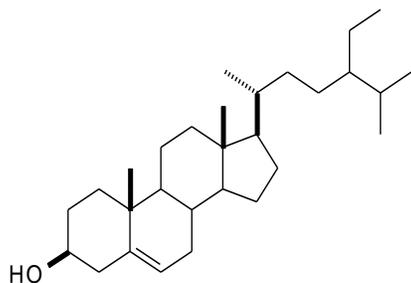
Octaacetato de coyolosa R = Ac (1a)

(2a)

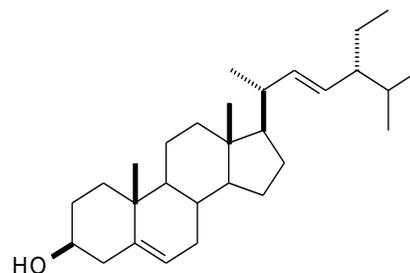


Manitol R = H (2)

Hexaacetato de manitol R = Ac



$\beta$ -Sitosterol (3)



Estigmasterol (4)

**Figura I.2. Estructura química de la coyolosa (1) su derivado octaacetilado (1a), manitol (2), su derivado hexaacetilado (2a),  $\beta$ -sitosterol (3) y estigmasterol (4), aislados de las raíces de “coyol”.**

La diabetes es un padecimiento crónico de amplia distribución, para su control existen medicamentos como la Tolbutamida y gibenclamida, pero también se pueden emplear plantas medicinales como alternativas naturales (Andrade-

Cetto, 2005). En un estudio previo, solo del extracto de metanol de las raíces de “coyol” (Colectada en Tamaulipas) se aisló la “coyolosa” (1), una sustancia que disminuyó los niveles de glucosa utilizando ratones a los que se les administraron dosis de 2.5 a 40 mg/kg por vía intraperitoneal. (Pérez *et al.*, 1997). En esta investigación se midieron los niveles de glucosa de ratas Wistar al administrar por vía oral, extractos de hexano, CHCl<sub>3</sub> y MeOH, preparados a partir de las raíces de “coyol” coletadas en Chiapas. Al inicio después de la ministración de la dosis, se observó un aumento en los niveles de glucosa en la sangre por efecto del estrés inducido y la liberación de glucosa por gluconeogénesis, efecto que fue observado con los extractos de “coyol” colectada en Tamaulipas (Pérez *et al.*, 1997); así como ha sido descrito en otras plantas medicinales (Balamurugan *et al.*, 2011). El efecto hipoglucemiante de los extractos de raíz de “coyol” a diferentes concentraciones se muestra en la Cuadro I.1 y corresponden al promedio de los niveles de glucosa a lo largo de las 9 horas evaluadas (7 estimaciones), los menores niveles estadísticamente significativos de glucosa en sangre se obtuvieron con la concentración de 579 mg/kg de peso corporal, registrándose valores promedio de 59.6, 61.7 y 62.6 mg/dL de glucosa sanguínea para los extractos de hexano, cloroformo y metanol, respectivamente mismos que son inferiores al valor de glucosa basal de 69.8 mg/dL, es decir, los tres extractos tuvieron actividad hipoglucemiante con respecto al control y por lo tanto se analizaron por cromatografía en columna. Con respecto al extracto de hexano, preparado de las raíces de *A. mexicana*, se aisló un sólido cristalino cuyo p.f. fue de 134 -136 °C, que al ser cotejados sus datos de su espectro de <sup>1</sup>H RMN con los de la literatura

(Jamaluddin *et al.*, 1994) y comparado por cromatografía en capa delgada con una muestra auténtica de  $\beta$ -sitosterol (**3**) se concluyó que se trataba de este esteroide. De la misma manera el extracto de  $\text{CHCl}_3$  fue analizado por cromatografía en columna, aislándose un sólido amorfo en el que se detectó  $\beta$ -sitosterol (**3**) y estigmasterol (**4**) evidenciados en su espectro de  $^1\text{H}$  RMN, ya que se observaron señales en zona de hidrógenos vinílicos en  $\delta$  5.35 (1H, t) para  $\beta$ -sitosterol (**3**) y  $\delta$  5.10 (2H, m) para estigmasterol (**4**). (Jamaluddin *et al.*, 1994) La presencia de estos esteroides en ambos extractos explican, por qué se observa un efecto hipoglucemiante en esta planta, ya que tanto  $\beta$ -sitosterol (**3**) como estigmasterol (**4**) aislados del extracto clorofórmico de *Parkia speciosa*, provocaron una disminución de los niveles de glucosa sanguínea en ratas a las que se les indujo diabetes por medio de administración de alloxan (Jamaluddin *et al.*, 1994). Estos mismos esteroides están involucrados en la estabilización de las membranas (Kongduany *et al.*, 2008) los cuales han demostrado también tener efecto hipoglucémico en sinergia con otras sustancias en el extracto etanólico de *Boehmeria rugulosa* (Samwal *et al.*, 1999) Se ha demostrado que esteroides de estructura semejante al  $\beta$ -sitosterol (Balamurayan *et al.*, 1999) aislado de *Lippia nodiflora* disminuyeron los niveles de glucosa e incrementaron la actividad de la insulina en rata.

Finalmente, el extracto de MeOH, aun cuando registró una actividad hipoglucemiante moderada pero estadísticamente significativa (Cuadro I.2), fue sometido a una percolación, aplicando una parte de este extracto a una columna empacada con sílica gel, para dar cinco fracciones (F1-F5). Éstas

fracciones se reevaluaron en el modelo de actividad hipoglucemiante empleando ratas con niveles normales de glucosa, de estas fracciones se eligió una de las más activas y de mayor cantidad en peso encontrada, seleccionándose la F5 que a la dosis de 177 mg/kg de peso corporal de la rata, resultó ser la más activa con un valor de glucosa en sangre de 69.8 mg/dL con respecto al control con un nivel de 78.7 mg/dL (Cuadro I.3) y por lo tanto se supuso que en dicha fracción estaría la coyolosa (**1**) sustancia hipoglucemiante aislada previamente del extracto de MeOH de las raíces de “coyol”, colectada en Tamaulipas (Pérez *et al.*, 1997) cuyo punto de fusión (p.f.) esperado sería de 170-172° C. Sin embargo, Haines (1999), trató de demostrar la estructura de la “coyolosa” sintetizándola a partir de varios disacáridos como D-allosa, D-galactosa, D-glucosa y D-mannosa concluye que la estructura de la forma como se reporta (Pérez *et al.*, 1997) probablemente no pueda ser producida biogénicamente por la biosíntesis de disacáridos, por lo que recomendó realizar estudios estructurales más profundos sobre este producto natural. Para facilitar el trabajo de aislamiento de metabolitos, esta fracción (F5) se sometió a una reacción de acetilación con la finalidad de obtener el derivado octaacetilado (**1a**) correspondiente al de la coyolosa con p.f. = 132-134° C (Haines, 2002). Al analizar por cromatografía en columna, uno de los productos mayoritarios de acetilación de la Fracción F5, se aisló un sólido cristalino cuyo p.f. fue de 118-120° C, dichos cristales resultaron ser adecuados para un estudio de rayos-X, por lo que su diagrama de difracción, correspondió exactamente con la estructura descrita para el hexaacetato de (D)-manitol (**2a**). Esto es indicativo que manitol (**2**) (p.f.=167-170°C) es un metabolito que se encuentra

abundantemente en el extracto de MeOH de la raíces de “coyol” colectada en Chiapas. La presencia de estos tres metabolitos en las raíces de esta accesión de “coyol” colectada en el sureste mexicano (Figura I.2), podría explicar su efecto hipoglucemiante por un efecto sinérgico, ya que se han encontrado indicios de sinergismo entre (D)-manitol e insulina administrados a ratas isquémicas (Kazan *et al.*, 1999) Se sugiere efectuar un mayor número de estudios de “coyol”, de acuerdo con la época de colecta, por ejemplo en cada estación del año y de distintos lugares de México donde se encuentre mayormente distribuida, con la finalidad de aislar la “coyolosa” (Figura I.1). También se recomienda investigar el efecto de los extractos de esta planta en modelos de ratas diabéticas o hiperglicémicas; así como evaluar el efecto conjunto que se pudiera esperar de  $\beta$ -sitoesterol, stigmasterol y manitol en los modelos biológicos mencionados.

## CONCLUSIONES.

Los extractos de hexano,  $\text{CHCl}_3$  y MeOH obtenidos de las raíces de “coyol”, provocaron una disminución de los niveles de glucosa en la sangre de ratas Wistar. La fracción F5 percolada del extracto de MeOH registró el mayor descenso de nivel de glucosa en ratas respecto a las demás fracciones y al control a lo largo de las 9 horas de evaluación por lo que considero que la disminución de los niveles de glucosa en ratas puede significar un importante indicador de una respuesta similar observada en la disminución de glucosa en sangre de los humanos al utilizar las infusiones de raíces. En este trabajo, el estudio fitoquímico de los extractos reveló la presencia de tres sustancias; en los extractos de hexano y  $\text{CHCl}_3$  el estigmasterol y  $\beta$ -sitosterol y manitol en el percolado F5 e identificado como su derivado hexaacetilado. En el extracto de MeOH, los estudios de análisis fitoquímico no revelaron la presencia de la “coyolosa” reportada por Pérez y colaboradores (1999). Con la finalidad de aislar “coyolosa” y otros metabolitos secundarios activos, sería conveniente investigar el efecto hipoglucemiante de varias accesiones de “coyol”, eligiendo varias localidades de colecta en los estados de Veracruz y Yucatán además de Tamaulipas y Chiapas donde se encuentra distribuida.

## LITERATURA CITADA.

- ANDRADE-CETTO, A.; HEINRICH, M. 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J Ethnopharmacol.* 99: 325–348.
- BALAMURUGAN, R.; DURAI PANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S.; 2011. Antidiabetic activity of  $\gamma$ -sitosterol isolated from *Lippia nodiflora* L. in streptozotocin induced diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.*; 667: 410–418.
- BALICK, M.J. 1990. Production of coyol wine from *Acrocomia mexicana* (*Arecaceae*) in Honduras. *Economic Bot.* 44(1): 84-93.
- HAINES, HA. 2003. Evidence on the structure of “coyolosa” Synthesis of 6,6'-ether linked hexoses. *Tetrahedron Lett.* 45: 8435-837.
- HERNÁNDEZ, E.; AGUILAR-CONTRERAS, A.; AGUILAR-SANTAMARIA, L.; ROMAN-RAMOS, R.; CHÁVEZ-MIRANDA; GARCÍA-VEGA, LM; FLORES-SÁENZ, JL.; ALARCÓN-AGUILAR, F.J. 2002. Studies on Hypoglycemic Activity of Mexican Medicinal Plants. *Proc West Pharmacol Soc.* 45: 118-124.
- JAMALUDDIN, F.; MOHAMED, S.; LAJIS, MM.; 1994. Hypoglycaemic effect of *Parkia speciosa* seeds due to the synergistic action of  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol. *Food Chem.* 49: 339-345.
- KAZAN, S.; KARASOY, M.; BALOGA, ELU H.; TUNCER, R. 1999. The Effect of Mild Hypothermia, Mannitol and Insulin-Induced Hypoglycaemia on Ischaemic Infarct Volume in the Early Period After Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion in the Rat. *Acta Neurochir (Wien).* 141: 979-987.

