

Efecto del pretratamiento con extracto de algas marinas y giberelinas sobre la germinación de *Phoenix roebelenii* O'Brien

Kalani Earl Scott Moraga

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO AGRÓNOMO CON
EL GRADO DE LICENCIADO EN AGRONOMÍA

Tesis ligada al proyecto de investigación #B5A52,
BIOPROSPECCIÓN Y MEJORA GENÉTICA DE ORNAMENTALES (2015-2020)

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA

2020

Dedicatoria

A mi familia y amigos que me han visto desarrollar mi carrera profesional, desde el estudiante a la persona que soy ahora, los consejos y confianza que me han brindado. La oportunidad de tener personas que me han ayudado a crecer y mejorar, al igual que participar en el crecimiento de ellos. Principalmente es por vos mamá, por inculcarme la importancia de la educación e impulsarme a una mejor calidad de vida. A mi padre que me enseñó a apreciar otras facetas de la vida igual de importantes.

Agradecimientos

A mi director de tesis y profesor durante la carrera, el Dr. Pablo Alberto Bolaños Villegas, la confianza y apoyo que me ha dado desde inicios de la carrera. Las enseñanzas académicas, los consejos y valores que me ha enseñado los llevaré durante toda mi vida, al igual que su amistad y respeto. Siempre podrá contar con mi servicio, en lo mejor de mis habilidades, en todo proyecto o trabajo que realice.

Al todo el laboratorio de biología molecular de la Fabio Baudrit, que me permitieron realizar mis trabajos, al igual que aprender sobre el mundo de la biotecnología. Mis compañeros de laboratorio que fueron de gran ayuda y apoyo durante la realización del trabajo. También se agradece al personal de toda la Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno que me permitió una excelente formación durante la carrera de agronomía.

Al Dr. Juan Ramón Navarro Flores por la ayuda en el diseño experimental y las enseñanzas para realizar el análisis estadístico. Le agradezco todo el apoyo y consejo sobre mi dirección en la carrera y futuro.

A mi madre Ivannia Moraga Villalta, jamás hubiera realizado todos mis logros académicos y personales de no ser por ti, todo el cuidado desde mi nacimiento hasta poder valerme por mí mismo. Siempre has estado para mí y tus acciones hablan más que una infinidad de palabras, este nuevo logro es por vos ma.

Todos mis amigos y personas cercanas que siempre han estado pendientes de mí, todas las experiencias vividas que nos han unido para toda la vida, siempre confiaré en ustedes y siempre podrán contar conmigo, así como yo he confiado en ustedes.

Efecto del pretratamiento con extracto de algas marinas y giberelinas
sobre la germinación de *Phoenix roebelenii* O'Brien

Kalani Earl Scott Moraga

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN INGENIERÍA AGRÍCOLA CON
ÉNFASIS EN FITOTECNÍA

_____	DIRECTOR DE TESIS
Dr. Pablo Bolaños Villegas	
_____	MIEMBRO DEL TRIBUNAL
Dr. Luis O. Barboza Barquero	
_____	MIEMBRO DEL TRIBUNAL
Dr. Arturo Brenes Angulo	
_____	MIEMBRO DEL TRIBUNAL
M.Sc. Jorge Warner Pineda	
_____	DIRECTOR DE ESCUELA
Dr. Luis Gómez Alpizar	
_____	SUSTENTANTE
Lic. Kalani Earl Scott Moraga	

2020

Tabla de contenidos

Portada	1
Dedicatoria	2
Agradecimientos	3
Hoja de aprobación	4
Resumen	6
Introducción	7
Justificación	7
Antecedentes	9
<i>Phoenix roebelenii</i>	9
Proceso de germinación	10
Fitohormonas	11
Giberelinas en la germinación	13
Extractos de algas	15
Estudios moleculares en el género <i>Phoenix</i>	17
Reacción en Cadena de la Polimerasa	18
Generación de imprimadores	19
PCR cuantitativo con transcriptasa inversa	20
Materiales y Métodos	21
Localización	21
Material vegetal	21
Soluciones	21
Imbibición	22
Pruebas de germinación	22
Búsqueda de genes ortólogos	22
Análisis de expresión genética	23
Resultados	24
Pruebas de germinación	24
Búsqueda de genes ortólogos	31
Discusión	33
Pruebas de germinación	33
Búsqueda de genes ortólogos	36
Análisis de expresión genética	37
Conclusiones	39
Recomendaciones	40
Literatura citada	41
Anexos	51

Resumen

Phoenix roebelenii es una palma ornamental de exportación que se propaga por semilla. Comercialmente presenta un germinación lenta e irregular, la cual puede durar hasta cuatro meses. Este trabajo aportó información sobre el proceso germinativo de las semillas de la palmera fénix, embebidas en soluciones de ácido giberélico (GA_3) y extractos de algas sobre la germinación. Se compararon tres dosis de GA_3 (10, 100 y 1000 mg/L) y dos dosis de extracto de algas en tres tiempos de exposición (30 minutos, 1 y 4 horas), el control consistió en una inmersión durante cuatro horas en agua destilada. Se evaluó el porcentaje de germinación total por semana por 20 semanas y se determinó el tiempo medio de germinación. El control presentó un 55% de germinación total y 50-59% los tratamientos. El tratamiento de 1000 mg/L de GA_3 durante una hora, presentó un 69% de germinación total, significativamente mayor al control. El tiempo medio de germinación no se vio afectado por ningún tratamiento y fue en general de 75-86 días después de la siembra. Se realizó un análisis de expresión de genes involucrados en síntesis ($GA3ox$) y catabolismo ($GA2ox$) de giberelinas y síntesis de enzimas hidrolíticas ($GAMYB$), antes y después de la imbibición en agua durante cuatro horas y en 1000 mg/L de GA_3 durante una hora. Los resultados del análisis no generaron diferencias significativas y no permiten concluir sobre el efecto del balance hormonal GA:ABA sobre el proceso de germinación. Esto es especulativo porque no se midió las concentraciones endógenas de estos reguladores.

Introducción

Justificación

Phoenix roebelenii conocida como palmera fénix, es un importante producto ornamental de exportación en Costa Rica. Desde el 2015 su mercado ha disminuido (Alpízar *et al* 2017) por barreras fitosanitarias en Europa, tanto por la variabilidad del mercado en precios y demanda de nuevos productos ornamentales (Godínez-Hidalgo 2018, Villegas-Rojas 2016, Jiménez *et al* 2004), como por la competitividad del mercado internacional. Con esta investigación se buscó generar información respecto a los requerimientos de germinación de *Phoenix roebelenii*, para lo cual se evaluaron pretratamientos con giberelinas y extracto de algas para mejorar su germinación, además de aportar información sobre el potencial de los extractos de algas como insumo agrícola, generar una metodología de análisis de expresión de genes durante la germinación de semillas de *Phoenix roebelenii*, y aportar información sobre el balance hormonal durante el proceso germinativo, mediante la evaluación de genes involucrados en la síntesis, degradación y respuesta a la señalización de las giberelinas.

En Costa Rica, la exportación de plantas ornamentales comenzó con distintos cultivos de follaje alrededor de 1970, con una gran expansión de la actividad hasta ser el quinto producto más exportado del país en la década de los noventas. Sin embargo, a finales de los noventas las empresas más grandes cerraron sus actividades, quedando principalmente pequeños y medianos productores (MAG 2007a, MAG 2007b, Colombari-Matamoros 1993). A inicios del 2000, las plantas ornamentales ocuparon el décimo lugar como mayor producto de exportación (Granados *et al* 2007) y cuarto lugar entre los productos agrícolas, representando 4.4% de las exportaciones totales (Mora *et al* 2007).

En los últimos años las exportaciones totales del sector ornamental se redujeron hasta el 2.4%, bajando a la posición número 32 (Alpízar *et al* 2017). La contracción económica desde el año 2008, las restricciones fitosanitarias impuestas por la Unión Europea a 160 especies vegetales y el incremento de la competencia internacional, son actualmente los principales obstáculos para las exportaciones de plantas ornamentales (Jeger *et al* 2016, Mizell *et al* 2015, Purcell 2008, González 2011, Barquero 2016, Villegas-Rojas 2016). Según las estadísticas del Ministerio de Comercio Exterior (COMEX) (Alpízar *et al* 2017), el comercio de plantas, flores y follajes nacional se

compone en un 75% de esquejes, injertos, plántulas, follajes, hojas, ramas, partes de planta sin flores ni capullos, hierbas, musgos y líquenes; y un 25% en flores y capullos.

Phoenix roebelenii es una palma ornamental de porte bajo y corona llamativa. Su cultivo en Centroamérica lo realizan pequeños productores mediante un sistema de baja utilización de insumos. El sistema de propagación es mediante semilla, y, aunque se produce una alta cantidad de frutos, su tasa de germinación es baja e irregular, y existe poca información sobre su germinación (Broschat & Meerow 2000, lossi *et al* 2003, lossi *et al* 2006). Dependiendo de la localidad, la germinación inicia de 1-4 meses después de la siembra (lossi *et al* 2006, lossi *et al* 2003), y según ensayos preliminares (datos sin publicar), en promedio se obtiene un 60% de emergencia en almácigo a los 4 meses (Bolaños 2017)

La exportación de *Phoenix* presenta obstáculos fitosanitarios en el mercado externo (Jeger *et al* 2016). *Phoenix roebelenii* es hospedero del patógeno cuarentenario *Xylella fastidiosa*, bacteria transmitida por insectos chupadores, mismos que son plaga en cultivos como la uva y olivo (Mizell *et al* 2015, Purcell 2008, Villegas-Rojas 2016). Estas condiciones obligan a mejorar e innovar el sistema productivo nacional de palmas *Phoenix*, para mantener su competitividad en el mercado internacional. A través de programas de reproducción y mejoramiento se puede obtener nuevas variedades, y mejorar así las oportunidades de mercado (Camarena *et al* 2014), lo cual depende de una propagación eficaz por semilla.

Antecedentes

Phoenix roebelenii

El género *Phoenix* posee 14 especies, es divergente y monofilético entre la familia Arecaceae (Gros-Balthazard *et al* 2016, Pintaud *et al* 2010). Las especies de este género son plantas con hojas imparipinnadas, producen brotes basales (excepto *P. canariensis*, *P. rupicola*, *P. sylvestris*, y *P. andamanensis*) que pueden o no formar macolla, son dioicos, con inflorescencias morfológicamente similares a simple vista, difíciles de distinguir, de color blanco a amarillo pálido, las flores estaminadas liberan su polen maduro durante la antesis, y presentan alta fertilidad interespecífica (Barrow 1998, Carreño-Sánchez 2017).

El fruto del género es una baya que contiene una sola semilla, con epicarpo liso, mesocarpo suave y endocarpo membranoso. Durante la maduración del fruto, la coloración pasa de verde a morado y finalmente negro. Las semillas son albuminosas (Flores-Vindas 2013, Carreño-Sánchez 2017, Prakash *et al* 2019) y se distinguen por una hendidura profunda en el rafe. Las especies *Phoenix* han sido cultivadas por milenios en el medio oriente y norte africano, como fuente de alimento y fibra o uso en la construcción y como ornamental (Barrow 1998).

El centro de origen de *Phoenix spp.* es Indochina, donde se encuentran poblaciones naturales de ocho especies (Gros-Balthazard *et al* 2016, Pintaud *et al* 2010). Las plantas del género *Phoenix* habitan desde las Islas Canarias a través del bosque tropical y subtropical de África, el mediterráneo, la península arábiga, el subcontinente indio e indochino, hasta Hong Kong. Se encuentran desde el nivel del mar hasta sotobosques de 2000 msnm, desde los márgenes de manglar húmedo hasta zonas semiáridas. Presentan tolerancia a la salinidad y altas temperaturas, pero requieren de humedad constante, por tanto, son principalmente encontrados en zonas estacionalmente inundadas y pantanosas, por lo que son un buen indicador del nivel de agua (Barrow 1998, Carreño-Sánchez 2017).

Phoenix roebelenii es una palma ornamental nativa del sureste asiático (Laos, Vietnam, y sureste chino) y notablemente del río Mekong en Laos (Iossi *et al* 2006, Barrow 1994, Barrow 1998). Naturalmente habita laderas de ríos y rioscos con corrientes de agua, las cuales se inundan anualmente. Es de porte bajo y corona llamativa, hojas de 1-2 m de longitud, produce brotes basales que generan una macolla de tallos delgados,

curvos y retorcidos de 1-2 m de alto, máximo 3 m. Bajo condiciones de cultivo se mantienen como plantas individuales con un tallo más erecto (Barrow 1998, lossi *et al* 2006, Carreño-Sánchez 2017, Prakash *et al* 2019).

El fruto de *P. roebelenii* es una baya pequeña, elíptica con una coloración que pasa de violeta a negro oscuro al alcanzar la madurez. La semilla es pequeña (6-10 mm de longitud), de endospermo duro y un embrión indistinguible en la periferia lateral (lossi *et al* 2006, Barrow 1998, Prakash *et al* 2019, Carreño-Sánchez 2017). *P. roebelenii* presenta germinación tubular remota, el cotiledón se expande, una parte sale a través del opérculo y se elonga hasta distinguirse la radícula y el hipocótilo distanciado de la semilla. La zona anterior al cotiledón, dentro de la semilla, desarrolla una estructura con propiedades similares a un haustorio que nutre al embrión durante la formación de raíces secundarias. La salida de la plúmula a través de una apertura en el hipocótilo se da en promedio a los 42 días después de la siembra (DDS) (lossi *et al* 2006, Henderson 2006, Gros-Balthazard *et al* 2016, Prakash *et al* 2019).

Existe variabilidad en el tiempo y el porcentaje total de germinación de *P. roebelenii*. Se reporta protrusión de la radícula a los 27, 47, 58, 60 y 120 DDS (lossi *et al* 2006), característico de su alta heterocigosis (lossi *et al* 2006, Barrow 1998). La mayoría de las especies de palmas no disponen de mecanismos naturales de propagación vegetativa, por lo que su propagación se realiza por semilla. En general, las palmas son conocidas por presentar una germinación lenta y desuniforme (Meerow 2004). Diversas especies de palmas presentan dormancia, la cual está relacionada principalmente con la impermeabilidad de la semilla a la penetración del agua (Costa & Marchi 2008).