KONGDUANG, DJ.; WUNGSINTAWEEKUL, JW.; DE-EKNAMKUL, W. 2008. Biosynthesis of  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol proceeds exclusively via the mevalonate pathway in cell suspension cultures of *Croton stellatopilosus*. *Tetrahedron Lett.*; 49: 4067-4072.

PÉREZ, GS.; PÉREZ, GRM.; PÉREZ, GC.; ZAVALA, SMA.; VARGAS, S.R. 1997. Coyoiosa, a new hypoglycemic from *Acrocomia mexicana*. *Pharm Acta Helv.* 72: 105-111.

SEMWAL, DK.; RAWAT U.; SEMWAL, SR.; KRISHAN, P.; SINGHD, M.; SINGH, GJP. 1999. Chemical constituents from the leaves of *Boehmeria rugulosa* with antidiabetic and antimicrobial activities. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 11 (12): 1045–1055.

STEIN, Z.; GREENM, D.; GOLDBERG, I. 1992. Structure of hexaacetyl-D-mannitol. *Acta Cryst.* 2 (48) 1141-1143.

TOLEDANO, JC.; AVILA, JL., GARCÍA, JS.; GÓMEZ GH. 2008. Determinantes de adherencia terapéutica y control metabólico en pacientes ambulatorios con Diabetes mellitus tipo 2. *Rev. Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 39(4): 9-17.

ZUART-MACÍAS, J.L.; PONCE-DÍAZ P.; SANTIAGO-MARROQUÍN G.; QUIROGA-MADRIGAL R. 1999. Coyal palm (*Acrocomia mexicana*), a phylogenetic resource from Chiapas, México. *Acta Hort. (ISHS) II International Symposium on Ornamental Palms & other Monocots from the Tropics.* 486: 305-312.

## II. DETERMINACIÓN DE POLIMORFISMOS DE “COYOL” (*Acrocomia mexicana Kraw ex Marti*) MEDIANTE RAPDs

### RESÚMEN

Se estudiaron 36 accesiones de “coyol” en el Sureste de México de los estados de Chiapas, Tabasco y Veracruz por medio de la técnica RAPDs (Random Amplified Polimorphic DNA). Se utilizaron 25 iniciadores, de los cuales se seleccionaron doce, asociados con 67 bandas polimórficas. La técnica RAPDs permitió la separación en cinco grupos discretos. El coeficiente de parentesco (CR) varió de 0.48 observado entre las poblaciones de tabasco y las del Norte de Chiapas Tecpatán (tecp), así como de coeficientes de poblaciones de 0.90 de genotipos colectados en el Municipio de Nautla, Veracruz (ver), Huimanguillo, Tabasco (tab) y de la localidad de la Orquídea (orqui) del Norte de Chiapas.

#### **Palabras clave**

RAPDs, *Acrocomia mexicana*, polimórficos, iniciadores

**DETERMINATION OF POLYMORPHISMS "COYOL" (*Acrocomia mexicana*  
Kraw ex Marti) USING RAPDs**

**ABSTRACT**

We studied 36 accessions of "coyol" Southeast Mexico in the states of Chiapas, Tabasco and Veracruz by the RAPDs technique (Random Amplified DNA polymorphic). Initiators used 25 of which were selected twelve polymorphic bands associated with 67. RAPDs technique allowed separation into four discrete groups. The kinship coefficient (CR) ranged from 0.48 observed between populations of North Tabasco and Chiapas called Tecpatán (tecp) and coefficient of 0.90 populations of genotypes collected in the city of Veracruz Nautla (ver), Huimanguillo, Tabasco (tab) and locality North of Chiapas

**KEY WORDS:**

RAPDs, *Acrocomia mexicana*, polymorphics, initiators

## INTRODUCCIÓN

Para la conservación de la diversidad de los recursos genéticos es necesario el empleo de herramientas que la biotecnología puede brindar; se destacan la micropropagación y la Biología Molecular. Dentro de los marcadores moleculares se incluyen los basados en Southern como los RFLP, los basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), como los RAPDs.

La planta de “coyol” es una planta que pertenece a la familia de las Arecaceas, llega a más de 15 m de altura y tiene una amplia distribución geográfica, ya que va desde el Estado de Tamaulipas en México hasta Sudamérica y se considera que es muy abundante en las zonas de pastos. Según Lorenzi (1998), la dispersión de “coyol” se ve facilitada por una gran producción de frutos que son consumidos por los animales como forraje (Ramírez *et al.*, 2012)

Los frutos tienen un gran potencial para la producción de petróleo, con aplicaciones en la industria y los sectores de la energía (Rolim, 1981). En países como Brazil, se ha estudiado el potencial para la producción de aceite vegetal, la cual puede llegar a 4.000 L por Ha al año. Por lo que puede representar una alternativa el uso de aceite para la producción de biodiesel. En varias de regiones de México esta palma es económicamente importante, ya que se utiliza para fines ornamentales, alimenticios, textiles, dietéticos y medicinales. Debido a la gran importancia que tiene esta especie dentro de la cultura de México, es importante estudiar el comportamiento de sus poblaciones.

El conocimiento de los patrones de variabilidad genética entre y dentro de poblaciones es una valiosa herramienta que puede contribuir al desarrollo de prácticas más eficientes de conservación. La base de las especies es el mantenimiento de la conservación de la variabilidad genética en las poblaciones (Yeh *et al.*, 1996).

El estudio de los recursos fitogenéticos se ha convertido en una prioridad científica sobre todo aquellos con poco estudio y potencial comercial, lo que hace importante el estudio de esta diversidad mediante métodos cuantitativos que ayuden a agrupar poblaciones de un mismo género o especie, mediante similitudes de caracteres homólogos (Nuñez-Colín, 2004). La caracterización de la variabilidad genética puede llevarse a cabo a partir de medidas de diversidad genética intra e interpoblacional, que se pueden estimar a partir de datos de marcadores moleculares como el porcentaje de loci polimórficos, índice de fijación, heterocigosidad esperada en equilibrio de Hardy-Weinberg, la heterocigosidad observada (Berg y Hamrick, 1997; Cavallari-Neto, 2004).

Los RAPDs han sido satisfactoriamente usados para revelar variación genética relacionado dentro de las mismas especies (Nagarajan *et al.*, 2004). Los estudios sobre la variabilidad genética de “coyol” con marcadores genético-moleculares en México no se conocen. Por lo que, estudiar la diversidad genética natural de esta especie permitirá el desarrollo de las estrategias de conservación y otros programas de mejoramiento. El objetivo de este trabajo fue estudiar la variabilidad genética de “coyol” en el Sureste de México utilizando marcadores RAPDs.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Colecta de material vegetativo.**

Las colectas de material vegetativo se realizaron en la localidad de Nautla, Veracruz ( $ver_1-ver_n$ ), Huimanguillo en Tabasco ( $tab_1-tab_n$ ), la localidad de la Orquidea ( $orqui_1-orqui_n$ ) y Tecpatán ( $tecp_1-tecp_n$ ), ambos del mismo Municipio, así como la localidad de Arriaga, ( $Arr_1-Arr_n$ ) de Arriaga, Chiapas. En total fueron 5 sitios de muestreo en los cuales se colectaron en promedio 8 genotipos por localidad.

Las muestras colectadas fueron hojas jóvenes que se colocaron en bolsas de polipropileno dentro de una hielera con hielo para su preservación hasta el laboratorio ubicado en la Universidad Autónoma Chapingo.

El estudio de las muestras se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Aplicada de la Universidad Autónoma Chapingo.

### **Extracción del ADN**

Los procedimientos para extracción de ADN genómico de plantas incluyen tratamientos que rompen las paredes y membranas celulares para liberar los constituyentes celulares dentro de un amortiguador de extracción que contiene compuestos para proteger al ADN de la actividad de nucleasas endógenas (Griffin y Griffin, 1994). El método presentado aquí es una modificación del procedimiento de extracción de ADN genómico de plantas descrito por Doyle y Doyle (1999). Las concentraciones de ADN fueron determinadas midiendo la absorbancia a 260 nm con un espectrofotómetro (Espectronic<sup>MR</sup>). Para calcular

la concentración de ADN de tejido fresco se expresan en  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  [ ]= $\text{Abs } 260 \text{ nm}$   
Factor de dilución/200 El cálculo de la calidad del ADN involucra las  
absorbancias a 260 y 280 nm. Si el resultado está dentro del rango de 1.8 a 1.9,  
significa que el ADN es de buena calidad. Calidad =  $\text{Abs } 260 / \text{Abs } 280$

### **Purificación de ADN de plantas.**

Se maceró 0.3 g de tejido fresco (hoja) en nitrógeno líquido evitando que se descongelara. Posteriormente se pasó el tejido pulverizado a un microtubo de 1.5 mL con 600  $\mu\text{L}$  de amortiguador de extracción, el cual se mezcló muy bien, agitándose por unos segundos con la ayuda de un vortex. Se incubó la muestra a 65°C por 10 minutos, con inversión ocasional de los tubos. Se adicionó 200 $\mu\text{L}$  de acetato de potasio 5 M, agitando por inversión y dejándose 30 minutos en el hielo. Se centrifugó a 15,000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se transfirió el sobrenadante a otro microtubo conteniendo 700  $\mu\text{L}$  de isopropanol frío, mezclándose por inversión y dejándose enfriar a -20°C durante 30 minutos. Posteriormente se centrifugó por 5 minutos a 10,000 x g a temperatura ambiente. Luego se añadieron 2  $\mu\text{L}$  de ARNasa y se incubó a 37°C por 1 hora. Posteriormente se le adicionó 20  $\mu\text{L}$  de acetato de sodio 3 M y 200 $\mu\text{L}$  de isopropanol, mezclándose por inversión y dejando a -20°C por 2 horas. Se centrifugó 5 minutos a 10,000 x g a temperatura ambiente y finalmente se eliminó el sobrenadante, lavándose el precipitado con 300  $\mu\text{L}$  de etanol al 70 % v/v, dejando secar la pastilla y disolviendo en 100  $\mu\text{L}$  de TE y almacenando a 4°C.

### **Mezcla de reacción de la PCR para la obtención de los patrones RAPDs**

Se realizó una mezcla de los reactivos siguientes: En un tubo Eppendorf, en un volumen de 25µL adicionando al final la enzima.

### **Mezcla de reacción de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa)**

	<b>1X (µL)</b>
Agua bidestilada estéril	<b>3.2</b>
dNTPs (500 µM)	<b>10.0</b>
Amortiguador 10X	<b>2.5</b>
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	<b>1.0</b>
Iniciador (10 pmol/µL)	<b>3.0</b>
ADN (10 ng/µL)	<b>5.0</b>
Enzima (Taq ADN polimerasa 5U/µL)	<b>0.3</b>
<b>T O T A L</b>	<b>25µL</b>

Se incubaron las muestras en los tubos Eppendorf en el termociclador y se llevó a cabo la reacción de polimerización bajo las condiciones siguientes: 1 ciclo a 94°C, durante dos minutos, 38 ciclos a 94°C, durante 30 segundos, 40°C, durante 30 segundos, 75°C, durante 1 minuto y 30 segundos ciclo a 72°C durante 1 minuto y 30 segundos.

La observación de los patrones RAPDs, se realizó después de la electroforesis en un gel de agarosa al 1.2 % p/v y teñido con bromuro de etidio, visualizándose en el fotodocumentador bajo luz UV (BIORAD<sup>M.R.</sup>).

## **Amplificación del ADN**

El programa de PCR normalmente usado para análisis RAPDs, es un programa típico excepto durante la alineación del iniciador, esta es mucho menor que la usual, debido a que el iniciador usado en el procedimiento RAPDs es relativamente corto y tiene una secuencia arbitraria. Se utilizaron iniciadores enviados a sintetizar en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México de las series: OPA, OPB, OPC, OPD y OPF de la amplificar por PCR.

Los componentes de la reacción (*In vitro* gen<sup>M.R</sup>) fueron: Buffer 10X, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, dNTPs 10 mM, iniciadores 10 pM/μl, Taq 5u/μL, ADN genómico. Las condiciones de PCR que se manejaron fueron 94 °C por 2 min, 36 ciclos de 94 °C por 1 min, 36 °C por 1 min y 72 °C por 1 minuto, continuando con 72 °C por 10 min, dejando el producto de amplificación a 4 °C hasta su uso. Después de la amplificación, las muestras fueron cargadas en un gel de agarosa al 1.2% en buffer TAE 1X a 120 V. Se utilizó un marcador de peso molecular de 1 kb. El gel fue teñido en una solución de bromuro de etidio durante 10 min y desteñido en agua por 3 min. Solamente las bandas reproducibles en múltiples corridas, indiferentemente de su intensidad, fueron consideradas en el estudio.

## **Separación del ADN por medio de electroforesis en geles de agarosa**

Se preparó un gel de agarosa al 1.2 % p/v en amortiguador de corrida TAE 1 x, calentándose en un horno de microondas para fundir la agarosa y dejando enfriar hasta que se solidificara.

Posteriormente se quitó el peine cuidadosamente y se agregó 12.5  $\mu\text{L}$  de muestra, 2 $\mu\text{L}$  de colorante de carga. Se colocó cada muestra en los pozos del gel. Se corrió la electroforesis a 120 volts durante 10 minutos, permitiendo la entrada de las muestras al gel: Luego se ajustó el voltaje a 100 volts, hasta finalizar la electroforesis (Valadez y Khal, 2000).

Se sacó el gel de la cámara de electroforesis y se observó bajo la luz UV en el transluminador marca BIORAD <sup>M.R.</sup>.

### **Análisis de datos**

Las bandas reproducibles en geles fueron señaladas como presente (1) o ausente (0) para cada muestra estudiada, generando así una matriz de 0 y 1. La matriz fue transformada en un dendograma. Para cuantificar la variabilidad genética y estimar su distribución entre las poblaciones, se realizó análisis molecular mediante el coeficiente del índice de similitud de Jaccard usando el programa NTSYSpc.ver.2.2 (Rohlf, 2000).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

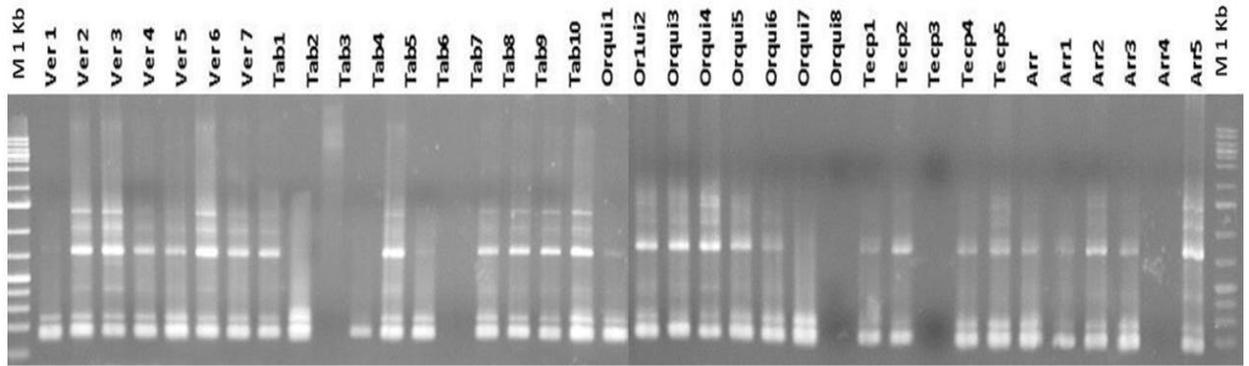
Se presentan los resultados de los 36 genotipos estudiados utilizando 12 iniciadores para la determinación de los polimorfismos (Cuadros II.1 y II.2); así mismo se presentan el patrón de bandeo (Figura II.1) de cada genotipo y los agrupamientos con base a su similitud genética utilizando el coeficiente del índice de similitud de Jaccard (Figuras II.2 y II. 3)

**CUADRO II.1** Iniciadores, secuencias y número de bandas polimórficas obtenidas con los RAPDs en genotipos de “coyol” del Sureste de México.

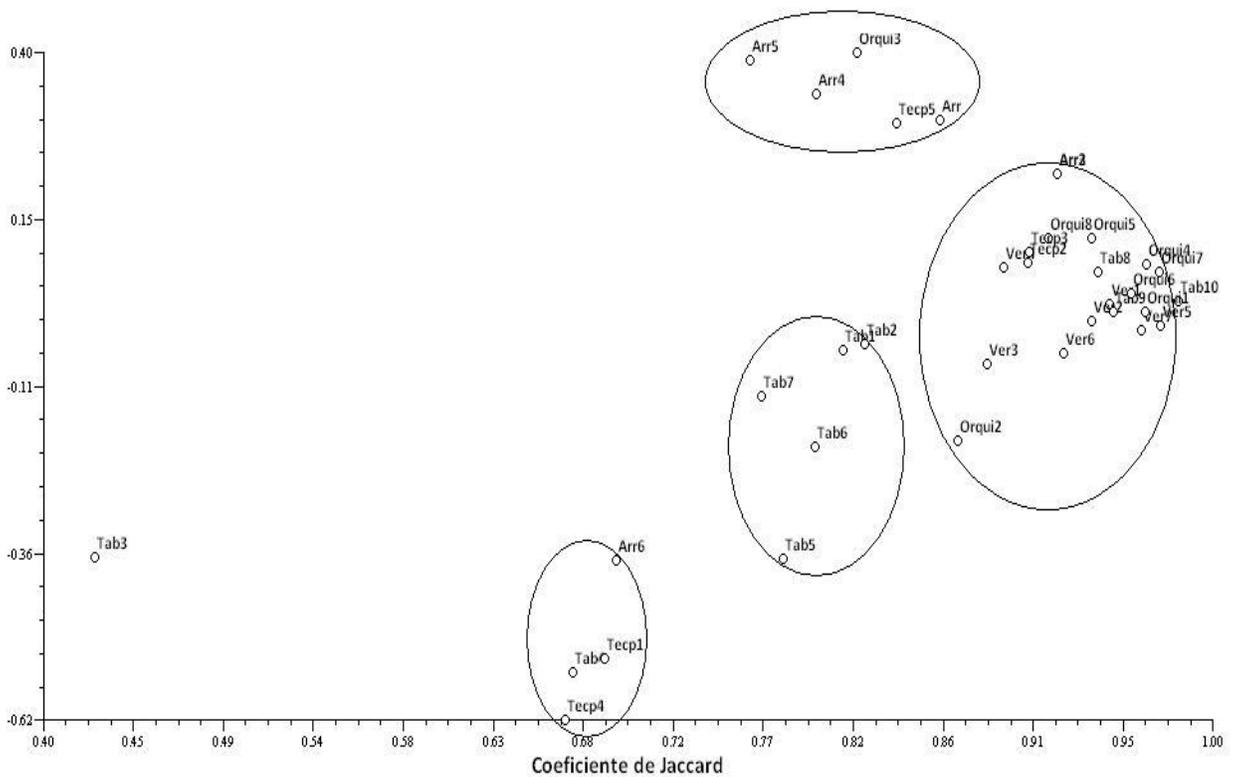
Iniciador	Secuencia (5'-3')	Número de bandas polimórficas.
OPA13	CAGCACCCAC	5
OPA04	AATCGGGCTG	5
OPD16	AGGGCGTAAG	5
OPB10	CTGCTGGGAC	6
OPB8	GTCCAGACGG	5
OPB9	TGGGGGACTC	5
OPD20	ACCCGGTCAC	6
OPF10	GGAAGCTTGG	4
OPC2	GTGAAGCGTC	5
OPF12	GGCTGCAGAA	7
OPB4	GGAAGCTTGG	7
OPB7	GGTGACGCAG	7
<b>TOTAL</b>		<b>67</b>

**Cuadro II.2.- Bandas totales por genotipo con 12 iniciadores evaluados.**

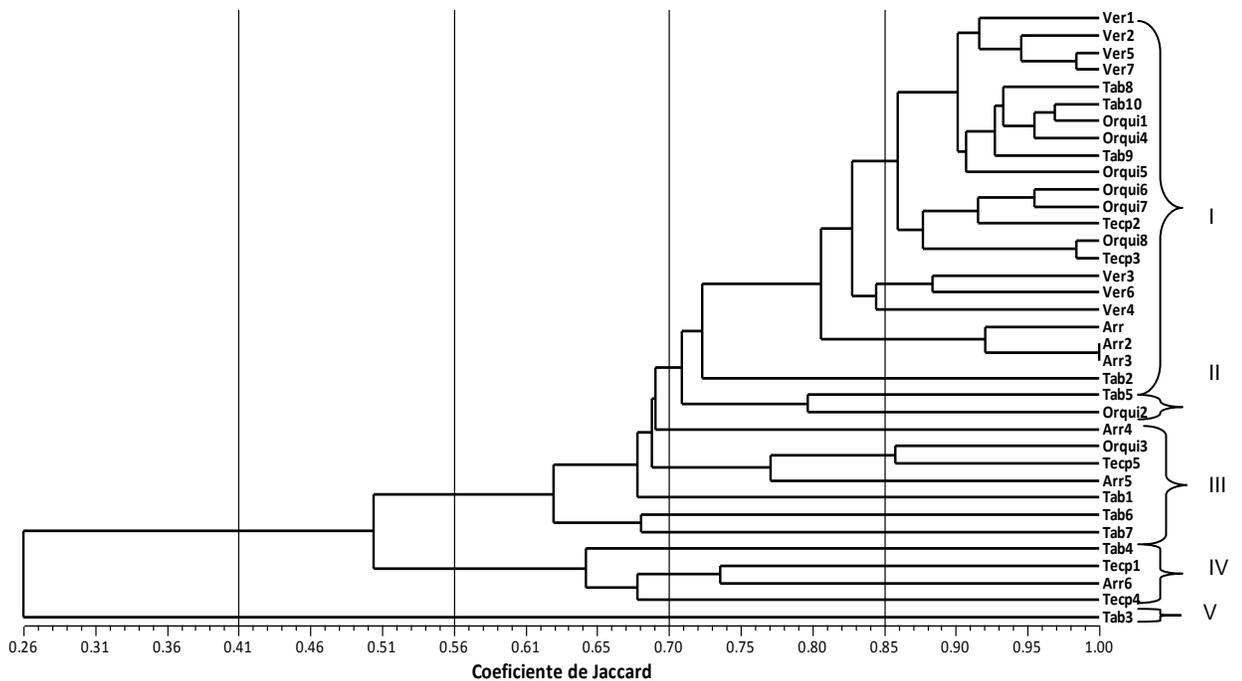
<b>Sitio de colecta</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Número de bandas totales por genotipo</b>
Nautla, Veracruz	Ver1	60
Nautla, Veracruz	Ver2	63
Nautla, Veracruz	Ver3	56
Nautla, Veracruz	Ver4	57
Nautla, Veracruz	Ver5	64
Nautla, Veracruz	Ver6	59
Nautla, Veracruz	Ver7	65
Huimanguillo, Tabasco	Tab1	53
Huimanguillo, Tabasco	Tab2	56
Huimanguillo, Tabasco	Tab3	19
Huimanguillo, Tabasco	Tab4	35
Huimanguillo, Tabasco	Tab5	53
Huimanguillo, Tabasco	Tab6	47
Huimanguillo, Tabasco	Tab7	44
Huimanguillo, Tabasco	Tab8	62
Huimanguillo, Tabasco	Tab9	63
Huimanguillo, Tabasco	Tab10	66
La orquídea, Tecpatán	Orqui1	64
La orquídea, Tecpatán, Chiapas	Orqui2	55
La orquídea, Tecpatán, Chiapas	Orqui3	53
La orquídea, Tecpatán, Chiapas	Orqui4	67
La orquídea, Tecpatán, Chiapas	Orqui5	65
La orquídea, Tecpatán, Chiapas	Orqui6	65
La orquídea, Tecpatán, Chiapas	Orqui7	66
La orquídea, Tecpatán, Chiapas	Orqui8	63
Tecpatán, Tecpatán, Chiapas	Tacp1	39
Tecpatán, Tecpatán, Chiapas	Tacp2	61
Tecpatán, Tecpatán, Chiapas	Tacp3	62
Tecpatán, Tecpatán, Chiapas	Tacp4	34
Tecpatán, Tecpatán, Chiapas	Tacp5	53
Arriaga, Chiapas	Arr	60
Arriaga, Chiapas	Arr1	63
Arriaga, Chiapas	Arr2	63
Arriaga, Chiapas	Arr3	50
Arriaga, Chiapas	Arr4	49
Arriaga, Chiapas.	Arr5	41