Proceso de germinación

La germinación es el proceso genético y fisiológico de reiniciar el crecimiento del embrión después de un período de latencia impuesto durante la maduración de la semilla (Taiz *et al* 2015). Es una etapa sucesiva a la embriogénesis, separada por un período de inactividad metabólica, y donde se desencadena la rehidratación de la semilla y el inicio de la expansión de la radícula (Flores-Vindas 2013). El proceso de germinación está controlado principalmente por factores como el agua, la temperatura, la luz, el oxígeno y los factores internos que influyen sobre la dormancia y latencia de la semilla (Resenteni *et al* 2014, Song *et al* 2019).

Las etapas principales durante germinación son: la imbibición, la germinación *sensu stricto*, y desarrollo del embrión que comienza con la salida de la radícula. Durante la etapa de imbibición se presenta una fase de rápida absorción de agua de forma pasiva debido al diferencial entre el potencial mátrico de la semilla y el ambiente, lo cual ocurre tanto en semillas viables como inviables (Taiz *et al* 2015, Flores-Vindas 2013). Seguidamente se presenta una fase de lenta absorción donde ocurre la mayor actividad metabólica, y finalmente ocurre la protrusión de la radícula. Las semillas latentes mantienen esta fase metabólica con respecto a semillas no latentes (Flores-Vindas 2013).

La dormancia de la semilla juega un rol importante en su adaptación al ambiente y en poder germinar en condiciones óptimas para su sobrevivencia (Nonogaki 2014). Es una supresión temporal de la germinación, inducida durante la maduración de la semilla y que finaliza tras un periodo de baja humedad. Se cree que este mecanismo puede ser común a todas las especies (Nonogaki 2014, Tuan *et al* 2018).

Durante la germinación *sensu stricto*, enzimas hidrolíticas son secretadas al endospermo, donde progresivamente hidrolizan el almidón, proteínas, y las reservas de las paredes celulares para nutrir el rápido crecimiento del embrión (Woodger *et al* 2003). Las amilasas son el primer sistema enzimático involucrado en la degradación del almidón en azúcares solubles (Taiz *et al* 2015). El movimiento de estas reservas hacia el embrión es vital, y los estímulos que controlan las enzimas provienen de la radícula o los cotiledones, dependiendo de la especie (Flores-Vindas 2013, Resenteni *et al* 2014).

Generar una germinación uniforme es uno de los objetivos principales en cualquier sistema de producción vegetal, en especial para garantizar la homogeneidad en el crecimiento de los almácigos (Quesada-Roldán & Méndez-Soto 2005). Una práctica común es el pretratamiento de las semillas antes y durante su imbibición, controlando factores como temperatura, osmosis, tiempo de imbibición, y humedad interna de la semilla (Mitchell *et al* 2018).

Fitohormonas

Las plantas son organismos sésiles que responden plásticamente al ambiente (Taiz *et al* 2015). Las mismas toman ventaja de las condiciones como disponibilidad de agua y nutrientes, fotoperiodo, amenazas bióticas y abióticas, con base en sistemas sensoriales que regulan y coordinan su metabolismo, crecimiento y desarrollo (Simura *et al* 2018). Esta regulación es dada por compuestos denominados hormonas, mediante la

modulación de su concentración (metabolismo, catabolismo y redistribución) y la sensibilidad de respuesta de los tejidos (receptividad y afinidad, cascada de respuestas, eficiencia de absorción y metabolismo) (Taiz *et al* 2015, Wolter & Jürgens 2009, Simura *et al* 2018, Vishal & Kumar 2018).

La regulación de cada hormona es diversa, pero, sin contemplar la interacción entre ellos, presentan características en común (Simura *et al* 2018, Vishal & Kumar 2018). Proteínas receptoras perciben la concentración endógena controlada por la biosíntesis e inhibición. La respuesta a la señal desencadena un evento de transcripción (expresión genética) o post-transcripción (metabolismo, reorganización celular), induciendo una respuesta fisiológica. Las hormonas vuelven a un estado inactivo y las proteínas receptoras recuperan su habilidad de responder a la siguiente señal (Taiz *et al* 2015). En otros casos la respuesta promueve una mayor actividad (Ionescu *et al* 2017, Taiz *et al* 2015).

Las hormonas son compuestos endógenos de los tejidos vegetales, las más importantes son: auxinas, giberelinas, citoquininas, etileno, ácido abscísico, brasinoesteroides, jasmonatos, ácido salicílico y estrigolactonas (Taiz *et al* 2015). Además de péptidos y carbohidratos que actúan en conjunto, la lista de fitohormonas sigue expandiéndose. Desde su descubrimiento y caracterización se han elaborado compuestos sintéticos como el Ethephon, el ácido indolbutírico, ácido giberélico, 2-4D por mencionar algunos (Taiz *et al* 2015, Vishal & Kumar 2018).

Cuando las hormonas se aplican exógenamente se denominan reguladores de crecimiento (RC) (Machakova *et al* 2008). Son compuestos orgánicos pequeños, sintéticos o naturales, caracterizados molecularmente, sintetizados y degradados por especies vegetales, con actividad biológica específica en bajas concentraciones, un rol fundamental en la regulación de un proceso fisiológico, y mecanismos de transporte por los tejidos (Strydhorst *et al* 2018, Machakova *et al* 2008).

A diferencia de otros insumos como fertilizantes y plaguicidas con un resultado controlable, el modo de aplicación de los RC (tipo, tejido expuesto, dosis, estado de desarrollo, sensibilidad) generan respuestas de intensidad variable en el cultivo (Taiz *et al* 2015, Saborío 2002).

Giberelinas en la germinación

Las giberelinas (GAs) son hormonas vegetales esenciales para distintos procesos de desarrollo: germinación, elongación y expansión de órganos a través de crecimiento celular, desarrollo de tricomas, transición de crecimiento vegetativo a reproductivo, desarrollo de flores, frutos y semillas (Binenbaum *et al* 2018). Se han identificado más de 100 GAs en plantas, sin embargo solamente GA₁, GA₃, GA₄ y GA₇ son biológicamente activas, todas las demás formas en plantas son precursores a las formas activas o degradadas (Binenbaum *et al* 2018, Li *et al* 2019).

Es difícil determinar dónde y cuáles GAs se sintetizan, debido a su complejo metabolismo de múltiples pasos (Binenbaum *et al* 2018). Se conoce con certeza que etapas finales de la biosíntesis se expresan en órganos en crecimiento y elongación, y hay evidencia de movimiento acrópeto y basípeto de las GAs (Li *et al* 2019). Se ha determinado que la síntesis, catabolismo y movimiento de precursores son la base para realizar sus funciones reguladoras del crecimiento y desarrollo (Binenbaum *et al* 2018).

El balance hormonal del ácido abscísico (ABA) y GA es un mecanismo altamente conservado y crucial durante la dormancia y germinación de las semillas, demostrado en diversas especies (Resentini *et al* 2014, Tuan *et al* 2018). El ABA es responsable de la inducción y mantenimiento de la dormancia, y la GA responsable de liberar la dormancia e inducir la germinación. Las semillas maduras se mantienen reprimidas mediante la biosíntesis de ABA, y cuando se dan las condiciones favorables se promueve la biosíntesis de GA y el catabolismo de ABA (Shu *et al* 2016, Nonogaki 2014, Ge & Steber 2018, Tuan *et al* 2018, Née *et al* 2017, Li *et al* 2018, Binenbaum *et al* 2018, Resentini *et al* 2014, Mitchell *et al* 2018, Li *et al* 2019).

La síntesis de ABA comienza en los plastidios, el precursor zeaxantina es transformado a xantonina por las enzimas ZEP y NCED. La xantonina se traslada al citosol, es transformada por otras enzimas a ABA, y la enzima CYP707A cataliza la desactivación del ABA biológicamente activo (Tuan *et al* 2018). Durante la embriogénesis hasta la maduración del embrión, el contenido de ABA aumenta progresivamente. Este inhibe la germinación al restringir la absorción de agua y la degradación de la pared celular, lo que impide el crecimiento del embrión (Vishal & Kumar 2018, Tuan *et al* 2018).

Bajo condiciones ideales de humedad, temperatura, y luz principalmente, el embrión sintetiza GAs, y las moléculas se acoplan al receptor GID1, lo cual permite el

acople a las proteínas DELLA, las cuales son reguladores transcripcionales que inhiben la proliferación y expansión celular. Las proteínas DELLA así conjugadas pasan por un proceso de poliubiquitinación y finalmente son degradadas por el proteosoma 26S (Tuan *et al* 2018, Song *et al* 2019). La degradación de las proteínas DELLA y a su vez el catabolismo de ABA por la biosíntesis de GA desencadena el proceso de germinación (Vishal & Kumar 2018).

La producción de GAs en el embrión hace posible la movilización de reservas al inducir la expresión de enzimas hidrolíticas en el endospermo (Woodger *et al* 2003, Tuan *et al* 2013). La promoción de la síntesis de enzimas es mediada a través del factor de transcripción GAMYB, el cual es a su vez regulado por GA y ABA. El factor GAMYB activa los genes de respuesta al GA, entre ellos los promotores de la producción de enzimas hidrolíticas como α -amilasa, al acoplarse una secuencia conservada de 21 pares de bases (bp) de nucleótidos denominada *GARE* (Woodger *et al* 2003, Alonso-Peral *et al* 2010, Tuan *et al* 2018).

El factor de transcripción GAMYB fue identificado inicialmente como el activador de los genes de respuesta a giberelinas en la capa de aleurona de los cereales (Tuan *et al* 2018). Se piensa que también está involucrado en otras respuestas a las giberelinas como el desarrollo y fertilidad de las anteras, la elongación de los tallos, la iniciación floral en plantas de roseta, y el desarrollo del fruto (Taiz *et al* 2015). Se ha demostrado que el GAMYB regula positivamente la muerte celular programada (MCP) por GA en cebada y *Arabidopsis*, y que este rol es conservado en la aleurona de las semillas y tapete de anteras inmaduras de varias especies (Zheng 2018).

Se piensa que el desarrollo de las semillas de las palmas albuminosas como *P. roebelenii* se explica a través de la teoría de balance hormonal entre el GA y ABA (Flores-Vindas 2013, Carreño-Sánchez 2017, Prakash *et al* 2019). Por ejemplo, en *P. dactylifera* después de la germinación se registró una disminución de las proteínas totales de hasta un 22%, a los 15 días después de la germinación (DDG). Específicamente en el caso de las proteínas relacionadas al metabolismo de carbohidratos, se observó un ligero aumento en la concentración a los 9 DDG, y una tendencia a disminuir hacia los 15 DDG, al igual que en las proteínas relacionadas a glucólisis (Sghaier-Hammami *et al* 2009).

Extractos de algas

Actualmente se cree que el uso de bioestimulantes es una estrategia sostenible para mejorar la productividad agrícola (Santaniello *et al* 2017), aunque la definición del concepto de qué constituye un bioestimulante ha generado dificultades para su regulación (Khan *et al* 2009, Calvo *et al* 2014). Du Jardin (2015) define los bioestimulantes como cualquier sustancia que mejore la eficiencia de la nutrición, la tolerancia al estrés, y la cosecha, sin importar su contenido nutricional (Filippo-Herrera *et al* 2019).

El Parlamento Europeo (2019) define a un producto bioestimulante como: “el producto que estimula los procesos de nutrición de las plantas independientemente del contenido de nutrientes del producto, con el único objetivo de mejorar una o varias de las siguientes características de la planta o su rizósfera: eficiencia del uso de nutrientes, tolerancia al estrés abiótico, características de calidad, disponibilidad de nutrientes inmovilizados en el suelo o la rizosfera” (Ricci *et al* 2019).

Los extractos de alga, al ser un recurso renovable pueden ser una fuente de compuestos importantes para la actividad agrícola sostenible (Rayorath *et al* 2008). La producción mundial de algas marinas se ha duplicado del 2005 al 2015, principalmente para el consumo humano (Ferdouse *et al* 2018), pero una parte considerable es utilizada como biofertilizante y/o bioestimulante para el aumento en el rendimiento y el desarrollo de cultivos, y alimento de ganado (Begum *et al* 2018, Khan *et al* 2009).

La recolección de algas marinas y su uso como materia orgánica y enmienda al suelo ha sido documentado por siglos desde los romanos (Khan *et al* 2009, Arioli *et al* 2015), pero es hasta 1952 que se desarrolla en Inglaterra el procedimiento de licuar la biomasa de algas, revolucionando su uso y extendiendo la disponibilidad de extractos en la agricultura (Arioli *et al* 2015).

Diversos estudios en distintas especies y zonas del mundo, han demostrado el potencial de los extractos de algas como herramienta para las estrategias de adaptación de la agricultura al cambio climático (Khan *et al* 2009). Se han documentado contribuciones en el manejo del suelo y nutrición, manejo integrado de plagas, eficiencia del uso del agua, y tolerancia al estrés biótico y abiótico (Arioli *et al* 2015).

Además de factores como la dosis, la frecuencia y el momento de aplicación, la diversidad de efectos encontrados es debido a la compleja composición química de cada

especie y el método de extracción (Arioli *et al* 2015, Khan *et al* 2009). Los modos de acción para los efectos observados no se comprenden a cabalidad ya que se presenta una gran diversidad de compuestos orgánicos, entre ellos:

- Hormonas vegetales: auxinas, citoquininas, etileno, giberelinas, ácido abscísico, brasinoesteroides y estrigolactonas (Begum *et al* 2018, Hernández-Herrera *et al* 2018, Santaniello *et al* 2017, Sharma *et al* 2016, Arioli *et al* 2015, Hidangmayum & Sharma 2015, Calvo *et al* 2014, Sharma *et al* 2012, Khan *et al* 2009, Rayorath *et al* 2008, Demir *et al* 2006, Arioli *et al* 2015).
- Moléculas cuaternarias de amonio: betaína y prolina, osmoreguladores con rol importante en la tolerancia al estrés abiótico (Khan *et al* 2009, Arioli *et al* 2015, Sharma *et al* 2012).
- Alginato y diversos polisacáridos: estimulantes de crecimiento radical y promotores de mecanismos de defensa contra patógenos (Arioli *et al* 2015, Hernández-Herrera 2018, Sharma *et al* 2016, Khan *et al* 2009, Rayorath *et al* 2008).
- Minerales y elementos traza (Arioli *et al* 2015, Hernández-Herrera 2018, Begum *et al* 2018, Santaniello *et al* 2017, Sharma *et al* 2012, Hidangmayum & Sharma 2015).
- Moléculas lipídicas como esteroides (Arioli *et al* 2015, Hernández-Herrera 2018, Santaniello *et al* 2017).
- Vitaminas, aminoácidos y proteínas (Arioli *et al* 2015, Hernández-Herrera 2018, Khan *et al* 2009, Hidangmayum & Sharma 2015).
- Antioxidantes, pigmentos, compuestos fenólicos (Arioli *et al* 2015, Hernández-Herrera 2018, Santaniello *et al* 2017).
- Complejos de microorganismos: fijadores de nitrógeno, halófilos, mohos, levaduras (Arioli *et al* 2015, Hernández-Herrera 2018, Calvo *et al* 2014).