**Figura II.1 Patrón de bandas de genotipos analizados con el iniciador OPA04, utilizando un marcador lateralmente de 1 kb en geles de agarosa al 1.2 % reveladas con bromuro de etidio.**



**Figura II.2 Agrupamientos obtenidas en 36 genotipos de 5 poblaciones del Sureste de México, estimadas con el coeficiente del índice de similitud de Jaccard.**



En este trabajo se encontró que los 12 iniciadores evaluados con los 36 genotipos pertenecientes a 5 regiones geográficas (localidades) generaron un promedio de 4.6 bandas por iniciador. Así mismo en el análisis de agrupamientos se originaron 5 cluster (Figura II.2), los cuales representan el grado de similitud genética entre los individuos que forman cada grupo. Se detectaron 67 bandas polimórficas de un total 1995 bandas, correspondientes a 36 individuos analizados con 12 iniciadores con bandas de diferentes pesos moleculares. Los iniciadores que mayor información, presentaron, fueron tres con 7 bandas polimórficas cada uno; OPF12, OPB7 y OPB4, pudiendo sugerir su gran valor para futuras investigaciones en identificación genotípica de “coyol”. Los genotipos que mayor grado de similitud, son los correspondientes a Veracruz ( $ver_5$  y  $ver_7$ ); así mismo los genotipos correspondientes a la orquídea

y tecpatán (orqui<sub>8</sub> y tecp<sub>3</sub>); por el contrario el que menor grado de similitud presentó, fue el genotipo más alejado el tab<sub>3</sub>, ya que es el último que se incorpora al grupo con un valor de 0.26. En este trabajo se encontró que individuos pertenecientes de diferentes zonas geográficas comparten los mismos alelos por un presumible alto flujo génico. Así mismo algunos individuos que pertenecen a una población distinta a donde fueron colectados, tuvieron proximidad genética entre sí. Lo anterior podía explicarse que dado la importancia que tiene esta especie por su valor alimenticio y de forraje principalmente, estos genotipos o las poblaciones se traslapan debido a factores como la dispersión de las semillas, posible selección lo que provoca un traslape genético entre individuos de diferentes poblaciones, de tal forma que las poblaciones están en constante variación. Por otra parte no se encontró bandas que estuvieran totalmente todos los 12 iniciadores analizados en algunos hay genotipos que no aparecieron como es el caso del primer OPA04. El porcentaje de loci polimórficos ha sido usado como una medida de la diversidad genética en estudios con poblaciones a través del uso de marcadores dominantes como los RAPDs (Xia *et al.*, 2007). Oliveira, *et al.*, 2012, realizó estudios de diversidad genética en *Acrocomia aculeata* utilizando RAPDs en genotipos del Norte de Brasil. En 49 genotipos estudiados con 11 iniciadores generaron 47 bandas polimórficas, así mismo encontraron altos niveles de diversidad genética dentro de las 5 poblaciones estudiadas. Los índices de diversidad genética fueron altos en la mayoría de 49 genotipos estudiados y que fueron determinados mediante el índice de Nei. En este trabajo, la planta de “coyol” presentó variabilidad genética formando diferentes

clusters compuestos por individuos tanto del mismo grupo (de un mismo sitio de colecta) como de familias diferentes (de diferente sitio de colecta) lo que sugiere diferencias tanto a nivel de especie como de poblaciones. Lo cual podría explicarse debido a factores de flujo génico como la polinización o por el efecto antrópico en los procesos de dispersión de semillas, Sin embargo, algunos autores como Keuffer *et al.* (2007) describen una importante influencia debida que el fruto de la palma de “coyol” es comestible en fresco, Por otra parte la presencia de individuos distantes genéticamente como el Tab<sub>3</sub> pueden ser atribuidas a la presencia de nuevas variantes alélicas como consecuencia de las adaptaciones específicas a cada región, resultados similares fueron reportados por Bakoumé *et al.* (2007) en la palma *Elaeis guinensis* quien atribuyó la presencia de variantes no sólo a procesos de deriva genética, sino también a los de selección. Por otra parte la variación también se atribuya a las características que tienden a tener las poblaciones naturales de especies alógamas de especies como la palma de “coyol” (Vallejo y Estrada, 2002)

Sin embargo, hay otros factores que juegan un papel importante en los niveles del desequilibrio de ligamiento en una población como son la distancia física entre los loci, las tasas de recombinación, el apareamiento al azar, los patrones de reproducción (sexual, asexual, alógama o autógena), los procesos de mutación, el tamaño poblacional, el efecto fundador y los cuellos de botella (Flint-García *et al.*, 2003; Hartl y Clark, 1997). Finalmente el número de bandas obtenidas o alelos detectados por cada iniciador puede ser atribuido independientemente del número de repeticiones de cada locus, depende de la naturaleza del germoplasma y por ende de su variabilidad.

## **CONCLUSIONES.**

En general en el presente estudio con el uso de marcadores genético fue posible evidenciar la variabilidad genética que existe entre los genotipos estudiados. Tomando en cuenta los índices de similitud de Jaccard, los genotipos con mayor índice de similitud fueron en su mayoría los provenientes la llanura costera del Golfo de México como son: los genotipos colectados en Veracruz, Tabasco y Norte de Chiapas (Tecpatán y la Orquídea) y por lo tanto menor diversidad. Por el contrario aquellos con menor índice de similitud y que resultaron alejados de la gran mayoría estos presentan mayor diversidad.

El número de bandas obtenidas o alelos detectados por cada iniciador puede ser atribuido independientemente del número de repeticiones de cada locus, depende de la naturaleza del germoplasma y por ende de su variabilidad. Sin embargo el presente estudio permitió identificar la diversidad genética que existe entre las poblaciones del Sureste Mexicano de las regiones estudiadas, ya que se determinaron 5 subgrupos o clusters.

## LITERATURA CITADA

- BAKOUMÉ C.; R. WICKNESWARI; N. RAJANAIDU; A. KUSHAIRI; P. AMBLARD Y N. BILLOTE. 2007. Allelic diversity of natural oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Populations detected by microsatellites markers. Implications in conservation. *Palmas* 28 (1): 149-158.
- BERG, EE. Y HAMRICK, JL (1997). Quantification of genetic diversity at *Allozyme loci*. *Can. J. Forest Res. Ottawa* 27: 415-424.
- CAVALLARI-NETO, M. 2004. Efeito do manejo na diversidade genética de populações naturais de *Tabebuia cassinoides* LAM (DC), por marcadores isoenzimáticos.
- DOYLE, J. Y DOYLE, J. (1990). Isolation of Plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 13-15.
- FLINT-GARCÍA, S., M. J. THORNSBERRY Y E. S. BUCKLER IV. 2003. Structure of linkage disequilibrium in plants. *Annual Review of Plant Biology*. 54: 357-74.
- HARTL, D.L. Y A. G. CLARK. 1997. Principles of population genetics. 3a. ed. Sinauer Associates, Sunderland Massachusetts. 542 pp.
- MARTÍNEZ. 2012. Agroecology importance of coyul (*Acrocomia mexicana* Karw. ex Mart.). *Estudios Sociales*. 21(41): 97-113.
- NAGARAJAN, G.; NAM, M. H.; SONG, J. Y.; YOO, S. J. AND KIM, H. G. 2004. Genetic variation in *Fusarium oxysporum* f. sp. *Fragariae* populations based on RAPD and rDNA RFLP analyses. *Plant Pathology Journal*. 20: 264-270.
- NÚÑEZ-COLÍN, C.A.; J.E. RODRÍGUEZ-PÉREZ; R. NIETO-ÁNGEL; A. F. BARRIENTOS-PRIEGO. 2004. Construcción de dendrogramas de taxonomía

numérica mediante el coeficiente de distancia: una revisión. Chapingo, Serie Horticultura. 10(2): 229-237.

OLIVEIRA, D.A.; A.F. MELO JÚNIOR; M.M. BRANDÃO; L.A. RODRIGUE; E.V. MENEZES AND P.R.B. FERREIRA. 2012. Genetic diversity in populations of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae) in the northern region of Minas Gerais, Brazil. Genetic and Molecular Research. 11 (1): 531-538.

RAMÍREZ-HERNÁNDEZ, B.C.; JULIA ZAÑUDO HERNÁNDEZ; JOHN PAUL DÉLANO FRIER; ENRIQUE PIMIENTA BARRIOS; MIGUEL ÁNGEL GARCÍA ROHLF, F.J. (2000). Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 2.11. Applied Biostatistics, New York. Estudios Sociales 21(41): 97-113.

ROLIM, AAB. (1981). Óleos vegetais: usos gerais. *Informe Agropec.* 82: 17-22.

VALADÉZ, M. E. Y KAHL, G. (2000). Huellas de ADN en Genomas de Plantas: Teoría y protocolos de laboratorio. Mundi-Prensa, México, D.F. 147 p.

VALLEJO, F. Y ESTRADA, E. 2002. Mejoramiento genético de plantas. Universidad Nacional de Colombia- sede Palmira. ISBN 958-8095. 1:11-5.

XIA, T.; CHEN, S.; ZHANG, D.; GAO, Q. (2007). ISSR analysis of genetic diversity of the Qinghai-ibet Plateau endemic *Rhodiola chrysanthemifolia* (Crassulaceae). Biochem. Syst. Ecol. 35: 209-214.

YEH, FC.; YANG, RC.; BOYLE, TBJ.; YE, ZH. 1997. POPGENE, the User-Friendly Shareware for Population Genetic Analysis Molecular Biology and Biotechnology Centre. University of Albert, Edmonton

### III. EVALUACION DE RESPUESTAS DE CULTIVO *IN VITRO* DE “COYOL”

(*Acrocomia mexicana Kraw ex Marti*)

#### RESÚMEN.

La palma de “coyol” de la familia de las *Arecaceas* denominada en México, incide en varios aspectos de la vida de los mexicanos como son: el económico, cultural, ecológico y medicinal. En el Sureste de México y Honduras se produce a partir de la savia de esta especie, la bebida denominada “taberna”, la cual contiene un 12% v/v de alcohol. Así mismo en Sudamérica en Brazil, se le utiliza por su alto potencial para la producción de aceite para usos industriales, ya que se estima una producción hasta de 5000 kg por hectárea de aceite. También posee un alto potencial para la producción de carbón de calidad a partir del endocarpo del fruto.

En México las poblaciones naturales de esta especie, están siendo afectadas por una enfermedad causada por el hongo del genero *Pastelotia*, causando la muerte hasta en un 50%. Para su propagación esta especie presenta una testa muy dura que dificulta su germinación y puede tardar hasta 12 meses; así mismo tiene bajos índices de germinación y desarrollo lento

En este trabajo, se evaluó el efecto de diferentes factores en el cultivo *in vitro* de embriones cigóticos de “coyol” utilizando el medio de M.S. (1962). Los factores evaluados fueron: El efecto de diferentes agentes antioxidantes para el control de la fenolización de embriones cigóticos, el efecto del tiempo de almacenamiento en la germinación *in vitro*, así como el efecto de diferentes reguladores en la germinación de embriones y desarrollo de plántulas,

formación de callos a partir de vástago sin ápice y raíces *in vitro*. Los resultados sobresalientes, muestran que se logró el control *in vitro* de la fenolización de los tejidos embrionarios con 1 g. L<sup>-1</sup> de carbón activado en el medio de cultivo de M.S. (1962), los embriones se desarrollaron completamente en plántulas a las 12 semanas de cultivo *in vitro* con un 1 mg.L<sup>-1</sup> de BA con 0.5 mg.L<sup>-1</sup> de KIN. Los mayores índices de germinación se obtuvieron en embriones colectados en las regiones ubicadas en la costa del Sureste de México a menos de 100 msnm, los cuales alcanzaron hasta un 77.71 %, correspondientes a la Región Istmo Costa del Pacífico de Estado de Chiapas, México.

Palabras clave: *Acrocomia*, germinación, embrión, cigótico,

Abreviaturas: M.S (Murashige y Skoog), BA (Bencil adenina)), CIN (cinetina) , 2, iP (dos isopentiladenia), 2,4-D (2, 4, Diclorofenoxiacético), TDZ (tidiazurón), AIA (ácido indol acético), PVP (polivinilpirrolidona).

## **EVALUATION OF RESPONSES *IN VITRO* CULTURE OF “COYOL” (*Acrocomia mexicana* Kraw ex Marti).**

### **ABSTRACT**

The Palm of “coyol” family of Arecaceas denominated in México affects various aspects of Mexican life such as: economic, cultural, ecological and medicinal. In Southeast Mexico and Honduras is produced from the sap of this species the drink called "taberna", which contains 12 % v/v alcohol. Also in South America in Brazil it is used for its high potential for oil production for industrial uses as

production is estimated up to 5000 kg per hectare of oil. It also has a high potential for producing quality coal from the fruit endocarp.

In Mexico the natural populations of this species are being affected by a disease caused by the fungus genus *Pastelotia*, killing up to 50 %. It is also used as fodder for livestock, food, textile and medicinal use. To spread this species has a very hard seed coat that hinders germination and may take up to twelve months, likewise have low germination rates and slow development as it reaches maturity to twelve years.

In this work we evaluated the effect of different factors on the *in vitro* culture of “coyol” zygotic embryos using a media of M.S. (1962). Factors were evaluated: The effect of different antioxidants for controlling the zygotic embryos phenolization the effect of storage time on the germination *in vitro* and the effect of different regulators embryo germination and seedling development, callus formation from stem without apex and roots *in vitro*. The outstanding results achieved show that control *in vitro* of embryonic tissues phenolization with  $1 \text{ g.L}^{-1}$  activated charcoal in the culture medium M.S. (1962) fully developed embryos into plantlets at 12 weeks *in vitro* culture with  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  BA combined with  $0.5 \text{ mg.L}^{-1}$  kinetin. The highest germination rates were obtained from embryos collected in the regions located on the coast of Southeastern Mexico within 100 meters, which reached up to 77.71 %, corresponding to the Isthmus Region Pacific Coast of Chiapas, Mexico.

## INTRODUCCIÓN.

La riqueza y diversidad de la flora nativa con que cuenta México, representa un potencial que puede ser empleado para satisfacer nuestras necesidades. Sin embargo la mayoría no están siendo aprovechadas por falta de estudios que revaloren sus usos. Tal es el caso de la palma de “coyol”, interesante desde diversos puntos de vista, ya que incide en varios aspectos de la vida de los mexicanos como son: el económico, cultural, ecológico y medicinal.

En México esta palma es ampliamente aprovechada ya que de esta se utilizan sus diversos órganos desde los frutos para consumo, su médula, las hojas y sus fibras para elaborar ropa, en la medicina tradicional se usa para el control de la diabetes, así mismo su fruto se usa como forraje para ganado. En el Estado de Chiapas, México y Honduras donde se le conoce como palma de vino se usan en la elaboración de una bebida alcohólica denominada taberna con un contenido de alcohol del 12% v/v, la cual es obtenido a través de la sabia y por lo cual año con año se derriban miles de árboles adultos por esta práctica. Por otra parte se tiene reportes de un alto potencial para la producción de aceite ya que se estima que se pueden obtener de esta especie hasta 5000 kg por hectárea; así mismo también posee un alto potencial para la producción de carbón de calidad que podría ser producido a partir del endocarpo del fruto (Tickell, 2000)

Estudios realizados por Zuart-Macías *et al.*(1999) en Chiapas México alertaron sobre una disminución drástica en el número de sus poblaciones debido a la falta de un manejo, presumiblemente por dos causas, una debido a que la

semilla de esta especie tiene dificultades para su germinación debido principalmente a las características de su fruto la cual posee una testa muy dura y hace difícil romper el letargo de la semilla requiriendo a veces hasta 13 meses para su germinación, además se tiene tasas muy bajas de germinación, única forma de propagación natural, ya que esta especie no produce yemas adventicias, aunado esto se suma la presencia de la enfermedad que produce la muerte de un gran número de plantas silvestres, afectando aproximadamente un 50% de los individuos estudiados de las poblaciones naturales en Chiapas, México, el cual tiene como agente causante una nueva especie de hongo del género *Pastelotia*, siempre asociada a enfermedades de las palmas (Zuart-Macías *et al.*,1999). Por lo anterior actualmente esta especie en México se encuentra considerada en peligro de extinción de acuerdo a la norma oficial mexicana NoMEcol 052 y por lo que es necesario buscar alternativas para su propagación más rápida y efectiva mediante las técnicas de cultivo *in vitro* que puedan servir como herramienta para su propagación masiva que ayude ya sea utilizando embriones sexuales que disminuyan el tiempo que tarda en germinar la semilla en condiciones naturales y aumente la tasa de germinación mediante condiciones controladas o mediante las vías de organogénesis y/o embriogénesis en cultivo *in vitro* que permitan contar con protocolo eficiente de propagación para que en lo sucesivo se establezcan programas de regeneración de las poblaciones naturales de México.

En este trabajo se realizó la evaluación de respuestas del cultivo *in vitro* de “coyol”.

## **MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **Colecta y preparación de material vegetativo.**

Se realizó la colecta de frutos en diferentes regiones estados de México, como son: Nautla, Veracruz; Huimanguillo, Tabasco; en Chiapas en las localidades de Tiltepec y Villaflores de la Depresión Central, Arriaga de la región Costa, San Fernando de la Región Centro y Tecpatán de la Región Norte del mismo Estado.

Los frutos monocárpicos maduros fueron colectados en mes de mayo, se colectaron 200 de cada localidad y después llevados al laboratorio donde fueron seleccionados y preparados para la extracción del embrión, para ello fueron desprovistos de el pericarpio, mesocarpio y endocarpio mismas que se rompieron con la ayuda de un martillo hasta descubrir la semilla misma que contenía el embrión. La semilla fue lavada con detergente al 1 % p/v y enjuagada con agua destilada. Posteriormente se extrajeron los embriones los cuales fueron sumergidos en una solución antioxidante estéril con 150 mg.L-1 de ácido ascórbico y cítrico cada uno.

Posteriormente una vez extraídos todos los embriones de los frutos fueron desinfectados dentro de una campana de flujo laminar. Este consistió en sumergir los embriones en una solución de metanol al 70% v/v por un minuto luego transferidos a una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 10% v/v y 1% de tween 80 durante 10 minutos, posteriormente fueron enjuagados por 3 veces con agua estéril. Los embriones fueron colocados en tubos de cultivo de 22 mm x 180 mm.

## **Efecto de agentes antioxidantes en el control *in vitro* de fenolización de embriones cigóticos.**

Los embriones fueron cultivados en sales de M.S. (1962) al 50% v/v suplementado con 0.4 mg.L<sup>-1</sup> de tiamina, 100 mg.L<sup>-1</sup> de mioinositol, 3% p/v de sacarosa, 100 mg.L<sup>-1</sup> de sulfato de adenina, 0.7% p/v de agar-agar, el pH fue ajustado a 5.7.

Los tratamientos evaluados para el control de oxidación fueron: 1 g.L<sup>-1</sup> de carbón activado, 0.1 g.L<sup>-1</sup> carbón activado, 0.1 g.L<sup>-1</sup> de PVP más 0.1 g.L<sup>-1</sup> de cisteína, 0.1 g.L<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub> (Nitrato de plata) y el testigo sin agente antioxidante únicamente con sales de M.S. (1962).

Se utilizó un diseño completamente al azar, en total se evaluaron 20 unidades experimentales por tratamiento, cada unidad experimental consistió en un tubo con un embrión, en total se evaluaron 100 unidades experimentales incluyendo el testigo.

Las variables evaluadas fueron, niveles de control de oxidación de embriones cultivados, representándose con la siguiente simbología; para control alto (+ + +), control medio (+ +) control bajo (+), así también número de embriones desarrollados (%).

Los embriones fueron incubados a 25 ± 2 ° C en completa oscuridad por dos semanas, posteriormente fueron cambiados a un fotoperiodo de 16/8 horas y una intensidad lumínica de 1800 lux por 4 semanas.