Las especies más utilizadas de las algas marinas son, principalmente las algas pardas (*Phaeophyta*) y entre estas la especie *Ascophyllum nodosum* es la más utilizada (Rayorath *et al* 2008). Ésta es un alga del hemisferio norte, producida principalmente en las costas atlánticas de Canadá y el norte europeo (Khan *et al* 2009, Calvo *et al* 2014). Su capacidad para resistir condiciones extremas de temperatura, salinidad y otros factores promovió su producción en masa y es el alga más utilizada en la agricultura canadiense y europea (Rayorath *et al* 2008).

Otros géneros de algas pardas utilizadas son *Fucus spp.*, *Laminaria spp.*, *Sargassum spp.*, y *Turbinaria spp.* (Khan *et al* 2008). En México se utilizan en su mayoría las algas *Gelidium robustum* y *Macrocystis pyrifera* para la producción de extractos de algas como bioestimulantes, seguido por especies del género *Sargassum spp.* y otras especies en menor medida como *Ascophyllum nodosum* y *Laminaria spp.*, *Ecklonia arborea*, *Ulva lactuca*, entre otras (Hernández-Herrera *et al* 2018). Bernecker-Lücking & Morales-Zürcher (2002) realizaron un inventario de macroalgas de Costa Rica donde identificaron cuatro géneros de algas pardas en la costa pacífica y ocho géneros en la costa atlántica, también encontraron que las algas *Sargassum spp.*, *Dictyota spp.* y *Padina spp.* se encuentran en ambas costas.

En Costa Rica se han realizado pocos estudios, enfocados en pruebas con productos comerciales en melón (Alvarado-Sánchez & Monge-Pérez 2015), pepino, chile dulce (Salazar 2016) y pasto kikuyo (Aguilar-Rodríguez 2017). Los resultados son variables, en melón se observaron mejoras en peso del fruto, en pepino y chile dulce hubo un aumento de rendimiento; y en pasto kikuyo aumentó la materia seca pero a un costo mayor que la fertilización convencional.

En general las algas son un recurso barato, abundante y accesible localmente con un potencial importante para la agricultura sostenible (Hernández-Herrera *et al* 2018). En México se comercializan gran variedad de productos a base de extracto de algas o similares, pero sus dosis de aplicación y efectividad todavía no son claras. La producción sostenible y artesanal para la industria de extracción podría representar una oportunidad comercial para las zonas costeras de Costa Rica, como lo es en México (Hernández-Herrera *et al* 2018).

Estudios moleculares en el género *Phoenix*

Las 14 especies del género *Phoenix* se han caracterizado morfológicamente (Carreño-Sánchez 2017). Pero, debido a las características monofiléticas del género y especies morfológicamente muy similares, es difícil distinguir entre las especies del género *Phoenix* (Gros-Balthazard *et al* 2016, Pintaud *et al* 2010).

Existe poca variación genética y morfológica entre las especies de *Phoenix*, muestreadas en distintas regiones, por tanto para su caracterización se utilizan marcadores moleculares con alto grado de polimorfismo como son los mini y microsatélites. Estas secuencias son loci con las mayores tasas de mutación en el

genoma, por tanto su alto polimorfismo permite diferenciar las distintas especies de *Phoenix* (Pintaud *et al* 2010, Gros-Balthazard *et al* 2016). La mayoría de los microsatélites desarrollados en *P. dactylifera* han sido transferibles a otras especies de *Phoenix*, indicando una cercana relación interespecífica (Pintaud *et al* 2010, Pintaud *et al* 2013), acorde a la capacidad del género de producir híbridos fértiles (Barrow 1994, Carreño-Sánchez 2017, Pintaud *et al* 2010, Gros-Balthazard 2013).

La identificación mediante marcadores moleculares permite atribuir un fenotipo a un conjunto de genotipos, eliminando la variabilidad del ambiente (Carreño-Sánchez 2017). En el género *Phoenix*, los estudios más actualizados y relevantes fueron realizados por Pintaud *et al* (2010 y 2013), Henderson *et al* (2006), Gros-Balthazard *et al* (2016), y Carreño-Sánchez (2017). Estos estudios se enfocaron en la diversidad, origen y reproducción del género, con especial atención al origen y domesticación de *P. dactylifera*, el cual es poco conocido a pesar de su importancia económica.

En las últimas décadas, la secuenciación de genomas en diversas especies ha sido el motor principal detrás de la expansión del conocimiento biológico (Gillings & Westoby 2013). Debido al desarrollo de las técnicas moleculares, ha sido posible que actualmente estas sean más baratas y fáciles de utilizar, permitiendo identificar y comprender procesos y funciones biológicas en los organismos (Gillings & Westoby 2013, Gupta *et al* 2017).

Aunque existen estudios moleculares en *Phoenix*, se pueden mencionar pocos estudios enfocados al proceso de germinación. Por ejemplo, el análisis proteómico del proceso germinativo de *Phoenix dactylifera*, realizado por Sghaier-Hammami *et al* (2009), Siles *et al* (2018) demuestra que la biosíntesis de vitamina E es un regulador del proceso de germinación en *Chamaerops humilis*, y Souza-Dias *et al* (2017) realizaron un análisis del contenido endógeno de hormonas sobre la germinación de *Attalea vitrivir* y *Butia capitata*. El estudio del proceso germinativo en otros cultivos se enfoca en relacionar características de tolerancia al estrés abiótico (Fujino *et al* 2008), caracterizar fenotipos con QTLs (Hatzig *et al* 2015), e identificar rutas metabólicas como el peróxido de hidrógeno (Wopjtyla *et al* 2016) y el transporte de nitrato (Yan *et al* 2016).

Reacción en Cadena de la Polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), es el método fundamental de amplificación de ácidos nucleicos para la biología molecular, y es

una de las prácticas más importantes para la investigación (Kalendar *et al* 2017). El PCR consiste en exponer fragmentos de ácidos nucleicos a ciclos de temperatura variable y a una polimerasa estable a la temperatura que generan ciclos repetidos de duplicación de ADN, lo cual produce una gran cantidad de copias del gen o fragmento de ADN de interés (Dorado *et al* 2019, Olsen 2016).

La implementación de esta reacción requiere de la presencia de una serie de componentes: el ADN de interés, los imprimadores, la enzima polimerasa y los nucleótidos libres, además de otros agentes que aseguran condiciones idóneas para que ocurra la reacción, como el magnesio (Dorado *et al* 2019, Kalendar *et al* 2017). La amplificación de estos fragmentos se realiza en 2-3 fases de temperatura: una fase de desnaturalización donde la doble hélice se abre, una fase de hibridación donde los imprimadores se acoplan al ADN, y la fase de elongación o extensión donde la enzima polimerasa duplica la cadena (Kalendar *et al* 2017, Olsen 2016).

El propósito básico del PCR es detectar y caracterizar fragmentos de ADN, pero a partir de esta metodología se han derivado diversas técnicas moleculares, como el PCR cuantitativo (Dorado *et al* 2019). Esta técnica permite cuantificar indirectamente el número de copias de ADN generadas durante un proceso de amplificación, a través de la medición en tiempo real de un tinte fluorescente (Lin & Elowitz 2016, Olsen 2016, Dorado *et al* 2019). Estos tintes actúan como una sonda e interactúan con macromoléculas, como cadenas dobles de ADN producto de una amplificación por PCR y otras aplicaciones de biología molecular (Dudová *et al* 2015).

Existen diversos tintes con capacidad de unirse al ADN como lo son el bromuro de etidio, acridina, estilbena, pireno, antraceno, cumarina, y SYBR Green I. Este último aumenta el brillo al interactuar con los nucleótidos en solución acuosa, mediante la liberación de energía por fotoexcitación en forma de fluorescencia. Otros tintes dependen del potencial de oxidación y reducción de los nucleótidos (Dudová *et al* 2015).

Generación de imprimadores

Los imprimadores son un par de secuencias cortas de oligonucleótidos que se acoplan a la secuencia de interés y permiten la polimerización. Su cálculo y su diseño *in silico* es un paso crítico para asegurar la amplificación específica, los sitios de acople a distancias apropiadas, y en general una eficiente reacción (Kalendar *et al* 2017, Bhagavan & Ha 2015, Dorado *et al* 2019).

PCR cuantitativo con transcriptasa inversa

El análisis de los niveles de ARN provee información importante sobre la expresión genética y su regulación (Wang *et al* 2015, Dorado *et al* 2019). La extracción y la purificación del ARN son técnicas moleculares de rutina, y aunque se ha realizado grandes progresos en la facilidad y eficacia de los métodos, la degradación y contaminación de ARN durante la extracción son difíciles de controlar (Shi & Bressan 2006, Nielsen 2011).

La degradación del ARN puede ser debido a la presencia de enzimas denominadas ARNasas, y la contaminación ocurre por la coprecipitación de polisacáridos, proteínas y metabolitos secundarios (Dorado *et al* 2019). Las condiciones del laboratorio deben impedir la contaminación de las muestras, especialmente por las ARNasas (Shi & Bressan 2006). Se han desarrollado diversos juegos de reactivos por compañías biotecnológicas, con métodos de inhibición de ARNasas y purificación, que permiten una mayor facilidad de uso y que reducen los riesgos por degradación y contaminación (Nielsen 2011, De Keyser *et al* 2020).

El estudio de los patrones de expresión genética en distintos tejidos y estados de desarrollo, permite entender sus funciones biológicas (Wang *et al* 2015, Dorado *et al* 2019). El PCR cuantitativo con transcriptasa inversa (RT-qPCR) es el método más utilizado para determinar niveles de expresión genética, debido a su versatilidad, rapidez, confiabilidad, alta sensibilidad, especificidad y precisión (De Keyser *et al* 2019). El método consiste en la retro-transcripción del ARNm a ADN complementario (ADNc) por transcriptasas inversas (RT por sus siglas en inglés), combinado con la técnica de qPCR (Bhagavan & Ha 2015, Olsen 2016, De Keyser *et al* 2020).

La precisión del método está influenciada por variables como el genotipo del material, la variabilidad de la extracción, la efectividad de la transcripción en reversa, y la eficiencia de la amplificación de los imprimadores (Dorado *et al* 2019). Por lo tanto, la normalización del proceso mediante genes de referencia es un prerrequisito esencial para minimizar estas variables (Yeap *et al* 2014). Idealmente los genes de referencia deben estar presentes a niveles de expresión similar y constante en todos los tejidos, en todos los estados de desarrollo, y en distintas condiciones ambientales (Yeap *et al* 2014, Olsen 2016).

Materiales y Métodos

Localización

El trabajo se realizó en la Estación Experimental Fabio Baudrit Moreno (EEFBM) ubicada en La Garita, Alajuela, con una temperatura máxima mensual promedio de 28°C y humedad relativa mínima promedio de 52%. La investigación se dividió en dos ensayos: prueba de germinación y análisis molecular. El diseño experimental fue irrestricto al azar con un arreglo anidado incompleto. Los factores evaluados fueron el tipo de solución (ácido giberélico (GA₃) y extracto de algas), y el tiempo de inmersión en la solución (30 minutos, 1 y 4 horas). El factor solución presenta un arreglo anidado con tres dosis de GA₃ (10, 100 y 1000 mg/L) y con dos dosis de algas (969 y 1938 mg/L).

Material vegetal

Se recolectaron 19 racimos maduros de dos plantas de *P. roebelenii* de la EEFBM con aproximadamente 3341.6 g de fruta. Los frutos se colocaron en un balde y se frotaron con la mano en seco para liberar la pulpa de la semilla. Las semillas se almacenaron con la pulpa por la noche, se lavaron con agua y se seleccionaron las semillas de color café oscuro, provenientes de frutos con color negro oscuro y con pulpa suave. El peso fresco promedio fue de 309 mg/fruto y 187 mg/semilla, con base a una muestra de cinco frutos y cinco semillas de los racimos recolectados.

Soluciones

Las soluciones de giberelinas se prepararon con el producto comercial RyzeUp®4SL. La dosis máxima de GA₃ se basa en la aplicación de 1000 mg/L reportada por Broschat & Donselman (1987) para semillas de las palmas ornamentales: *Arecastrum romanzoffianum*, *Phoenix roebelenii* y *Roystonea regia*.

Las soluciones de extracto de alga se prepararon con el producto comercial KelpMax®. Primeramente, con base al rango de dosis recomendada por INBIOSA (1-2.5 mL/L), se utilizó como dosis alta 2 mL/L y dosis baja de 1 mL/L. El producto tiene una densidad de 1.02 g/mL a una concentración de 95% p/p de una mezcla de *Ascophyllum nodosum*, *Sargassum spp.* y *Laminaria spp.*, para una concentración de 1938 y 969 mg/L de extracto de alga.

Imbibición

Se prepararon 800 mL de soluciones de GA₃ a 10, 100 y 1000 mg/L, y de 1938 y 969 mg/L de extracto de algas. Las soluciones se distribuyeron en tres beakers de 500 mL de acuerdo al tiempo de inmersión (30 minutos, una y cuatro horas), para un total de 15 tratamientos. El testigo consistió en imbibición en un beaker con agua destilada por cuatro horas.

A partir del material recolectado, se colocaron al mismo tiempo entre 200 y 250 g de semilla fresca en los 16 beakers. A los 30 y 60 minutos de agregar las semillas, se cambió la solución en uno de los tres beakers por agua destilada, y al cabo de cuatro horas se sacaron todas las semillas de los beakers.