## **Evaluación de desarrollo *in vitro* de embriones cigóticos procedentes de siete 7 regiones del sureste de México.**

### **Medio de cultivo.**

Los embriones cigóticos procedentes de varias regiones de México se cultivaron en tubos con 25 mL de medio de cultivo conteniendo sales de M.S. (1962) al 50% v/v suplementado con 0.4 mg.L<sup>-1</sup> de tiamina, 100 mg.L<sup>-1</sup> de mioinositol, vitaminas W.S., 3% p/v de sacarosa, 100 mg.L<sup>-1</sup> de sulfato de adenina, 1g. L<sup>-1</sup> de carbón activado, 0.7% p/v de agar-agar, el pH fue ajustado a 5.7. Los embriones fueron incubados a 25 ± 2 ° C en completa oscuridad por dos semanas, posteriormente fueron cambiados a un fotoperiodo de 16/8 horas y una intensidad lumínica de 1800 lux por 4 semanas

Se utilizó un diseño de experimento completamente al azar, con 5 repeticiones por localidad cada uno con 10 unidades experimentales, la unidad experimental consistió en un embrión por tubo de ensayo de 20 x 180 mm con un embrión. La variable evaluada fue el porcentaje de embriones germinados, datos que fueron transformados con la función arcoseno  $\sqrt{(x/100)}$  para ser analizados con la prueba de comparación de medias de Tukey al 0.05%.

### **Influencia del efecto del tiempo de almacenamiento en el desarrollo *in vitro* de embriones cigóticos.**

Se evaluó la capacidad de desarrollo de los embriones cigóticos *in vitro* almacenados a temperatura ambiente una vez colectados en campo; los embriones fueron colectados en el mes de abril en la Costa de Chiapas con mayor porcentaje de germinación obtenida en pruebas de laboratorio realizadas

*in vitro*; los periodos evaluados (tratamientos) fueron una semana, dos meses, seis meses y doce meses de haberse colectado cada uno con 5 repeticiones por tratamiento de 10 tubos con un embrión. Se empleó un experimento completamente al azar.

Los embriones fueron cultivados en medio de M.S. (1962) suplementado con 0.4 mg.L<sup>-1</sup> de tiamina, 100 mg.L<sup>-1</sup> de mioinositol, 3% p/v de sacarosa, 100 mg.L<sup>-1</sup> de sulfato de adenina, 1g. L<sup>-1</sup> de carbón activado y vitaminas W.S. 0.7% p/v de agar-agar, el pH fue ajustado a 5.7. Los embriones en medio de cultivo, inicialmente fueron puestos dos semanas en completa oscuridad y después fueron cambiados bajo condiciones de luminosidad a 1800 lux y un fotoperiodo de 16/8 horas luz y una temperatura de 25 ± 2 ° C. La variable evaluada fue número de embriones desarrollados (%) por tratamiento.

### **Evaluación de la acción de fitorreguladores del cultivo *in vitro* de raíces y plántulas sin ápice de “coyol”.**

En esta fase se utilizaron raíces de embriones germinados *in vitro* y plántulas de 12 semanas de cultivo provenientes de embriones cigóticos desarrollados *in vitro* a los cuales les fue eliminado el ápice.

Para ambos tipos de explantes, se utilizó un medio de M.S. (1962) suplementado con 100 mg.L<sup>-1</sup> de sulfato de adenina, 0.4 mg.L<sup>-1</sup> de tiamina, 100 mg.L<sup>-1</sup> de mioinositol, 3% p/v de sacarosa, 1 g. L<sup>-1</sup> de carbón activado, 0.7% p/v de agar-agar, el pH fue ajustado a 5.7. Los tratamientos con reguladores de crecimiento utilizados para esto dos explantes, se muestran en la Cuadros III.1 y III.2.

**Cuadro III.1. Tratamientos aplicados en cultivo de plántulas desarrolladas *in vitro* sin ápice**

Tratamiento	<u>Regulador (mg.L<sup>-1</sup>)</u>				
	BA	CIN	2iP	2,4-D	ANA
I (testigo)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
II	1.0	0.5		0.2	
III	3.0	1.0		0.3	
IV	3.0	3.0		0.5	
V	3.0		3.0		0.1
VI	0.5		1.0		0.3

El experimento fue establecido en un diseño completamente al azar con un total de 10 repeticiones por tratamiento

Las variables evaluadas para el explante, plántula sin ápice fueron: número de brotes por explante y formación de callo expresada en biomasa (g).

Se evaluaron dos condiciones de incubación; la primer condición consistió en: fotoperíodo de 16/8 horas luz, intensidad lumínica de 1800 lux, temperatura de  $25 \pm 2$  ° C. La otra condición fue en completa oscuridad y temperatura de  $25 \pm 2$  dentro de una cámara de incubación. Los experimentos duraron 12 semanas.

**Cuadro III.2. Tratamientos evaluados con reguladores en raíces cultivadas *in vitro***

<b>Tratamiento</b>	<b>Regulador (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	
	<b>TDZ</b>	<b>AIA</b>
I (testigo)	0.0	0.0
II	0.1	0.1
III	0.3	0.1
IV	1.0	0.1
V	3.0	0.1

En la evaluación con raíces cultivadas, se estableció un experimento completamente al azar. La unidad experimental consistió en un tubo de cultivo de 22 x 180 mm con 20 mL de medio y 2.5 cm de raíces, se emplearon un total de 5 repeticiones por tratamiento. Se utilizaron 25 unidades experimentales incluyendo el control. La variable evaluada: formación de callo y/ o inducción de formación de estructuras embriogénicas. Se incubaron en completa oscuridad y temperatura de  $25 \pm 2$  dentro de una cámara de incubación. El experimento duró 12 semanas.

En otro experimento se evaluó el efecto de la CIN y el ANA, así como en combinación de ambos fitorreguladores (Cuadro III.3) sobre raíces cultivadas en medios líquidos con sales de M.S. (1962). Se utilizó 25 ml de medio líquido suplementado con 100 mg.L<sup>-1</sup> de sulfato de adenina, 0.4 mg.L<sup>-1</sup> de tiamina, 100 mg.L<sup>-1</sup> de mioinositol y 3% p/v de sacarosa.

Se inocularon 2.5 cm de raíz obtenida de embriones germinados *in vitro* en 50 ml de medio de cultivo líquido y se incubaron en agitación a 100 rpm en un agitador de matraces en completa oscuridad, para ello fueron envueltos los frascos de 200 mL con papel aluminio. Se utilizó 10 tratamientos incluido el testigo cada uno con tres repeticiones por tratamiento en total se utilizaron 30 unidades experimentales.

Se utilizó un experimento completamente al azar. Se evaluó crecimiento de biomasa (g) y/o formación de callo. El experimento duró 8 semanas

**Cuadro III.3. Tratamientos evaluados en raíces cultivadas en medio líquido con M.S. (1962)**

Tratamiento	CIN (mg.L <sup>-1</sup> )	ANA (mg.L <sup>-1</sup> )	CIN/ANA (mg.L <sup>-1</sup> )
I (testigo)	0.0		
II	0.1		
III	0.3		
IV	1.0		
V	3.0		
VI		0.1	
VII		0.3	
VIII		1.0	
IX		3.0	
X			1.0/0.1

## **Evaluación del efecto de fitorreguladores en cultivo de *in vitro* de callos de “coyol”.**

Los callos obtenidos con  $3.0 \text{ mg. L}^{-1}$  de BA,  $0.3 \text{ mg.L}^{-1}$  de CIN y  $0.3 \text{ mg. L}^{-1}$  de 2,4-D, fueron transferidos a un medio con reguladores y sales de M.S. (1962) suplementado con  $0.4 \text{ mg.L}^{-1}$  de tiamina,  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de mioinositol, vitaminas W.S., 3% p/v de sacarosa,  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de sulfato de adenina,  $1\text{g. L}^{-1}$  de carbón activado, 0.7% p/v de agar-agar, el pH fue ajustado a 5.7.

Se evaluaron dos tratamientos con reguladores, el primero consistió en una mezcla de  $3.0 \text{ mg.L}^{-1}$  de 2,4-D con  $1.0 \text{ mg.L}^{-1}$  de CIN y  $0.3 \text{ mg.L}^{-1}$  de BA (beciladenina) el segundo tratamiento consistió en mezclar  $1.0 \text{ mg.L}^{-1}$  de BA con  $1.0 \text{ mg.L}^{-1}$  CIN y  $3.0 \text{ mg.L}^{-1}$ , 2,4-D, el control consistió en medio sin reguladores.

Se utilizó un experimento completamente al azar, la unidad experimental consistió en un tubo de 22 x 180 mm con 20 ml de medio de cultivo y 0.5 g de callo fresco. En total se pusieron 5 repeticiones por tratamiento incluyendo el testigo, haciendo un total de 15 unidades experimentales.

Se evaluaron dos condiciones de incubación; la primer condición consistió en: fotoperíodo de 16/8 horas luz, intensidad lumínica de 1800 lux, temperatura de  $25 \pm 2 \text{ }^\circ \text{C}$ . El experimento duró 12 semanas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En el cuadro III.4 se muestran los resultados en la evaluación de diferentes agentes usados en el control de oxidación de embriones cigóticos de “coyol” *in vitro*.

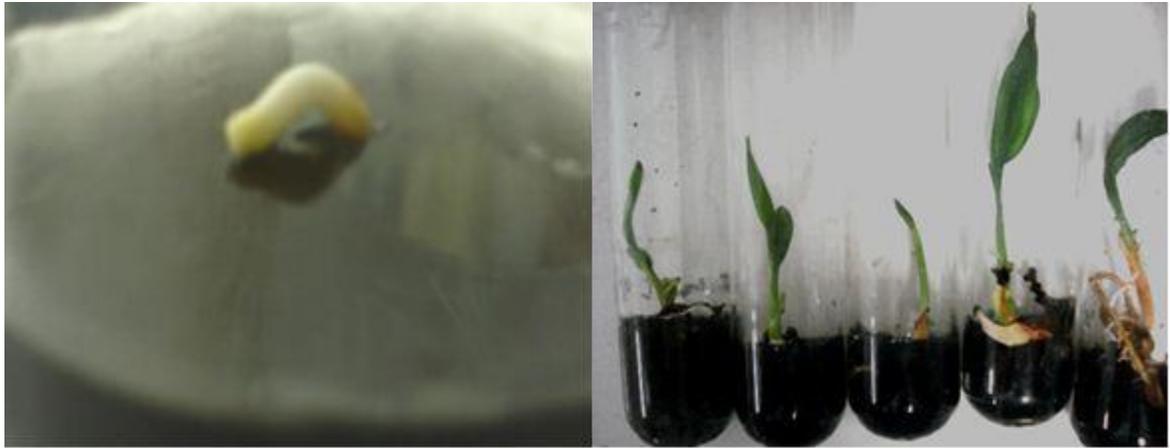
Los embriones germinados con carbón activado principalmente con 1.0 mg.L<sup>-1</sup> de carbón activado mostró el mayor control en oxidación, así mismo permitió el mejor desarrollo de los embriones cigóticos *in vitro* (Figura III.1). En los otros tratamientos el control de la oxidación fue poco eficiente ya que después de dos semanas los embriones se necrosaron.

**Cuadro III.4.- Efecto de diferentes agentes en el control de oxidación de embriones cigóticos *in vitro*.**

Agente antioxidante	Cconcentración (g L <sup>-1</sup> )	Nivel de control de oxidación
Carbón activado	1.0	+++
Carbón activado	0.1	++
PVP + Cisteina	0.1 + 0.1	+
Nitrato de plata (AgNO <sub>3</sub> )	0.1	+
Testigo (s/antiox)	0.0	-

**Significado: +++: control alto ++: control medio; +: control bajo; - : no hay control**

En la Figura III.1 se muestra los embriones germinados *in vitro* a las 12 semanas en medio de M.S. (1962), sin reguladores de crecimiento.



a

b

**Figura. III.1. Germinación *in vitro* de “coyol”; a. embrión de una semana de cultivo; b. plántulas de 12 semanas de cultivo.**

En el cuadro III.5 se presenta el porcentaje de embriones germinados *in vitro* procedentes de siete regiones del Sureste de México, mismas que mostraron diferentes respuestas de germinación, siendo las de mayor germinación aquellas que fueron colectadas en las regiones costeras del Golfo de México y del Océano Pacífico, aunque estadísticamente solo existen diferencias significativas entre las provenientes de las localidades de San Fernando del Centro de Chiapas, Tiltepec de la Depresión Central de Chiapas y las de la región de Arriaga en la Costa de Chiapas.

**Cuadro III.5. Embriones germinados *in vitro* procedentes de siete regiones del Sureste de México.**

Sitio de colecta	Región	Embriones germinados (%)
Tiltepec, Chiapas	Depresión Central de Chiapas	45 b
Villaflores, Chiapas	Depresión Central de Chiapas	59.04 ab
San Fernando, Chiapas	Centro de Chiapas	54.78 b
Tecpatán, Chiapas	Norte de Chiapas	59.00 ab
Arriaga, Chiapas	Istmo-Costa (Pacífico)	77.71 a
Nautla, Veracruz	Costa del Golfo de México	63.93 ab
Huimanguillo, Tabasco	Llanura Costera del Golfo de México	61.92 ab

Tukey  $P \leq 0.05$ . Letras iguales en columnas no son significativas. Los datos fueron transformados mediante la función de arcoseno  $\sqrt{(x/100)}$ .

**Cuadro III.6. Efecto del tiempo de almacenamiento de semillas de “coyol” en la germinación de embriones cigóticos *in vitro*.**

Tratamiento (periodo de almacenamiento)	Embriones germinados (%)
0 meses	77.71 a
2 meses	68.85 a
6 meses	66.14 a
12 meses	37.22 b
C.V.	10.4
DMS	17.07

Tukey  $P \leq 0.05$ . Letras iguales en columnas no son significativas. DMS: Desviación mínima significativa, C.V: Coeficiente de variación

Los datos fueron transformados mediante la función de arcoseno  $\sqrt{(x/100)}$ . En el cuadro III.6 se observa que estadísticamente hasta los 6 meses no hay efectos importantes en el porcentaje de germinación de embriones cigóticos de “coyol” *in vitro*, ya que se conserva la viabilidad de las semillas, sin embargo a los 12 meses la viabilidad para germinar baja hasta un 50% respecto a los porcentajes de germinación de los primeros 6 meses.

**Cuadro III.7. Efecto de tratamientos con combinaciones de reguladores de crecimiento utilizando como explante, plántulas *in vitro* sin ápice**

Tratamiento	Altura (cm) $\bar{X} \pm SD$	Biomasa de callos( gr) $\bar{X} \pm SD$
I (testigo)	3.11 ± 0.25 b	0.0 c
II	2.72 ± 0.8 b	0.45 ± 0.86 a
III	1.46 ± 0.25 c	0.92 ± 0.13 b
IV	2.64 ± 0.75 b	0.0 c
V	5.46 ± 1.49 a	0.0 c
VI	2.24 ± 0.76 bc	0.0 c
C.V	23.088	21.21
DMS	0.904	0.177

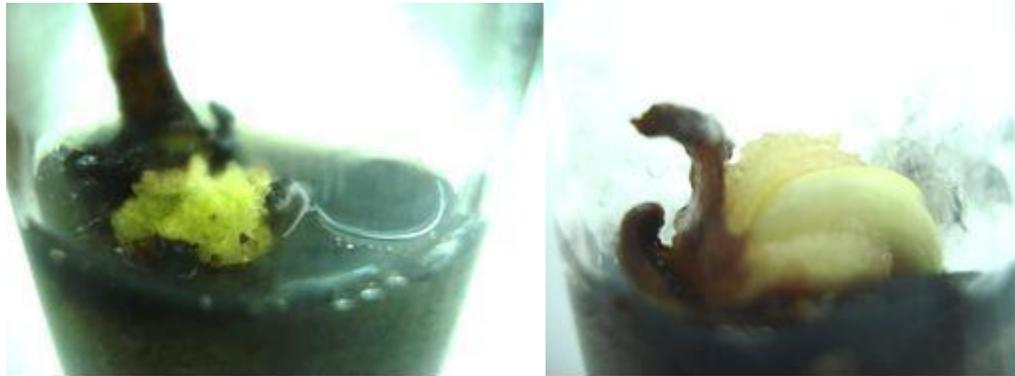
Tukey  $P \leq 0.05$ . Letras iguales en columnas no son significativas.

DMS: Desviación mínima significativa, C.V: Coeficiente de variación

En el Cuadro III.7 se muestran las respuestas de los distintos tratamientos con reguladores de crecimiento utilizando como explante plántulas a las que se les eliminó el ápice y que se mantuvieron en condiciones de fotoperíodo de 16/8

horas luz, se obtuvieron distintas respuestas, Para la variable altura, la mejor respuesta se alcanzó con el tratamiento V que contenía  $3.0 \text{ mg.L}^{-1}$  en combinación con  $3.0 \text{ mg.L}^{-1}$  de 2iP y  $0.3 \text{ mg.L}^{-1}$  de 2,4-D. Sin embargo no hubo formación de callos o brotes en los tratamientos. Respecto a la variable formación de callo, se obtuvo callo en los tratamientos III y IV el tipo de callo obtenido fue de consistencia esponjosa y blanquecina, no se generaron estructuras de tipo embrionaria después de ocho semanas de cultivo, en ambos tratamientos el tipo de callo fue similar, únicamente se diferenciaron en que se obtuvo mayor biomasa en el tratamiento IV. (Figura III. 2).

En la Figura III.2 se observan dos tipos de callos obtenidos con los tratamientos, uno de aspecto esponjoso verde-amarillento y otro esponjoso blanco; sin embargo no se observó formación de estructuras de tipo globular precursores de embriones o formación de brotes directos después del 12 semanas de cultivo, incluso después de haber sido transferidos a los medios con diferente balance de reguladores para evaluar respuestas morfogénicas en los callos formados.



(a)

(b)

**Figura III.2. Callos generados a partir de vástagos sin ápice provenientes de embriones germinados (a) callo generado con tratamiento III (b) callo generado con tratamiento IV.**

En la evaluación de respuestas morfogénicas en cultivo de raíces en todos los tratamientos únicamente se registró crecimiento de raíces en los tratamientos usados con medio líquido, a continuación se presentan los datos obtenidos en estadísticamente significativa respecto al testigo.



**Figura III. 3. Raíces cultivadas en medio líquido con  $0.3 \text{ mg.L}^{-1}$  de CIN en agitación constante donde se observa crecimiento de raíces secundarias.**

Los resultados de comparación de medias de la variable biomasa de raíces cultivadas donde en ninguno de los casos resultó estadísticamente significativa

la ganancia de peso en biomasa, en este experimento únicamente se observó el desarrollo de raíces secundarias.

En esta investigación la evaluación de diferentes agentes antioxidantes y la estrategia en general usada, permitió identificar un tratamiento adecuado para controlar la oxidación de los embriones cigóticos *in vitro* y así lograr su desarrollo *in vitro*. Los agentes antioxidantes usados en este experimento durante la desinfección de los embriones como ácido ascórbico y ácido cítrico en concentraciones de 100 mg.L<sup>-1</sup> y 150 mg.L<sup>-1</sup> respectivamente combinados con otros agentes en el medio de cultivo; también han sido utilizados para el control de oxidación en diferentes especies de Arecaceas. Zein *et al.* (2007), utilizó para el control de oxidación ácido cítrico y ascórbico en similares concentraciones en ápices en micropropagación de cultivares de palma datilera (*Phynyx dactilifera*) previo a la esterilización, así mismo se ha utilizado para algunas especies de palmas cultivadas *in vitro* el uso agentes adsorbentes en el medio de cultivo como el carbón activado como agente para control de oxidación en concentraciones altas hasta de 3000 mg.L<sup>-1</sup> (Hussam *et al.*, 2007) en ápices de palma datilera y en cultivo de embriones cigóticos *in vitro* de *Acrocomia aculeata* (Ferreira, 2009). En este trabajo la oxidación se controló con carbón activado a concentraciones de 100 mg.L<sup>-1</sup> y 1000 mg.L<sup>-1</sup> obteniéndose en esta última la mejor respuesta.

En este trabajo, la evaluación de la germinación y desarrollo de embriones cigóticos *in vitro* de “coyol” procedentes de distintas regiones del Sureste de México, los resultados indican que estadísticamente el porcentaje de germinación en la distintas poblaciones son similares excepto en el caso de las

poblaciones de Tiltepec con 45 % y Arriaga de 77.71 % ambas del Estado de Chiapas que si registran diferencias significativas Tukey  $\leq 0.05$  (Cuadro III.5). En general en la mayoría de los casos se obtuvo un porcentaje de germinación de más de 50% con un buen desarrollo de los embriones hasta plántulas completas a las 12 semanas de cultivo (Figura III.5). Así mismo en condiciones *in vitro* se logró reducir significativamente el tiempo de germinación y desarrollo del embrión a 12 semanas, ya que bajo métodos convencionales se requieren al menos de 8 meses para la germinación de las semillas. Aunque no existen reportes de evaluaciones similares en cultivo *in vitro*, se han realizado trabajos que demuestran que los mecanismos de dormancia y germinación de especies de palma como *Areca triandra* son afectados por factores de dormancia exógeno y endógena (He-Yang, *et al.*, 2007; Leadem, 1997). Por lo que la germinación y desarrollo en un 100 % del total de los embriones evaluados en “coyol” pudo deberse a dichos factores, así como a los factores relacionados con estrés *in vitro*,. Existen diversos factores relacionados al factor estrés en cultivo de tejidos que inducen una serie de anomalías genéticas y morfológicas asociadas con factores, como concentración de sales y fitorreguladores en el medio de cultivo, la atmósfera en el tubo de cultivo, ambiente en el cuarto de incubación, así como afecciones durante la disección de los tejidos.

Respecto al efecto del almacenamiento de los embriones de “coyol” en la germinación *in vitro* se encontró que la germinación disminuye estadísticamente hasta en un 40% a los 12 meses después de haberse colectado, sin embargo a los 6 meses todavía existe una germinación y desarrollo de los embriones hasta 66.14% lo cual resulta adecuado.

Respecto al cultivo de raíces tanto en medio sólido como líquido en ninguno de los casos resultó favorable, ya que no se presentó crecimiento de raíces significativamente. Se observó que las raíces mostraron crecimiento una vez que fueron aislados de la plántula originalmente proveniente de un embrión cigótico.

### **CONCLUSIONES**

El control de la fenolización de embriones cultivados fue mejor con  $1 \text{ g.L}^{-1}$  de carbón activado respecto a los demás tratamientos evaluados.