Pruebas de germinación

Después de la imbibición, las semillas se colocaron en bandejas plásticas de 32 celdas, previamente desinfectadas con una solución de 4 % NaClO, y llenas con sustrato de turba + perlita (3:1) (Klasmann-Deilmann GmbH). Se sembraron dos bandejas por tratamiento con cinco semillas por celda para un total de 320 semillas. Las bandejas permanecieron en el invernadero H de la EEFBM del 18 de mayo al cinco de octubre, con un riego por aspersión diario, de 9:00 a.m. a 11:00 p.m.

Se evaluó semanalmente la germinación utilizando como criterio la emergencia del eófilo sobre el sustrato (Anexo IV). La unidad experimental fueron 50 semillas en el almácigo, con un total de cuatro repeticiones. Se calculó el tiempo medio de germinación (T50) con base en una extrapolación del 50% de germinación total a los días después de siembra (DDS). Se comprobaron los supuestos de la varianza para el porcentaje de germinación promedio por semana y T50. Con el programa InfoStat® se realizó una prueba paramétrica DGC a los porcentajes de germinación de cada semana, y se realizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis a los datos de T50, con base en un valor de significancia del 5% ($p=0.05$).

Búsqueda de genes ortólogos

Los genes se identificaron en la base de datos de *Arabidopsis thaliana*, TAIR (<https://www.arabidopsis.org/index.jsp>), como secuencias de ADN complementario (cDNA). Se realizó un análisis de similitud por BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) en la bases de datos “Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes” (KEGG)

(<https://www.genome.jp/kegg/>) para *Phoenix dactylifera* (https://www.genome.jp/kegg-bin/show_organism?org=pda). El diseño de los imprimadores para qPCR se realizó en GenScript (<https://www.genscript.com/tools/real-time-pcr-tagman-primer-design-tool>).

Se generaron tres pares de imprimadores para cada gen putativo y se realizó un BLAST de los mismos en NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y en KEGG para confirmar la identidad de los genes de interés. Los imprimadores amplifican fragmentos de 50-200 bp según GenScript. Se decidió utilizar como gen de referencia a *UBQ10* ya que es un gen que se expresa constitutivamente en semillas y tejidos de plantas de diferentes especies, y que es frecuentemente utilizado en experimentos de RT-qPCR (Dekkers *et al* 2012, Nong *et al* 2019, Jain *et al* 2018, Ribeiro *et al* 2018).

Análisis de expresión genética

Se cuantificó la expresión de los genes putativos *GA2ox*, *GA3ox*, *GAmyb* y *UBQ10* con el método RT-qPCR. Se compararon semillas frescas de *P. roebelenii* sin imbibición, semillas previamente embebidas con agua destilada por cuatro horas, y semillas tratadas con 1000 mg/L de GA_3 por una hora.

El procedimiento de RT-qPCR se llevó a cabo en cuatro fases: la preparación del material, extracción de ARN, retrotranscripción y qPCR. El material se preparó a partir de racimos maduros de *P. roebelenii* en la EEFBM. Se seleccionaron los frutos más maduros, de coloración negra, con fácil desprendimiento del racimo, con pulpa suave lo que permite extraer la semilla al presionar suavemente un extremo del fruto, y a partir de estos, las semillas más robustas con coloración café oscuro.

Quince horas antes de comenzar la extracción de ARN, las semillas embebidas se sembraron en bandejas con sustrato humedecido. Se tomaron tres muestras aleatorias de ocho semillas sin imbibición, embebidas en agua y tratadas con GA_3 , para un total de tres repeticiones. Cada muestra se colocó en un tubo Falcon™ de 15 mL y se congeló en nitrógeno líquido por cinco minutos. Un tubo a la vez, las semillas congeladas se transfieren a un molinillo de café para ser trituradas rápidamente. Las semillas trituradas se trasladan a un mortero donde se agrega nitrógeno líquido y se maceró con un pistilo hasta obtener un polvo fino. Una vez macerado se almacenó nuevamente en nitrógeno líquido hasta comenzar el proceso de extracción.

La extracción del ARN se realizó siguiendo el protocolo del kit ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System, (Anexo I). Inmediatamente se realizó la retrotranscripción en las

nuevas muestras de ARN con el kit Access RT-PCR System de Promega®, (Anexo II). El producto final, el cDNA (ADN complementario), se refrigeró a -70°C hasta la última etapa. Se realizó qPCR con el kit GoTaq® qPCR Master Mix de Promega® y el Rotor-Gene Qiagen, (Anexo III). Se utilizó el segundo par de imprimadores en cada gen, excepto *GAmyb* donde se utilizó el primer par de imprimadores.

Las curvas de expresión (Cq) de *GA2ox*, *GA3ox* y *GAmyb* fueron normalizadas con base en la expresión de *UBQ10* antes de la imbibición mediante el programa Q-Rex de Qiagen. Los valores promedio de cada tratamiento se compararon estadísticamente utilizando el programa InfoStat®. Los datos cumplieron con los dos supuestos de la varianza: la distribución normal y la homogeneidad de las varianzas entre tratamientos, por lo tanto, se realizó la prueba paramétrica DGC y la prueba T de Student.

Resultados

Pruebas de germinación

Se evaluaron los supuestos de la varianza en los datos de germinación recolectados semanalmente. Según la prueba Shapiro-Wilks y la prueba de Levene, a partir de la semana nueve no se rechazan los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza en los porcentajes de germinación ($p > 0.05$) (Cuadro I).

Cuadro I. Valores de probabilidad de las pruebas de Shapiro-Wilks y Levene en el porcentaje de germinación de *Phoenix roebelenii* a partir de las 9 semanas después de la siembra hasta las 20 semanas después de la siembra.

Semana	Shapiro-Wilks	Levene	Semana	Shapiro-Wilks	Levene
9	0.6731	0.1099	15	0.6037	0.7716
10	0.9120	0.3597	16	0.5414	0.7752
11	0.3256	0.1042	17	0.6937	0.6405
12	0.2532	0.4425	18	0.3980	0.7304
13	0.0887	0.8888	19	0.1790	0.8404
14	0.2390	0.9068	20	0.4123	0.8419

Los datos de T50 presentan el supuesto de normalidad ($p=0.8057$) pero se rechaza el supuesto de homogeneidad ($p=0.0001$), por lo tanto, se procedió a realizar una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. La distribución normal de las variables puede ser observada a través de un histograma y gráfico de cuantiles en la Figura 1.

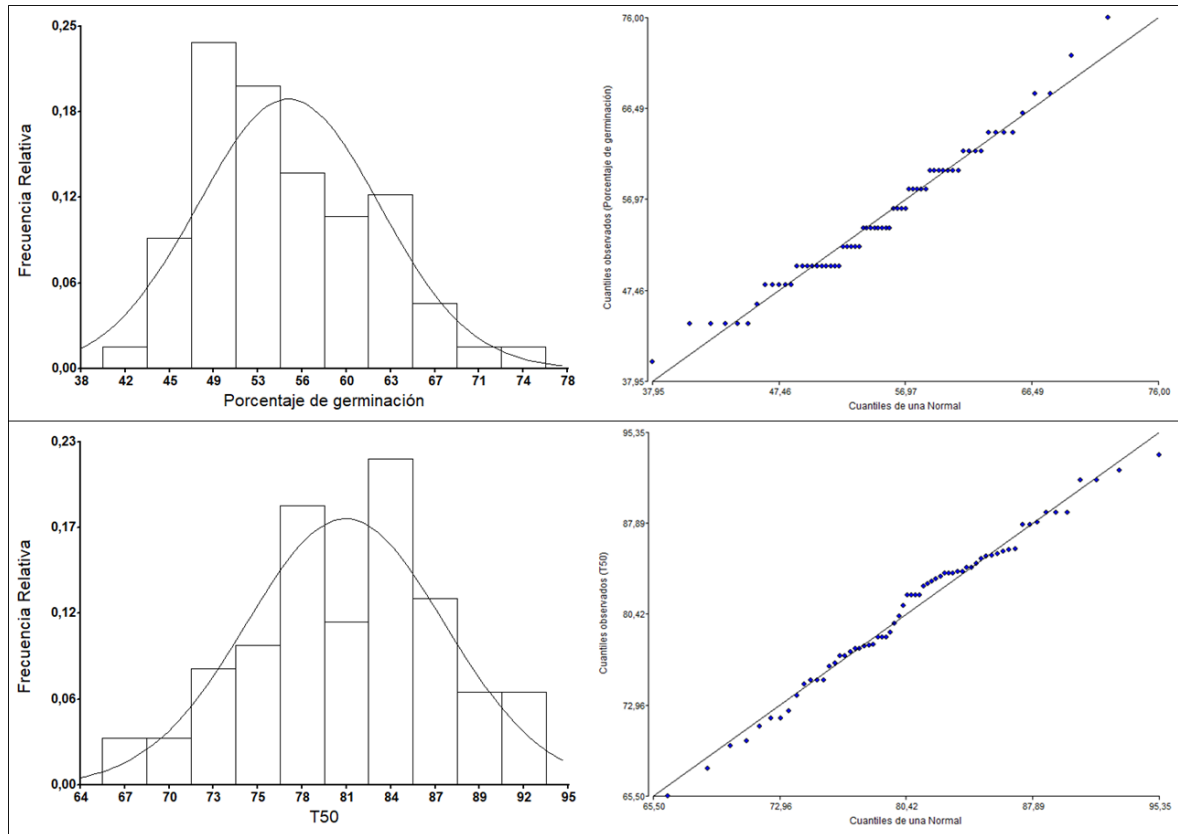


Figura 1. Histograma y gráfico de cuantiles (Q-Q plot) en los porcentajes de germinación de *Phoenix roebelenii* a las 20 semanas después de la siembra (arriba) y el tiempo medio de germinación (T50) (abajo).

La germinación inició a los 49 DDS (7 semanas) en la mitad de los tratamientos y testigo con porcentajes de 0.5-1%. A los 61 DDS todos los tratamientos y el testigo presentan germinación con porcentajes de 9.1% en promedio sin diferencias significativas entre ellos.

A partir de la semana 10 se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos y el testigo (Figura 2). Aunque no demuestran un patrón o tendencia, se

presenta un grupo de tratamientos con porcentajes de germinación de 11.5-16%, y el otro con porcentajes de 16-25%.

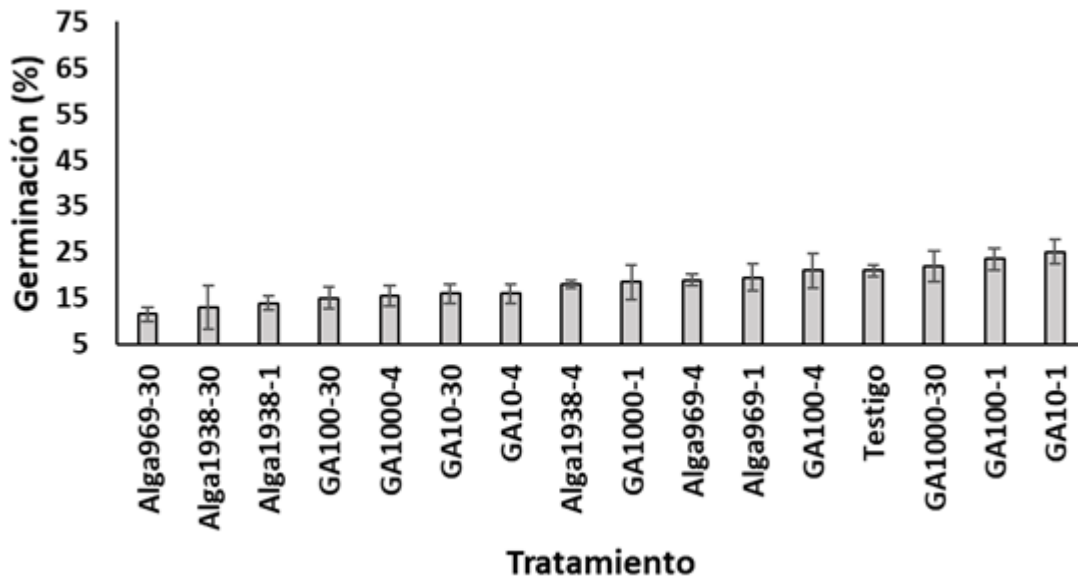


Figura 2. Porcentaje de germinación promedio en semillas de *Phoenix roebelenii* expuestas en tres periodos de tiempo a tres concentraciones de ácido giberélico y dos de extractos de alga, 10 semanas después de la siembra. Las líneas verticales representan las barras de error estándar.

A las 12 semanas los tratamientos de 1 h de inmersión en GA3 presentaron diferencias respecto a los demás (Figura 3), con germinaciones de 36, 37.5 y 33% a 10, 100 y 1000 mg/L respectivamente, además del tratamiento de 100 mg/L de GA3 por 4h que mostró 31.5% de germinación. Los demás tratamientos y el testigo rondaron valores de 22.5-29.5%.

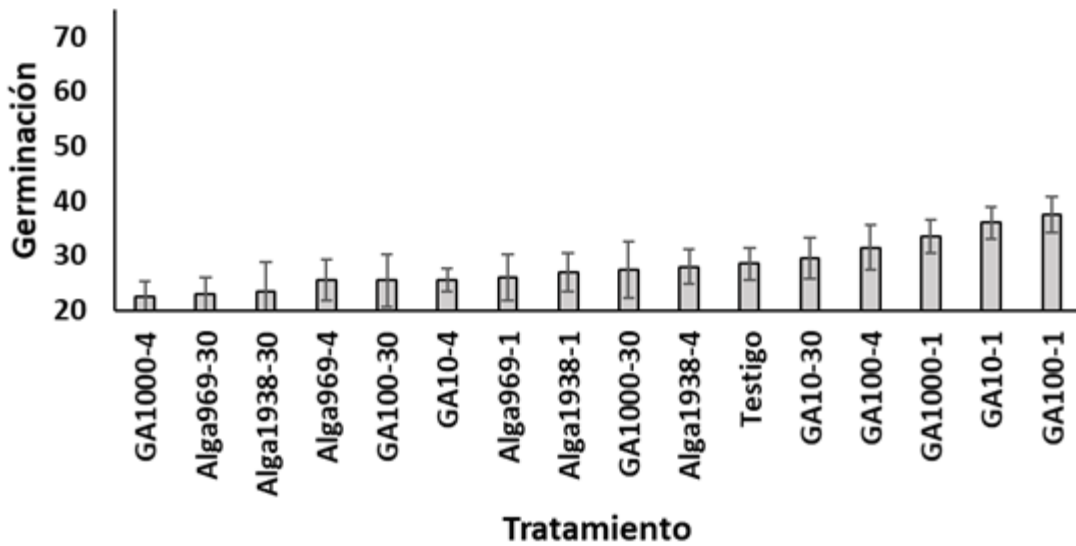


Figura 3. Porcentaje de germinación promedio en semillas de *Phoenix roebelenii* expuestas en tres periodos de tiempo a tres concentraciones de ácido giberélico y dos de extractos de alga, 12 semanas después de la siembra. Las líneas verticales representan las barras de error estándar.