La germinación *in vitro* de embriones cigóticos, resultó favorable para la propagación de “coyol”, ya que en 12 semanas de cultivo se obtuvieron plántulas completamente desarrolladas.

La capacidad de germinación es afectada por el efecto del tiempo de almacenamiento, de tal forma que en doce meses puede disminuirse hasta alcanzar un porcentaje de 37.22%.

La formación de callos es estimulada por la combinación de auxinas-citocininas, sin embargo el efecto de otros niveles de fitohormonas no favoreció la formación de brotes.

## LITERATURA CITADA.

- FERREIRA, M.E.S.; MOTOIKE, M. C.; VENTRELLA, A. QIROMP DE SAJUNIOR; M. CARVALHO. 2008. Somatic embryogenesis in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from zygotic. *Scientia Horticulturae*. 119 (2009) 447–454.
- LEADEM, C.L. 1997. Dormancy-Unlocking seed secrets. In: Landis, T.D., Thompson, J.R. Tech. coords.). National Proceedings, Forest and Conservation Nursery Associations. Gen. Tech. Rep. PNW-GTR-419. U.S
- HE, YANG; A.B. WAN-HUI YE.; XIAO-JUAN , YIN. 2007. Dormancy and germination of *Areca triandra* seeds. *Scientia Horticulturae* 113 (2007): 107–111
- MURASHIGE, T. AND SKOOG F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15(3): 473-497.
- TICKELL, J. (2000): From the Fryer to the Fuel Tank: The Complete Guide to Using Vegetable Oil as an Alternative Fuel. 3rd Edition. Tickell Energy Consulting, Tallahassee, FL. P. 162.
- ZEIN, EL-DIN; AMAL, F.M.; M. ABDEL-RASOUL, I.S.; IBRAHIM A.S.; ALY AND H.A.M.; SHARAF ELDEEN. 2007. Micropropagation of Some Date Palm Cultivars: Changes of Some Chemical Constituents Related to Embryogenesis. *Acta Horticulture*. 736: 231-241.
- ZUART-MACÍAS, J.L; P. PONCE-DÍAZ; G.SANTIAGO-MARROQUÍN AND R. QUIROGA-MADRIGAL.1999. Coyal Palm (*Acrocomia mexicana*), a Phylogenetic resource from Chiapas, México. *Acta Horticultura*. 486:305-309

## DISCUSIÓN GENERAL

La caracterización fitoquímica de “coyol” mediante el análisis de los extractos de hexano, cloroformo y metanol. Permitió mediante un análisis biodirigido con ratas Wistar encontrar al menos tres sustancias el  $\beta$ -sitosterol el estigmasterol y este último encontrado en una de las fracciones F5 del metanol. Se encontró que los tres extractos tenían efecto hipoglucémico siendo mayor en la fracción del metanol.

Con respecto al extracto de hexano, preparado de las raíces de “coyol”, se aisló un sólido cristalino cuyo p.f. fue de 134-136° C, que al ser cotejados sus datos de su espectro de  $^1\text{H}$  RMN con los de la literatura (Jamaludin *et al.*, 1994) y comparado por cromatografía en capa delgada con una muestra auténtica de  $\beta$ -sitosterol se concluyó que se trataba de este esteroles. De la misma manera el extracto de  $\text{CHCl}_3$  fue analizado por cromatografía en columna, aislándose un sólido amorfo en el que se detectó  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol evidenciados en su espectro de  $^1\text{H}$  RMN, ya que se observaron señales en zona de hidrógenos vinílicos en  $\delta$  5.35 (1H, t) para  $\beta$ -sitosterol y  $\delta$  5.10 (2H, m) para estigmasterol. (Jamaludin *et al.*, 1994) La presencia de estos esteroides en ambos extractos explican, por qué se observa un efecto hipoglucemiante en esta planta, ya que tanto  $\beta$ -sitosterol, como estigmasterol, aislados del extracto clorofórmico de *Parkia speciosa* provocaron una disminución de los niveles de glucosa sanguínea en ratas a las que se les indujo diabetes por medio de administración de alloxan (Jamaludin *et al.*, 1994).

Respecto la caracterización molecular se encontró que la palma de “coyol” presentó polimorfismos cuando fue estudiado mediante la técnica del RAPDs. En el análisis de cluster, se encontró al menos la agrupación al menos de 4 grupos integrados por diferentes genotipos provenientes de distintas localidades.

Los iniciadores que mayor información, fueron tres con 7 bandas cada uno estos fueron. OPF12, OPB7 y OPB4 los cuales en su totalidad mostraron polimorfismo. Los genotipos que mayor grado de similitud tuvieron son los correspondientes a Veracruz ( $ver_5$  y  $ver_7$ ); así mismo los genotipos correspondientes a la orquídea y tecpatán ( $orq_8$  y  $tecp_3$ ); por el contrario el que menor grado de similitud tiene fue el genotipo más alejado es la de  $tab_3$ , ya que es el último que se incorpora al grupo con un valor de 0.26. Resultados similares se encontraron con Oliveira *et al* (2012). Quien encontró en un estudio realizado en el Norte de Brazil diversidad genética en las poblaciones estudiadas; así mismo, encontró en algunas poblaciones bajos niveles de diversidad genética atribuyendo a posible aislamiento genético.

En los estudios de evaluación de respuestas del cultivo *in vitro* de “coyol” se encontró que posible reducir mediante el cultivo de embriones cigóticos *in vitro*, el tiempo de germinación e incrementarlo por arriba del 70%, ya que en tan sólo 12 semanas es posible obtener plántulas bien desarrolladas, cuando en condiciones naturales puede tardar meses en germinar un embrión dependiendo de las condiciones ambientales. También se encontró que la germinación se va perdiendo con el paso del tiempo según lo demuestra los resultados obtenidos cuando se evaluó el efecto del almacenamiento sobre la

germinación de embriones en cultivo *in vitro*, es posible que se reduzca la germinación hasta 37.22 % después de 12 meses de colectadas la semillas. Respecto a las otras vías para obtención de plántulas, no fue posible, ya que los tratamientos no dieron respuesta satisfactoria, sólo fue posible la obtención de callos sin que esto pudiera diferenciarse en órganos. Posiblemente es necesario realizar mayor número de evaluaciones utilizando otra estrategia experimental.

### **CONCLUSIÓN GENERAL**

La caracterización fitoquímica de la palma de coyol dio como resultado la presencia de tres compuestos; el  $\beta$ -sitoesterol, el estigmaesterol y manitol no reportados para esta especie.

El efecto hipoglucémico del “coyol” evaluados en ratas Wistar, este experimento se debió a la presencia principalmente de dos compuestos el  $\beta$ -sitoesterol y el estigmaesterol.

La técnica del RAPDs, permitió determinar los polimorfismos presentes en diferentes poblaciones de “coyol”, así mismo determinar los índices de similitud de acuerdo el índice de Jaccard, los cuales desmostaron el nivel de similitud entre los diferentes genotipos.

Con la técnica de RAPDs se obtuvieron 5 agrupaciones de los diferentes genotipos analizados y mostrando una variabilidad genética ya que cada agrupación mostró distintos índices de similitud.

El cultivo *in vitro* de embriones cigóticos permitió germinar embriones en 5 semanas de cultivo y obtener plántulas en 12 semanas, por lo que representa

una buena alternativa de propagación, ya que se disminuyó el tiempo para su germinación comparada con la germinación natural que puede ser de meses

En esta investigación se contribuyó al conocimiento de la palma de “coyol” a un nivel más integral desde diversos puntos de vista como son: el fitoquímico, molecular, las respuestas de esta especie en cultivo *in vitro*.

## LITERATURA CITADA

- BALICK, M.J. (1990) "Production of Coyol Wine from *Acrocomia Mexicana* (Arecaceae) in Honduras" *Economic Botany*. 44(1):57-62.
- BARCELOS, E.; AMBLARD, P.; BERTHAUD, J.; SEGUIN, M. 2002. Genetic diversity and relationship in American and African oil palm as revealed by RFLP and AFLP molecular markers. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira (Brasil)*.37(8): 1105-1114.
- DREHER, K.; KHAIRALLAH, M.; RIBAUT J.M.; MORRIS, M. 2003. Money matters (I): costs of field and laboratory procedures associated with conventional and marker-assisted maize breeding at CIMMYT. *Molecular Breeding*. 11:221-234.
- HAHN, J. W. 2002. A Molecular Phylogenetic Study of the Palmae (Arecaceae) Based on *atpB*, *rbcL*, and 18S nrDNA Sequences. *Syst. Biol.* 51(1):92–112.
- KUIPER, H.A.; KLETER, G.A.; NOTEBON, H.P.J.M.; KOK, E.J. 2001. Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. *The Plant Journal*. 27 (6):503-528.
- LENTZ, D. L. (1990). "Acrocomia Mexicana" Palm of the Ancient Mesoamericans" *Journal of Ethnobiology*. 10(2):121-125.
- MACHUGH, D. E., SHRIVER, M. D.; LOFTUS, R. T. 1997. Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus* ). *Genetics* 146: 1071-1086.
- MOHAN, M.; NAIR, S.; BHAGWAT, A.; KRISHNA, T.G.; YANO, M.; BHATIA, C.R. 1997. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Molecular Breeding*. 3: 87-103

NEI, M.; LI, W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy Sciences*.76 (10):5269-5273

OLIVEIRA, D.A.; A.F. MELO JÚNIOR; M.M. BRANDÃO; L.A. RODRIGUE; E.V. MENEZES AND P.R.B. FERREIRA. 2012. Genetic diversity in populations of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae) in the northern region of Minas Gerais, Brazil. *Genetic and Molecular Research*. 11 (1): 531-538.

QUERO, H. J. (1992) *Las palmas silvestre de la Península de Yucatán*. México, Instituto de Biología, UNAM.

RAMÍREZ HERNÁNDEZ, B. C, JULIA ZAÑUDO HERNÁNDEZ\* JAVIER E. GARCÍA DE ALBA VERDUZCO JOHN PAUL DÉLANO FRIER, ENRIQUE PIMIENTA BARRIOS, MIGUEL ÁNGEL GARCÍA MARTÍNEZ. 2013. Importancia agroecológica del coyul (*Acrocomia mexicana* Karw. ex Marti.) 21 (41): 97-113

RANADE, S.A.; FAROOQUI, N.; BHATTACHARYA, E.; VERMA, A. 2001. Gene tagging with random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for molecular breeding in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 20(3):251-275.

SAIKI, R.K.; GELFAN, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science (Estados Unidos)*.239:487-491.

SHAH, F.H.; RASHID, O.; SIMONS, A.J.; DUNDSON, A. 1994. The utility of RAPD markers for determination of genetic variation in oil palm (*Elaeis guineensis*). *Theoretical Applied Genetics*. 89: 713-718.

VILLEGAS, V.E.; GÓMEZ, P.L. 1998. Construcción de mapas genéticos. Ceniavances. 54: 1-4.

VILLEGAS, V.E. 2000. Mejoramiento vegetal mediante selección asistida por marcadores. Ceniavances. 68:1-4.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research. 18 (22):6531-6535.

ZEHDI, S.; TRIFI, M.; BILLOTTE, N.; MARRAKCHI, M. AND PINTAUD, J. C. 2004. Genetic diversity of Tunisian date palms (*Phoenix dactylifera L.*) revealed by nuclear microsatellite polymorphism. Hereditas 141: 278-287.