A partir de la semana 15, las semillas tratadas con una inmersión en 1000 mg/L de GA3 por 1h presentaron diferencias significativas con respecto a los demás tratamientos y al testigo, y mostraron 62% de germinación (Figura 4). Los demás tratamientos mostraron valores de 41.5-53.5%, y el testigo 47.5%.

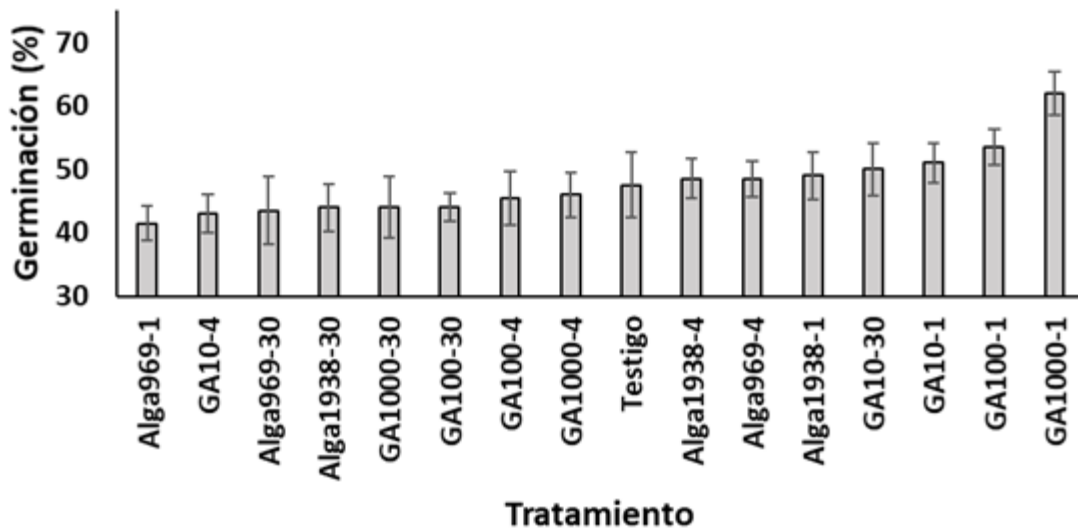


Figura 4. Porcentaje de germinación promedio en semillas de *Phoenix roebelenii* expuestas en tres periodos de tiempo a tres concentraciones de ácido giberélico y dos de extractos de alga, 15 semanas después de la siembra. Las líneas verticales representan las barras de error estándar.

A las 20 semanas después de la siembra, el porcentaje de germinación total fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en el tratamiento de 1000 mg/L de GA₃ por 1h (Figura 5) comparado a los demás tratamientos y testigo. El testigo tuvo una germinación total de 55% y el tratamiento de 1000 mg/L de GA₃ por 1h generó aumentos significativos de 25.5% sobre el control, para una germinación total del 69%. Los demás tratamientos presentaron germinaciones totales entre 50-59% sin diferencias significativas respecto al testigo ($p > 0.05$).

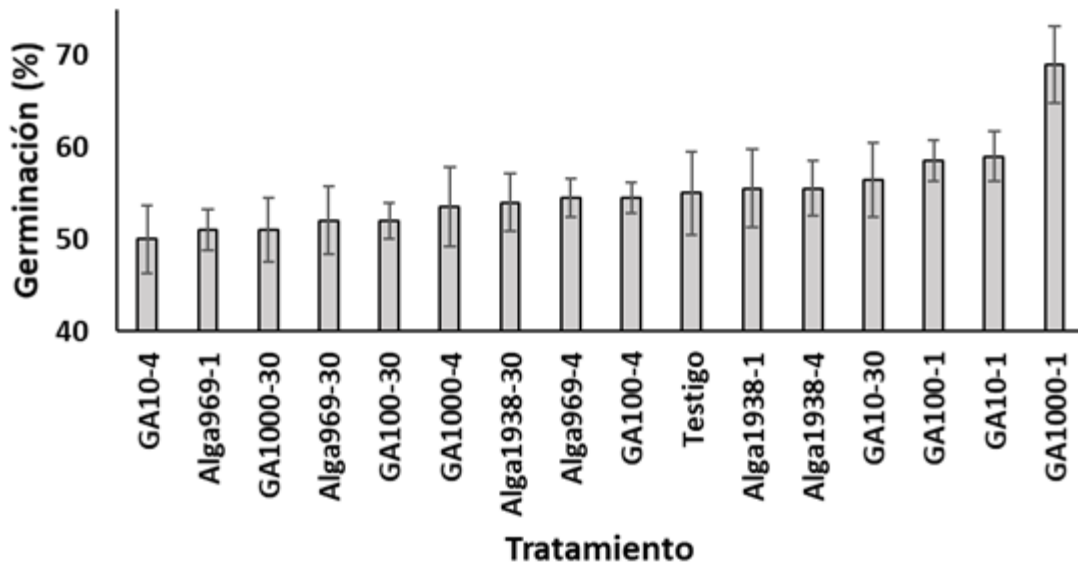


Figura 5. Porcentaje de germinación promedio en semillas de *Phoenix roebelenii* expuestas en tres periodos de tiempo a tres concentraciones de ácido giberélico y dos de extractos de alga, 20 semanas después de la siembra. Las líneas verticales representan las barras de error estándar.

Con respecto al tiempo medio de germinación, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos y el testigo (Figura 6). En general, el tiempo medio de germinación de *P. roebelenii* ronda los 75-86 DDS, con un promedio de 81 DDS (11-12 semanas). Cabe resaltar que el 95% de la germinación se da entre los 107-142 DDS con un promedio de 117 DDS (16-17 SDS), un 45% de la germinación total en aproximadamente 4 semanas.

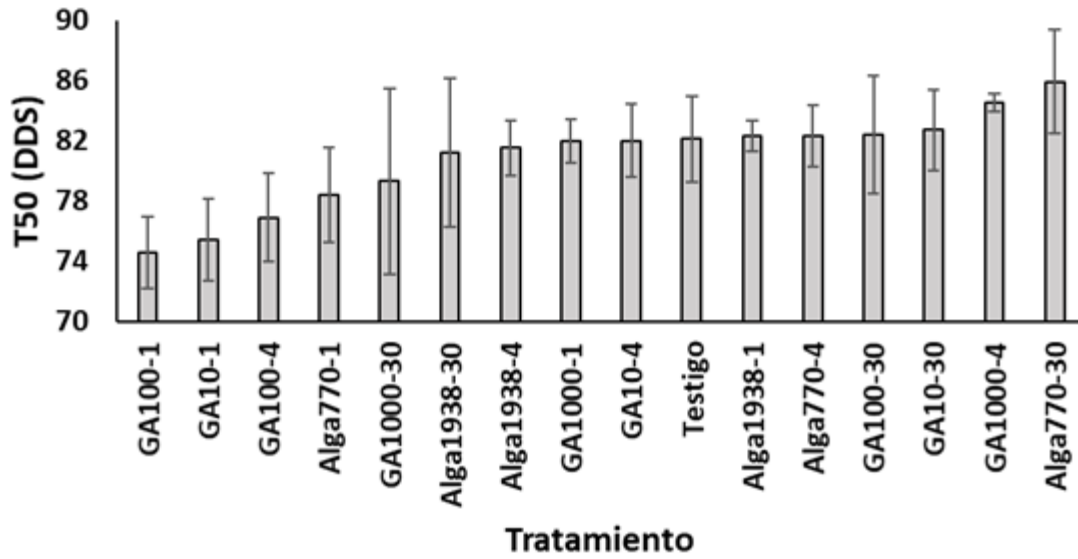


Figura 6. Tiempo medio de germinación en días después de la siembra, ordenados de menor a mayor, en semillas de *Phoenix roebelenii* expuestas en tres periodos de tiempo a tres concentraciones de ácido giberélico y dos de extractos de alga. Las líneas verticales representan las barras de error estándar.

Búsqueda de genes ortólogos

Se lograron identificar distintos genes ortólogos asociados en los procesos de germinación (Cuadro I). Los valores de expectativa (E-value) de los genes ortólogos encontrados en *Phoenix dactylifera* fueron sumamente bajos, lo cual indica un alto grado de concordancia con el gen identificado en *Arabidopsis thaliana*. Igualmente, los porcentajes de identidad reflejan la similitud de sus secuencias. Posteriormente se diseñaron los imprimadores para estudiar la expresión de dichos genes putativos en *Phoenix roebelenii* (Cuadro II).

Cuadro I. Genes identificados en las bases de datos TAIR y KEGG

Gen	<i>A. thaliana</i> (locus)	<i>P. dactylifera</i> (locus)	E-value	Identidad (%)
GA2ox	AT1G02400.1	103721482 K04125	2×10^{-120}	100
GA3ox	AT1G15550.1	103717451 K04124	6×10^{-130}	66
Gamyb	AT5G06100.2	103705001 K09422	9×10^{-109}	78
UBQ10	AT4G05320.2	103711715 K08770	0	80

Cuadro II. Imprimadores diseñados para amplificar distintos genes ortólogos asociados con la germinación en *Phoenix dactylifera*

Gen	Primers		
	n	F (5' a 3')	R (5' a 3')
<i>PdGA2ox</i>	1	CACCTGAACGCAATGAGAGG	TGGGTTGGCAAGGAGAAGAA
	2	TTCTTCTCCTTGCCAACCCA	TTCCGACTCCCGTATCCAAG
	3	CGAGAGTGACTCCTTGGTCA	CTGCCACCTTTGCCATCTTT
<i>PdGA3ox</i>	1	CCTAGATCGCCTCGAGTACC	TCGGACCACATGAACTTGGA
	2	TCCAAGTTCATGTGGTCCGA	CAGAATCCACCGGAGTCCTT
	3	TCTCACATCCTCTCCAACGG	TATATACGCCGCCGAGAGAC
<i>PdGamyb</i>	1	GGAGCTCCCTTCACTCCAAT	CTGGAGGAGCCTGGATGTAG
	2	CCGGGACGGACAGATAATGA	CCTTGCAAGACCTCATTGGG
	3	GCCACAGCAACACTTTCTGA	CACGAGGCATGTTGTTCCAT
<i>PdUBQ10</i>	1	CCTGATCTTTGCTGGGAAGC	GGTGTCTGAGCTCTCAACCT
	2	GCGGCATGCAGATCTTTGTA	TGCATCTTCGAGCTGCTTTC
	3	TGTGGATCAGCAGCGTCTTA	CAGGTGAAGGGTGGATTCTT

Los resultados de la prueba de RT-qPCR, sugieren que no hay diferencias significativas entre la expresión de los genes de interés, tanto en semillas antes de la imbibición, como embebidas en agua por 4 h, y tratadas con 1000 mg/L de GA₃ por una hora (Figura 7). Como se observa en las barras de error, estándar, la dispersión de los datos es muy alta.

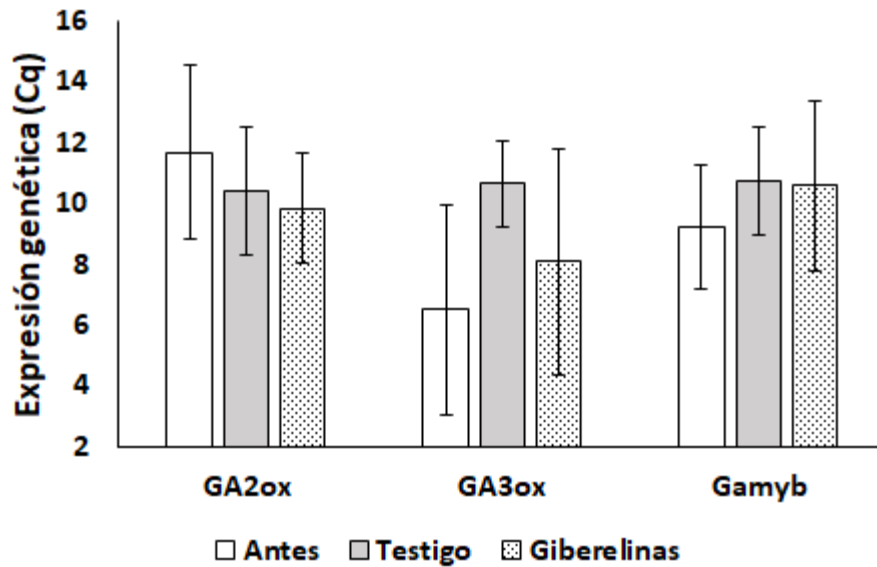


Figura 7. Expresión de los genes *GA2ox*, *GA3ox*, y *Gamyb* (relativo al gen *UBQ10*) en semillas de *Phoenix roebelenii* antes de imbibición (barras color blanco), después de la imbibición por 4 horas con agua (barras color gris), y después de imbibición con 1000 mg/L GA3 por una hora (barras color punteado). Líneas verticales indican error estándar.

Discusión

Pruebas de germinación

El peso fresco de las semillas utilizadas concuerda con los reportados por lossi *et al* (2007) de 390 mg/fruto y 171 mg/semilla a los 194 y 117 días después de la antesis respectivamente, pero los porcentajes de germinación obtenidos fueron menores a los porcentajes reportados en la literatura, al igual que la velocidad de germinación medida en T50. Broschat & Donselman (1987) reportaron una germinación de 77.3% con un valor de T50 de 43.7 DDS en agua, y germinación del 87% y T50 a los 56 DDS con un tratamiento de 1000 mg/L de GA3 e imbibición por 48 h. Prakash *et al* (2019) reportaron 98% de germinación a los 75 DDS en semillas embebidas por 15 minutos en agua caliente (40°C). lossi *et al* (2003) reportaron 88 y 90% a los 78 DDS en semillas sembradas directamente en distintos sustratos a 25 y 30°C, respectivamente. En otro estudio de lossi *et al* (2006), se observó la germinación desde los 27 hasta los 58 DDS. En frutos cosechados a partir de los 110 días después de antesis se obtuvo una germinación de 95% a los 127 DDS (lossi *et al* 2007).

Las diferencias en tiempo de germinación respecto a los estudios mencionados (Prakash *et al* 2019, lossi *et al* 2007, lossi *et al* 2006, lossi *et al* 2003, Broschat & Donselman 1987), es atribuible al uso de la protrusión de la radícula como criterio para la germinación. Por lo tanto, al considerar que la emergencia del eófilo ocurre mínimo 15 días después de la protrusión (lossi 2006), los tiempos de germinación observados concuerdan con los datos reportados ya que, dependiendo de las condiciones ambientales y de la madurez de la semilla, la germinación puede comenzar a los 47, 60 ó 120 DDS (lossi *et al* 2006). En cambio, el estudio realizado por Meerow (1994), utiliza como criterio la emergencia del eófilo y reportó germinación a partir de las 7 semanas con un máximo de germinación del 79.3% a los 91 DDS.

Es muy probable que las diferencias en la germinación total se deban a las condiciones ambientales. En general, los estudios mencionados utilizaron una cámara de germinación que mantiene la temperatura y humedad constante durante las evaluaciones, por ejemplo, la temperatura se mantuvo a 30°C y a humedad relativa alta (90-95%). Meerow (1994) realizó las pruebas en invernadero, pero mantuvo un riego por aspersión de 10 segundos cada 15 min. Las condiciones no controladas del invernadero H de la EEFBM, generan temperaturas que oscilaron en un ámbito de 20-27°C durante el día y 19-20°C durante la noche, además la humedad relativa constantemente excedió al 90%, pero durante las horas más calientes del día varió entre 60-85%. Estas condiciones llevan a una menor tasa de germinación, aunque por otra parte se acercan a las condiciones comerciales que experimentan los productores.

Además de las condiciones ambientales de temperatura y humedad, otros factores mencionados en la literatura son el fotoperiodo de 8h de luz y 16h de sombra en las cámaras de germinación, la temperatura del sustrato a 30°C (lossi *et al* 2003), y la imbibición en agua a 40°C por 15 min (Prakash *et al* 2019). Este último factor es de interés ya que Prakash *et al* (2019) obtuvieron altos porcentajes de germinación, incluso en semillas almacenadas por 9 meses. Aunque no se observaron problemas de patógenos, todos los trabajos mencionados utilizaron un fungicida de baja residualidad (tiram) basados en el trabajo de Meerow (1994).

Es probable que la germinación observada a las 20 semanas (140 DDS) no sea la germinación total, las condiciones variables de temperatura y humedad, y el hábito de escalonado de la especie, probablemente prolongaron la germinación. Las germinaciones observadas presentan un comportamiento escalonado (Hoyle *et al* 2015), se observó

germinación del 50% a las 11-12 semanas, un 45% restante a las 16-17 semanas, y un 5% entre las 18-20 semanas.

Por otra parte, aunque la germinación aumentó considerablemente con 48 h de 1000 mg/L de GA3, Broschat & Donselman (1987) no recomendaron su uso debido a la elongación excesiva y el arrollamiento del eófilo, los cuales afectaron las hojas nuevas hasta por un año. En cambio, las aplicaciones realizadas en este trabajo no causaron ninguno de esos síntomas, por lo tanto, se puede decir que en *P. roebelenii* el efecto promotor de las giberelinas parece depender del tiempo de exposición a los tejidos, una exposición continua de giberelinas activas altera el control de la elongación celular por parte de los tejidos (Binenbaum *et al* 2018).

En esta investigación los extractos de algas no promovieron la germinación en comparación a varios estudios que reportan efectos positivos sobre la germinación de semillas en diversas especies (Brahmbhatt & Kalasariya 2015, Godlewska *et al* 2016, Carvalho *et al* 2013, El-Sheekh *et al* 2016, Sasikala *et al* 2016, Demir *et al* 2006, Hernández-Herrera *et al* 2013, Kavipriya *et al* 2011, Rayorath *et al* 2008, Zodape *et al* 2010, Narasimha & Chatterjee 2014).

Los mecanismos relacionados con la promoción de la germinación no son enteramente conocidos, pero Rayorath *et al* (2008) reportan que el uso de *A. nodosum* en cebada induce la actividad de la amilasa en semillas sin embrión y en mutantes deficientes en giberelinas. Además, al utilizar extractos sin GAs en medios con ABA (inhibidor de GAs) la actividad de la amilasa no se ve afectada, pero en presencia de carbono activado se inhibe la actividad por ser compuestos orgánicos. Rayorath *et al* sugieren que el o los ingredientes activos promueven la actividad de la amilasa a través de una ruta metabólica independiente de las giberelinas y posiblemente presenta un efecto sinérgico con la ruta por giberelinas promoviendo una mayor germinación total y vigor en las plántulas de cebada.

Rayorath *et al* (2008) observaron estos efectos con un extracto alcalino en solución acuosa y ligeramente en menor medida extracciones de sus compuestos orgánicos en metanol y cloroformo. Las dosis utilizadas del extracto acuoso fueron 100, 500 y 1000 mg/L, pero solamente la dosis de 1000mg/L generó diferencias significativas, concluyendo que el efecto de todos los extractos es dependiente de la dosis. Además, las semillas se sembraron en un pote de 8 cm de diámetro con vermiculita y las soluciones

se aplicaron en un riego al inicio de 50 mL, lo cual sugiere un efecto residual en el sustrato.

Kavipriya *et al* (2011) evaluaron extractos líquidos de algas marinas verdes (*Ulva lactuca*, *Caulerpa scalpelliformis*) y pardas (*Sargassum plagiophyllum*, *Turbinaria conoides*, *Padina tetrastromatica*, *Dictyota dichotama*) a distintas concentraciones (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5%) en semillas de *Vigna aculata*. Los extractos se aplicaron por 12 h, además de una aplicación al sustrato, con aumentos de germinación total de 28-43% dependiendo de cada especie y dosis, pero en general superior a los 2000 mg/L.

Hernández-Herrera *et al* (2013) evaluaron extractos líquidos de *Ulva lactuca*, *Caulerpa sertularioides*, *Padina gymnospora*, y *Sargassum liebmannii* a dosis de 0.2, 0.4 y 1% en semillas de tomate. Estas semillas se colocaron en papel absorbente y se mojaron con los extractos de algas, concluyeron que las dosis de 2000 mg/L de *U. lactuca* y *P. gymnospora* aumentaron la velocidad de germinación y el desarrollo de la plúmula y radícula. En cambio, el uso de dosis de 4000 y 10000 mg/L generó una disminución.

Comparando con los resultados observados en el presente trabajo, es probable que se observen efectos cuando las semillas se expongan a los compuestos orgánicos por más de 4 horas o aplicados al sustrato. En la Figura 1 se observa una tendencia de aumento en la germinación con respecto a la dosis y el tiempo de inmersión en el extracto de algas, pero sin diferencias significativas durante todas las semanas de evaluación.

Búsqueda de genes ortólogos

Los genes evaluados especialmente GA2ox y GA3ox son muy conocidos e identificados en distintas especies por sus roles fundamentales en la biosíntesis de giberelinas, involucrado en distintos procesos como crecimiento y desarrollo del fruto, floración (Binenbaum *et al* 2018, Li *et al* 2019).

Un cultivo muy estudiado sobre la función de estos genes es el viñedo. En este cultivo ha sido de interés identificar y analizar los genes de giberelina oxidasa durante el proceso de floración, para entender el funcionamiento de la inducción floral mediante el uso de GA3 exógeno. He *et al* (2019) reporta que los genes GAox aumentan su expresión bajo tratamientos foliares de ABA, NaCl, PEG y frío (5°C), y la expresión de

GA2ox y GA20ox en distintos tejidos y estadios de desarrollo son relativamente mayor a la expresión de GA3ox.

Igualmente, He *et al* (2019) observaron que algunos genes de GA2ox se regulan positivamente bajo la aplicación exógena de GA3, y GA3ox y GA20ox se regulan positivamente a la aplicación de uniconazole (inhibidor de la síntesis de GAs). En general observaron que distintos tejidos y estadios de desarrollo de uva, GA2ox inactiva GAs biológicamente activos y GA3ox permite la síntesis de GAs activas.

Otro estudio de caso es en tomate, donde estos genes han sido identificados y son utilizados en distintos estudios. Como el caso de Matsuo *et al* (2019) que utilizan los niveles endógenos de GAs y la expresión de genes asociados al metabolismo para explicar la respuesta de plántulas a distintos tipos de luz artificial. Un uso muy popular de estos genes es en la selección de fenotipos enanos, por ejemplo, sobreexpresión de GA2ox (Cheng *et al* 2019, Tang *et al* 2019).

GAmyb es principalmente conocido por sus estudios en la capa de aleurona en semillas de cereales (Alonso-Peral *et al* 2010). Diversos estudios han comprobado que los genes *myb* son altamente conservados en especies de plantas muy distantes y juegan un rol fundamental en diversos procesos de desarrollo como la liberación de polen, transición floral, crecimiento vegetativo o cuaje del fruto (daSilva *et al* 2017, Zheng 2018, Alonso-Peral *et al* 2010).

Análisis de expresión genética

Se considera que una de las posibles causas de no observar diferencias en la expresión de genes fue la variabilidad genética. *Phoenix roebelenii* es una especie alógama con una alta tasa de polinización cruzada (Carreño-Sánchez 2017, Cherif *et al* 2016, Barrow 1998), por tanto, la expresión genética de cada semilla durante el proceso de germinación es muy variable.

Al observar el comportamiento de GA2ox, la expresión del gen tiende a ser mayor antes de la imbibición y se reduce en semillas embebidas. Esta tendencia concuerda con la literatura reportada en cuanto al balance entre GA:ABA (Shu *et al* 2016, Nonogaki 2014, Ge & Steber 2018, Tuan *et al* 2018, Née *et al* 2017, Li *et al* 2018, Binenbaum *et al* 2018, Resentini *et al* 2014, Mitchell *et al* 2018, Li *et al* 2019), donde la degradación de GAs a través de GA2ox actúa como mecanismo inhibidor de la germinación.

Con respecto a *GA3ox*, su expresión tiende a ser menor antes de la imbibición de las semillas, y aumenta después de la imbibición. Igualmente, este patrón concuerda con el balance entre GA:ABA, donde la síntesis de GAs actúa como un mecanismo promotor de la germinación. Además, la expresión de *GA3ox* tiende a ser mayor en semillas embebidas en agua, comparado con semillas tratadas con GA₃. Igualmente, este comportamiento se puede explicar con base en el balance GA:ABA y la movilización de GAs. Dependiendo del contenido de GAs en los tejidos se genera retroalimentación positiva (promoción de síntesis) o negativa (degradación) (Binenbaum *et al* 2018, Li *et al* 2019), por lo tanto, al aumentar la concentración de GA₃, los tejidos responden y regulan el exceso de GA₃ al promover la degradación de las giberelinas mediante *GA2ox*.

GAmvb muestra un patrón similar a *GA3ox*, ya que este se expresa en respuesta a la presencia de GAs activas y actúa como mecanismo promotor de la germinación. Es un elemento clave durante la degradación de las reservas de almidón que alimentan al embrión.

Con base a los resultados, el comportamiento de los genes estudiados no se puede atribuir a la imbibición, ni a la aplicación exógena de GA₃. Además de la dispersión presentada en las mediciones, es probable que la actividad de estos genes no fue afectada por la imbibición debido a otros mecanismos poco conocidos que regulan el proceso de germinación, como el rol de las auxinas, nitrato y azúcares (Ma *et al* 2017, Shu *et al* 2016, Née *et al* 2017). Además, no se excluye que factores técnicos como medir la eficiencia de los imprimadores haya afectado la cuantificación de la expresión de los genes putativos.

Conclusiones

Al considerar la variabilidad entre los resultados obtenidos y los porcentajes de germinación reportados en la literatura para semillas de la palma *P. roebelenii* se determina una germinación dependiente a las condiciones ambientales. La siembra en turba con perlita bajo condiciones de invernadero y sin control de las variables ambientales no superó los resultados reportados en la literatura.

La germinación de *P. roebelenii* puede aumentar en respuesta a la aplicación exógena de giberelinas durante la imbibición de las semillas, pero es dependiente a la dosis y tiempo de exposición.

Las semillas de *P. roebelenii* no responden a una imbibición en el extracto algas marinas, utilizado a las dosis reportadas en este trabajo, ya que no se promovió la germinación.

Con base a los resultados de expresión, no se puede concluir que haya un rol directo entre el metabolismo de las giberelinas, y la promoción de la germinación en *Phoenix sp.*, debido a un comportamiento muy heterogéneo y sin diferencias significativas entre los tratamientos y testigo.

Recomendaciones

1. Se recomienda considerar, el tratamiento realizado por Prakash *et al.* (2019) donde sumerge las semillas en agua a 40°C por 15min y obtiene porcentajes de germinación total superior al 90% como alternativa para incrementar la germinación de *P. roebelenii*
2. Se sugiere evaluar la aplicación de extractos de alga directamente al sustrato. Existe evidencia de ingredientes activos orgánicos como azúcares que podrían tener un efecto residual y provocar un aumento en el porcentaje de germinación
3. Se sugiere incrementar los tiempos de imbibición, tanto en solución de giberelinas como en agua.

Literatura citada

- Aguilar-Rodríguez, RA. 2017. Efecto de la aplicación de Algasoil® sobre el rendimiento y valor nutricional del kikuyo (*Pennisetum clandestinum* Hoechst. Ex Chiov.) en Palmira, Zarcero, Alajuela, Costa Rica. Tesis Lic. Alajuela, Costa Rica, ITEC. 56p.
- Alonso-Peral, MM; Li, J; Li, Y; Allen, RS; Schnippenkoetter, W; Ohms, S; White, RG; Millar, AA. 2010. The miR159 regulated *GAMYB-like* genes inhibit growth and promote programmed cell death in Arabidopsis. *Plant Physiology* 154(2): 757-771.
- Alvarado-Sánchez, T; Monge-Pérez, JE. 2015. efecto de la aplicación de bioactivadores y del raleo manual de frutos sobre el rendimiento y la calidad de melón (*Cucumis melo* L.) bajo cultivo protegido en Costa Rica. *Tecnología en Marcha* 28(4): 15-25.
- Arioli, T; Mattner, SW; Winberg, PC. 2015. Applications of seaweed extracts in Australian agriculture: past, present and future. *Journal of Applied Phycology* 27: 2007-2015.
- Barrow, S. 1994. In search of *Phoenix roebelenii*: The Xishuangbanna Palm. *Principes* 38(4): 177-181.
- Begum, M; Bordoloi, BC; Singha, DV; Ojha, NJ. 2018. Role of seaweed extract on growth, yield and quality of some agricultural crops: A review. *Agricultural Reviews* 39(4): 321-326.
- Bernecker-Lücking, A; Morales-Zürcher, MI. 2002. Inventario de las macroalgas dulceacuícolas y marinas de Costa Rica. Informe final de la investigación No. 111-A0-125.
- Bhagavan, NV; Ha, CE. 2015. DNA replication, repair, and mutagenesis. In *Essentials of Medical Biochemistry* 2nd Edition. Academic Press. 401-417.
- Binenbaum, J; Weinstan, R; Shani, E. 2018. Gibberellin localization and transport in plants. *Trends in Plant Science* 25(5):410-421.
- Brahmbhatt, N; Kalasariya, H. 2015. Effect of algae on seedling growth of "Queen of Forages". *International Journal of Engineering Research and General Science* 3(2): 827-833.
- Broschat, TK; Donselman, H. 1987. Effects of fruit maturity, storage, presoaking, and seed cleaning on germination in three species of palms. *Journal of Environmental Horticulture* 5(1): 6-9.
- Bolaños, PA. 9 oct. 2017. Proyecto de bioprospección y mejora genética de ornamentales (correspondencia personal). Alajuela, Costa Rica, EEFBM.

- Carreño-Sánchez, E. 2017. Diversidad genética en especies del género *Phoenix* L. Tesis Ph.D. Orihuela, España, Universidad Miguel Hernández de Elche. 93p.
- Cherif, E; Zehdi-Azouzi, S; Crabos, A; Castillo, K; Chabrilange, N; Pintaud, JC; Salhi-Hannachi, A; Glémin, S; Aberlenc-Bertossi, F. 2016. Evolution of sex chromosomes prior to speciation in the dioecious *Phoenix* species. *Journal of Evolutionary Biology* 29: 1513-1522.
- Costa, CJ; Marchi, ECS. 2008. Germinação de sementes de palmeiras com potencial para produção de agroenergia. Planaltina, Brasil: Embrapa Cerrados.
- Calvo, P; Nelson, L; Kloepper, JW. 2014. Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant Soil* 383: 3-41.
- Carvalho, ME; Castro, PR; Novembre, AD; Chamma, HM. 2013. Seaweed extract improves the vigor and provides the rapid emergence of dry bean seeds. *American-Eurasian J. Agric & Environ Sci* 13(8): 1104-1107.
- Cheng, J; Zhang, M; Tan, B; Jiang, Y; Zheng, X; Ye, X, Guo, Z; Xiong, T; Wang, W; li, J; Feng, J. 2019. A single nucleotide mutation in *GID1c* disrupts its interaction with DELLA1 and causes a GA-insensitive dwarf phenotype in peach. *Plant Biotechnology Journal* 17: 1723-1735.
- Colombari-Matamoros, AL. 1993. Surgimiento y desarrollo de la floricultura en Costa Rica. Asociación Costarricense de Floricultores. Consultado el 28 nov. 2019. Disponible en: http://www.mag.go.cr/congreso_agronomico_ix/A01-1277-88.pdf.
- da Silva, EM; Ferreira, GF; Brussolo, D; da Silva, M; Almeida, F; Pino, LE; Pereira, LE; Carrera, E; López-Díaz, I; Silveira, FT. 2017. microRNA159-targeted *SIGMAYB* transcription factors are required for fruit set in tomato. *The Plant Journal* 92: 95-109.
- De Keyser, E; Desmet, L; Losschaert, M; De Riek, J. 2019. A general protocol for accurate gene expression analysis in plants. *In: Bassioni, R; Raso, A. eds. Quantitative Real-Time PCR. Methods in Molecular Biology* 2065. New York, Humana. 105-118.
- Dekkers, BJ; Willems, L; Bassel, GW; Bolderen-Veldkamp, RP; Ligterink, W; Hilhorst, HW; Bentsink, L. 2012. Identification of reference genes for RT-qPCR expression analysis in *Arabidopsis* and tomato seeds. *Plant & Cell Physiology* 53(1): 28-37.

- Demir, N; Dural, B; Yildirim, K. 2006. Effect of seaweed suspensions on seed germination of tomato, pepper and aubergine. *Journal of Biological Sciences* 6(6): 1130-1133.
- Dorado, G; Besnard, G; Unver, T; Hernández, P. 2019. Polymerase Chain Reaction (PCR). *In: Narayan, R. ed. Encyclopedia of Biomedical Engineering. Elsevier. 473-492.*
- Dudová, Z; Špaček, J; Havran, L; Pivoňková, H; Fojta, M. 2015. Interactions of fluorescent dye SYBR Green I with natural and 7-deazaguanine-modified DNA studied by fluorescence and electrochemical methods. *Monatshefte für Chemie* 147: 13-20.
- du, Jardin. 2015. Review: plant biostimulants: definition, concept, main categories and regulation. *Sci Hortic* 196: 3-14.
- EI-Sheekh, MM; Ismail, MM; Hamouda, MM. 2016. Influence of some brown seaweed extracts on germination and cytological responses of *Trigonella foenum-graecum* L. *BioTechnology* 12(9): 104-115.
- Ferdouse, F; Lovstad, S; Smith, R; Murúa, P; Yang, Z. 2018. The global status of seaweed production, trade and utilization. *Globefish Research Programme Volume 124: FAO. 120p.*
- Filippo-Herrera, DA; Muñoz-Ochoa, M; Hernández-Herrera, RM; Hernández-Carmona, G. 2019. Biostimulant activity of individual and blended seaweed extracts on the germination and growth of the mung bean. *Journal of Applied Phycology* 31: 2025-2037.
- Flores-Vindas, E. 2013. *La planta: estructura y función. 4ta Edición. Editorial Tecnológico de Costa Rica. 884p.*
- Fujino, K; Sekiguchi, H; Matsuda, Y; Sugimoto, K; Ono, K; Yano, M. 2008. Molecular identification of a major quantitative trait locus, *qLTG3-1*, controlling low-temperature germinability in rice. *PNAS* 105(4): 1262-12628.
- Ge, W; Steber, CM. 2018. Positive and negative regulation of seed germination by the Arabidopsis GA hormone receptors, GID1a, b, and c. *Plant Direct* 2: 1-11.
- Gillings, MR; Westoby, M. 2013. DNA technology and evolution of the central dogma. *Trends in Ecology & Evolution* 29(1): 1-2.
- Granados, J; Vodusek, Z; Barriex, A; López-Córdova, JE; Volpe, C. 2007. Costa Rica: ante un nuevo escenario en el comercio internacional. Buenos Aires: BID-INTAL. 80p.

- Godlewska, K; Michalak, I; Tuhy, L; Chojnacka, K. 2016. Plant growth biostimulants based on different methods of seaweed extraction with water. *BioMed Research International*: 5973760.
- Godínez-Hidalgo, J. 2018. Guía de exportación de plantas ornamentales a la República Popular China para PROCOMER. Tesis Lic. San José, Costa Rica, UCR. 312p.
- Gros-Balthazard, M; Newton, C; Ivorra, S; Pierre, MH; Pintaud, JC; Terral, JF. 2016. The domestication syndrome in *Phoenix dactylifera* seeds: Toward the identification of wild date palm populations. *PLoS ONE* 11(3): e0152394.
- Gupta, V; Sengupta, M; Prakash, J; Tripathy, BC. 2017. Genome Sequencing. *In: Basic and applied aspects of biotechnology*. Singapore, Springer. 125-150.
- He, H; Liang, G; Lu, S; Wang, P; Liu, T; Ma, Z; Zuo, C; Sun, X; Chen, B; Mao, J. 2019. Genome-wide identification and expression analysis of *GA2ox*, *GA3ox*, and *GA20ox* are related to gibberellin oxidase genes in grape (*Vitis vinifera* L.). *Genes* 10(9): 680.
- Hernández-Herrera, RM; Santacruz-Ruvalcaba, F; Briceño-Domínguez, DR; Filippo-Herrera, DA; Hernández-Carmona, G. 2018. Seaweed as potential plant growth stimulants for agriculture in Mexico. *Hidrobiológica* 28(1): 129-140.
- Hernández-Herrera, RM; Santacruz-Ruvalcaba, F; Ruiz-López, MA; Norrie, J; Hernández-Carmona, G. 2013. Effect of liquid seaweed extracts on growth of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of Applied Phycology* 26: 619-628. Consultado 20 mar. 2018. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10811-013-0078-4>.
- Hernderson, FM. 2006. Morphology and anatomy of palm seedlings. *The Botanical Review* 72(4): 273-329.
- Hidangmayum, A; Sharma, R. 2015. Effect of different concentration of commercial seaweed liquid extract of *Ascophyllum nodosum* on germination of onion (*Allium cepa* L.). *International Journal of Science and Research* 6(7): 1488-1491.
- Hoyle, GL; Steadman, KJ; Good, RB; McIntosh, EJ; Galea, LM; Nicotra, AB. 2015. Seed germination strategies: an evolutionary trajectory independent of vegetative functional traits. *Frontiers in Plant Science* 6: 731.
- Ionescu, IA; Møller, BL; Sánchez-Pérez, R. 2017. Chemical control of flowering time. *Journal of Experimental Botany* 68(3): 369-382.

- Iossi, E; Sader, R; Lopes-Pivetta, KF; Barbosa, JC. 2003. Substrates and temperatures on germination of *Phoenix roebelenii* O'Brien. *Revista Brasileira de Sementes* 25(2): 63-69.
- Iossi, E; Moro, FV; Sader, R. 2006. Seed anatomy and germination of *Phoenix roebelenii* O'Brien (Arecaceae). *Revista Brasileira de Sementes* 28(3): 121-128.
- Iossi, E; Sader, R; Moro, FV; Barbosa, JC. Physiological maturation of *Phoenix roebelenii* O'Brien seeds. *Revista Brasileira de Sementes* 29(1): 147-154.
- Jain, N; Vergish, S; Khurana, JP. 2018. Validation of house-keeping genes for normalization of gene expression data during diurnal/circadian studies in rice by RT-qPCR. *Scientific Reports* 8: 3203.
- Jiménez, I; González, W; Jiménez, K. 2004. Análisis económico de la producción y mercadeo de la palma *Phoenix roebelenii* (Dwarf Date Palm) en Costa Rica. *Rev Agr Trop* 34: 1-17.
- Kalendar, R; Muterko, A; Shamekova, M; Zhambakin, K. 2017. *In silico* PCR tools for a fast primer, probe, and advanced searching. *In: Domingues, L (ed). PCR Methods and Protocols*. Braga, Portugal, CEB. 1-32p.
- Kavipriya, R; Dhanalakshmi, PK; Jayashree, S; Thangaraju, N. 2011. Seaweed extract as a biostimulant for legume crop, green gram. *Journal of Ecobiotechnology* 3(8): 16-19.
- Khan, W; Rayirath, UP; Subramanian, S; Jithesh, MN; Rayorath, P; Hodges, DM; Critchley, AT; Craigie, JS; Norrie, J; Prithiviraj, B. 2009. Seaweeds extracts as biostimulants of plant growth and development. *Journal of Plant Growth Regulation* 28: 386-399.
- Li, Q; Yang, A; Zhang, WH. 2019. Higher endogenous bioactive gibberellins and α -amylase activity confer greater tolerance of rice seed germination to saline-alkaline stress. *Environmental and Experimental Botany* 162: 357-363.
- Li, Z; Gao, Y; Zhang, Y; Lin, C; Gong, D; Guan, Y; Hu; J. 2018. Reactive oxygen species and gibberellin acid mutual induction to regulate tobacco seed germination. *Frontiers in Plant Science* 9: 1279.
- Lin, Y; Elowitz, MB. 2016. Central dogma goes digital. *Molecular Cell* 61(6): 791-792.
- Ma, Z; Bykova, NV; Igamberdiev, AU. 2017. Cell signaling mechanisms and metabolic regulation of germination and dormancy in barley seeds. *The Crop Journal* 5: 459-477.

- Machakova, I; Zazimalova, E; George, EF. 2008. Plant growth regulators I: Introduction; Auxins, their analogues and antagonists. *In*: George, EF; Hall, MA; De-Klerk, G. eds. Plant propagation by tissue culture 3rd edition. Springer: Holanda. 175-204p.
- MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería). 2007a. Agrocadena del cultivo caña india (*Dracaena fragrans*). Grecia, Costa Rica. 35p.
- MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería). 2007b. Informe: Censo de plantas ornamentales 2007. San Carlos, Costa Rica. Consultado 20 ago. 2017. Disponible en: <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/E16-9290.pdf>.
- Matsuo, S; Nanya, K; Imanishi, S; Honda, I; Goto, E. 2019. Effects of blue and red lights on gibberellin metabolism in tomato seedlings. *The Horticulture Journal* 88(1): 76-82.
- Meerow, AW. 1994. Fungicide treatment of pygmy date palm seeds affects seedling emergence. *HortScience* 29(10): 1201.
- Mitchell, J; Mukhtar, NK; Skinner, I; Bassel, GW. 2018. Gibberellin response in the embryo epidermis regulates germination uniformity in response to seed priming. *bioRxiv*: 436121.
- Mora, F; Redonet, J; Blanco, L. 2007. Caracterización de la Cadena Local de Plantas Ornamentales. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Costa Rica. Consultado 23 nov. 2017. Disponible en: <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/E16-9303.pdf>.
- Narasimha, GM; Chatterjee, R. 2014. Effect of seaweed liquid fertilizer from *Gracilaria textorii* and *Hypnea musciformis* on seed germination and productivity of some vegetable crops. *Universal Journal of Plant Science* 2(7): 115-120.
- Née, G; Xiang, Y; Soppe, WJ. 2017. The release of dormancy, a wake-up call for seeds to germinate. *Current Opinion in Plant Biology* 35: 8-14.
- Nielsen, H. 2011. RNA: Methods and Protocols. Humana Press. 329p. Consultado 24 jun. 2019. Disponible en: https://doi-org.ezproxy.sibdi.ucr.ac.cr/10.1007/978-1-59745-248-9_1.
- Nong, Q; Yang, Y; Zhang, M; Zhang, M; Chen, J; Jian, S; Lu, H; Xia, K. 2019. RNA-seq-based selection of reference genes for RT-qPCR analysis of pitaya. *FEBS Open Bio* 2019. Consultado 12 feb. 2018. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12678>.

- Nonogaki, H. 2014. Seed dormancy and germination – emerging mechanisms and new hypotheses. *Frontiers in Plant Science* 5: 233.
- Olsen, JL. 2016. Polymerase Chain reaction. In Vohr, HW. ed. *Encyclopedia of Immunotoxicology*. Berlin: Springer. 715-720.
- Parlamento Europeo. 2019. Reglamento (UE) 2019/1009 del parlamento europeo y del consejo de 5 de junio de 2019 por el que se establecen disposiciones relativas a la puesta a disposición en el mercado de los productos fertilizantes UE y se modifican los Reglamentos (CE) n.º 1069/2009 y (CE) n.º 1107/2009 y se deroga el Reglamento (CE) n.º 2003/2003. *Diario Oficial de la Unión Europea* 170(1). 25 de junio.
- Pintaud, JC; Zehdi, S; Couvreur, T; Barrow, S; Henderson, S; Aberlenc-Bertossi, F; Tregear, J; Billotte, N. 2010. Species delimitation in the genus *Phoenix* (Araceae) based on SSR Markers, with emphasis on the identity of the date palm (*Phoenix dactylifera*). In: Seberg, O; Barfod, AS; Petersen, G; Davis, JI. eds. *Diversity, Phylogeny & Evolution in the Monocotyledons*. Denmark: Aarhus University Press. 267-286.
- Prakash, K; Chaudhury, R; Rohini, MR; Singh, B; Malik, SK. 2019. Contrasting seed biology of two ornamental palms: Pygmy Palm Date (*Phoenix roebelenii* O'Brien) and Fishtail Palm (*Caryota urens* L.) and implications for their long-term conservation. *Indian Journal of Traditional Knowledge* 18(3): 477-484.
- Quesada-Roldán, G; Méndez-Soto, C. 2005. Evaluación de sustratos para almácigos de hortalizas. *Agronomía Mesoamericana* 16(2): 171-183.
- Rayorath, P; Khan, W; Palanisamy, R; MacKinnon, SL; Stefanova, R; Hankins, SD; Critchley, AT; Prithviraj, B. 2008. Extracts of the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* induce gibberellic acid (GA₃)-independent amylase activity in barley. *Journal of Plant Growth Regulation* 27(4): 370-379.
- Resentini, F; Felipo-Benavent, A; Colombo, L; Blázquez, MA; Alabadí, D; Masiero, S. 2014. TCP14 and TCP15 Mediate the Promotion of Seed Germination by Gibberellins in *Arabidopsis thaliana*. *CellPress, Molecular Plant* 8(3): 482-485.
- Ribeiro, S; Nogueira, M; Carvalho, L; Milech, C; Moraes, A; Bianchi, VJ; Bolacel, EJ. 2018. Validation of reference genes for RT-qPCR studies in *Stevia rebaudiana* in response to elicitor agents. *Physiol Mol Biol Plants* 24: 767.

- Saborío, F. 2002. Bioestimulantes en fertilización foliar. *In*: Meléndez, G; Molina, E. eds. Fertilización foliar: Principios y aplicaciones. San José: Universidad de Costa Rica. 107-124.
- Salazar, W. 2016. Efecto de la aplicación foliar de fertilizantes y extracto de algas en pepino (*Cucumis sativus* L.) y chile dulce (*Capsicum annuum* L.) cultivados bajo ambiente protegido en Alajuela, Costa Rica. Tesis Lic. San José, Costa Rica, UCR. 56p.
- Santaniello, A; Scartazza, A; Gresta, F; Loreti, E; Biasone, A; Tommaso, D; Piagessi, A; Perata, P. 2017. *Ascophyllum nodosum* seaweed extract alleviates drought stress in *Arabidopsis* by affecting photosynthetic performance and related gene expression. *Frontier in Plant Science* 8: 1362.
- Sasikala, M; Indumathi, E; Radhika, S; Sasireka, R. 2016. Effect of seaweed extract (*Sargassum tenerrimum*) on seed germination and growth of tomato plant (*Solanum lycopersicum*). *International Journal of ChemTech Research* 9(9): 285-293.
- Sghaier-Hammami, B; Valledor, L; Drira, N; Jorrin-Novo, JV. 2009. Proteomic analysis of the development and germination of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) zygotic embryos. *Proteomics* 9: 2543-2554.
- Sharma, SH; Lyons, G; McRoberts, C; McCall, D; Carmichael, E; Andrews, F; Swan, R; McCormack, R; Mellon, R. 2012. Biostimulant activity of brown seaweed species from Strangford Lough: compositional analyses of polysaccharides and bioassay of extracts using mung bean (*Vigna mungo* L.) and pak choi (*Brassica rapa chinensis* L.). *J Appl Phycol* 24: 1081-1091.
- Sharma, SH; Selby, C; Carmichael, E; McRoberts, C; Rao, JR; Ambrosino, P; Chiurazzi, M; Pucci, M; Martin, T. 2016. Physicochemical analyses of plant biostimulant formulations and characterization of commercial products by instrumental techniques. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 3: 13.
- Shi, H; Bressan, R. 2006. RNA Extraction. *In*: Salinas, J; Sánchez-Serrano, JJ. eds. *Arabidopsis Protocols. Methods in Molecular Biology* 323: 345-348.
- Shu, K; Liu, XD; Xie, Q; He, ZH. 2016. Two faces of one seed: Hormonal regulation of dormancy and germination. *Molecular Plant* 9: 34-45.

- Siles, L; Alegre, L; González-Solís, A; Cahoon, EB; Munné-Bosch, S. 2018. Transcriptional regulation of vitamin E biosynthesis during germination of dwarf fan palm seeds. *Plant and Cell Physiology* 59(12): 2490-2501.
- Simura, J; Antoniadi, I; Široká, J; Tarkowská, D; Strnad, M; Ljung, K; Novák, O. 2018. Plant hormonomics: Multiple phytohormone profiling by targeted metabolomics. *Plant Physiology* 177: 476-489.
- Song, Q; Cheng, S; Chen, Z; Nie, G; Xu, F; Zhang, J; Zhou, M; Zhang, W; Liao, Y, Ye, J. 2019. Comparative transcriptome analysis revealing the potential mechanism of seed germination stimulated by exogenous gibberellin in *Fraxinus hupehensis*. *BMC Plant Biology* 19:199.
- Souza-Dias, D; Monteiro-Ribeiro, L; Nascimento-Lopes, PS; Munné-Bosch, S; Souza-Garcia, Q. 2017. Hormonal profile and the role of cell expansion in the germination control of Cerrado biome palm seeds. *Plant Physiology and Biochemistry* 118: 168-177.
- Strydhorst, S; Hall, L; Perrott, L. 2018. Plant growth regulators: What agronomists need to know. *Crops & Soils* 51: 22-26.
- Taiz, L; Zeiger, E; Møller, IM; Murphy, A. 2015. *Plant physiology and development*, Sixth edition. Sinauer Associates Inc. 731p.
- Tang, S; Li, L; Zhou, QY; Liu, WZ; Zhang, HX; Chen, WZ; Ding, YF. 2019. Expression of wheat gibberellins 2-oxidase gene induced dwarf or semi-dwarf phenotype in rice. *Cereal Research Communications* 47(2): 239-249.
- Tuan, PA; Kumar, R; Rehal, PK; Toora, PK; Ayelee, BT. 2018. Molecular mechanisms underlying abscisic acid/gibberellin balance in the control of seed dormancy and germination in cereals. *Frontiers in Plant Science* 9: 668.
- Villegas-Rojas, M. 2016. Informe de vigilancia tecnológica sobre *Xylella fastidiosa*. Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. 30p.
- Vishal, B; Kumar, PP. 2018. Regulation of seed germination and abiotic stresses by gibberellins and abscisic acid. *Frontiers in Plant Science* 9.
- Wang, X; Zhao, BS; Roundtreem, IA; Lu, Z; Han, D; Ma, H; Weng, X; Chen, K; Shi, H; He, C. 2015. N6-methyladenosine Modulates Messenger RNA Translation Efficiency. *Cell* 161: 1388-1399.

- Wojtyla, L; Lechowska, K; Kubala, S; Garnczarska, M. 2016. Different modes of hydrogen peroxide action during seed germination. *Frontiers in Plant Science* 7: 66.
- Wolters, H; Jürgens, G. 2009. Survival of the flexible: hormonal growth control and adaptation in plant development. *Nature Reviews Genetics* 10: 305-317.
- Yan, D; Easwaran, V; Chau, V; Okamoto, M; Ierullo, M; Kimura, M; Endo, A; Yano, R; Pasha, A; Gong, Y; Bi, YM; Provar, N; Guttman, D; Krapp, A; Rothstein, SJ; Nambara, E. 2016. NIN-like protein 8 is a master regulator of nitrate-promoted seed germination in *Arabidopsis*. *Nature Communications* 7: 13179.
- Yeap, WC; Loo, JM; Wong, JC; Kulaveerasingam, H. 2014. Evaluation of suitable reference genes for qRT-PCR gene expression normalization in reproductive, vegetative tissues and during fruit development in oil palm. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 116: 55-66.
- Zheng, Z. 2018. The miR159-*GAMYB* pathway: silencing and function of *GAMYB* homologues amongst diverse plant species. Tesis Ph.D. The Australian National University. 189p.
- Zodape, ST; Mukhopadhyay, S; Eswaran, K; Reddy, MP; Chikara, J. 2010. Enhanced yield and nutritional quality in green gram (*Phaseolus radiata* L) treated with seaweed (*Kappaphycus alvarezii*) extract. *Journal of Scientific and Industrial Research* 69: 468-471.

Anexos

Anexo I. Procedimiento de extracción de ARN en semillas de *Phoenix roebelenii* con base al protocolo del kit ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System

1. Mezclar 20 µL de 1-tioglicerol por mL de buffer LBA, y agregar 500µL de la mezcla a un tubo Eppendorf de 1.5 mL.
2. Agregar 20 mg de la muestra preparada al tubo y pipetear diez veces
3. Centrifugar a 14000 ×g por tres minutos y transferir sobrenadante a un tubo Eppendorf de 1.5 mL
4. Agregar 170 µL de isopropanol 100% al sobrenadante y vortex por cinco segundos
5. Transferir el sobrenadante a una columna 'ReliaPrep™ Minicolumn' sobre un 'Collection Tube'
6. Centrifugar a 14000 ×g por un minuto a 20-25°C, hasta que todo el líquido pase por la columna
7. Descartar el líquido recolectado en el 'Collection Tube'
8. Agregar a la columna 500 µL de 'RNA Wash Solution' previamente diluido en etanol al 95%
9. Centrifugar a 14000 ×g por 30 segundos, y descartar el líquido en el 'Collection Tube'
10. Preparar la mezcla de DNase I con 24 µL de 'Yellow Core Buffer', 3 µL de 0.09 M de MnCl₂ y 3 µL de la enzima DNase I
11. Aplicar 30 µL de la mezcla de DNase I por muestra e incubar a temperatura ambiente por 15 minutos
12. Agregar 200 µL de 'Column Wash Solution' y centrifugar a 14000 ×g por 15 segundos
13. Agregar 500 µL de 'RNA Wash Solution' y centrifugar a 14000 ×g por 30 segundos
14. Descartar el líquido en el 'Collection Tube'
15. Agregar 300 µL de 'RNA Wash Solution' y centrifugar a 14000 ×g por dos minutos
16. Transferir columna a 'Elution Tube'
17. Agregar 30 µL de agua libre de nucleasas y centrifugar a 14000 ×g por un minuto
18. Almacenar muestras de ARN a -70°C

Anexo II. Procedimiento de retrotranscripción de muestras de ARN de *Phoenix roebelenii* con base al protocolo del kit Access RT-PCR System de Promega®

1. Preparar por muestra 48 μ L de la mezcla 'Master Mix' con
 - 10 μ L de 'AMV/*Tfl* 5X reaction Buffer'
 - 1 μ L de 'dNTP Mix'
 - 1 μ L de imprimador F a 25 μ M
 - 1 μ L de imprimador R a 25 μ M
 - 2 μ L de 25 mM de $MgSO_4$
 - 1 μ L de 'AMV Reverse Transcriptase'
 - 1 μ L de '*Tfl* DNA Polymerase'
 - 31 μ L de agua libre de nucleasas
2. Pipetear el 'Master Mix' diez veces
3. Colocar tubo de 0.5 mL de pared delgada en una rejilla con hielo y agregar 48 μ L de 'Master Mix'
4. Agregar 2 μ L de ARN al tubo de 0.5 mL, para un volumen total de 50 μ L
5. Colocar tubos en un termociclador y utilizar los siguientes perfiles térmicos.

Etapa	Ciclo(s)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Transcripción reversa	1	45	45
Inactivación de retrotranscripción	1	94	2
Amplificación	40	94 60 68	0.5 1 2
Extensión	1	68	7
Remojo	1	4	n/a

6. Almacenar las muestras de cDNA a -70°C

Anexo III. Procedimiento de PCR cuantitativo en muestras de cDNA de *Phoenix roebelenii* con base al protocolo del kit GoTaq® qPCR Master Mix de Promega®.

1. Diluir imprimadores a una concentración de 18 μ M
2. Colocar tubos de 20 μ L por cada muestra en rejillas con hielo
3. Agregar 10 μ L de 'GoTaq® qPCR Master Mix' por tubo
4. Agregar 1 μ L de imprimador F y 1 μ L de imprimador R
5. Agregar 2 μ L de agua libre de nucleasas
6. Agregar 4 μ L de cDNA, para un volumen total de 20 μ L
7. Centrifugar componentes a baja velocidad por un minuto
8. Transferir tubos a termociclador y utilizar los siguientes perfiles térmicos

Etapas	Ciclo(s)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Activación	1	95	2
Desnaturalización Extensión	40	95 60	0.25 1
Disociación	1	72	n/a

Anexo IV. Germinación de cuatro semillas de *Phoenix roebelenii* sembradas en bandejas plásticas de 32 celdas.

