



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Análisis fisiológico, bioquímico y molecular del
desarrollo y maduración del embrión somático de
*Musa***

Adrián José Enríquez Valencia

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2019

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis del M.C. Adrian José Enriquez Valencia titulado “Análisis fisiológicos, bioquímicos y moleculares de la maduración del embrión somático de *Musa*”, fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección de la Dra. Rosa María Escobedo Gracia-Medrano, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente.

Dra. Clelia de la Peña Seaman

Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, 01 de febrero del 2019

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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

Firma: _____

Nombre: M. en C. Adrián José Enríquez Valencia

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, Titulado “Análisis fisiológico, bioquímico y molecular del desarrollo y maduración del embrión somático de *Musa*” bajo la dirección del Dra. Rosa María Escobedo Gracia-Medrano.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al CICY por darme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado a lo largo de estos años, agradezco de manera especial a la unidad de Bioquímica y Biología Molecular de plantas (UBBMP) por haberme proporcionado las instalaciones para el desarrollo del trabajo de investigación.

Al CONACYT por la beca otorgada No. 378177.

De manera especial agradezco a la Dra. Rosa María Escobedo Gracia-Medrano por haberme brindado la oportunidad de realizar el trabajo de investigación en su grupo de trabajo, de igual manera por darme su apoyo a lo largo de estos años y en los cuales tuvo mucha paciencia y confianza en mí.

Al comité tutorial conformado por la Dra. Rosa María Escobedo Gracia-Medrano, Dra. Elizabeth Ortiz Vázquez, Dr. Felipe Vázquez Flota, Dr. Santy Peraza Echeverria por sus observaciones durante mi formación académica.

Al comité evaluador para la obtención del grado constituido por la Dra. Rosa María Escobedo Gracia-Medrano, Dra. Elizabeth Ortiz Vázquez, Dr. Felipe Vázquez Flota, Dr. Santy Peraza Echeverria, Dr. Gregorio Godoy Hernández, Dr. Víctor Manuel Aguilar Hernández, Dr. Luis Alfonso Sáenz Carbonell.

Al Dr. Enrique Ibarra Laclette por brindarme su apoyo y consejos a lo largo del proceso de análisis bioinformático de datos.

Al M. en C. Emanuel Villafan de la Torre por el apoyo con los programas para el análisis del transcriptoma.

Al técnico M. en C. José Roberto Ku Cauich por su apoyo durante el proceso de embriogénesis somática, colecta de material en campo, mantenimiento de las líneas celulares y todos los experimentos realizados a lo largo del proyecto.

A la técnica M. en C. Lucila Aurelia Sánchez Cach por el apoyo proporcionado durante los experimentos realizados para el análisis de proteínas.

A la técnica M. en C. Rosa María Galaz Ávalos por su apoyo en la realización de los experimentos para el análisis de parámetros bioquímicos.

A la técnica M. en C. Miriam del Socorro Monforte González por el apoyo brindado para la preparación de muestras para enviar a secuenciación.

A mis amigos de laboratorio 22, Maharshi, Guadalupe, los cuales hicieron ameno mi estancia en el laboratorio

A mis compañeros del CICY por su amistad brindada durante todo este tiempo.

A mis amigos del INECOL, Yoselin, Josué y Anahí por hacer amena mi estancia.

DEDICATORIAS

A Dios por darme fortaleza durante esta travesía, el cual fue un camino difícil, pero sin embargo me dio la fuerza para poder acabar. Por brindarme la luz a lo largo de mi vida y enseñarme el buen camino.

A la Dr. Rosa Maria Escobedo G-M por darme todas las herramientas para poder seguir mi propio camino, por tenerme mucha paciencia a pesar de todo mis retrasos, pero sobre todo por apoyarme en todo momento a lo largo de este camino.

A mi esposa Yamily Yazmin Burgos Canul por tenerme paciencia durante este camino, darme todo el amor durante las noches y darme fuerza para sacar adelante mi trabajo, te dedico esta tesis con todo el corazón y gracias por todo el apoyo incondicional. Por último, agradezco por darme la excelente noticia que seremos padres de una hermosa bebe, por lo que a mi angelito en camino solo te puedo decir que te esperamos con ansias.

A mi madre, por darme amor y enseñarme los valores los cuales me han permitido alcanzar mi meta, gracias por darme todo el cariño durante esta etapa, te quiero mucho Mamá.

A mi papá por animarme a lo largo de estos años, por enseñarme los valores y sobre todo por estar conmigo incondicionalmente.

A mi hermana por escucharme, por darme ánimos, consejos, cariño y sobre todo su apoyo a lo largo de este camino, gracias Dianey por estar conmigo.

A mis suegros por brindarme sus consejos y el apoyo a lo largo de este camino, de igual manera a mi cuñadas y cuñado.

ÍNDICE

INTRODUCCION	1
CAPÍTULO I	5
ANTECEDENTES	5
1. GÉNERO <i>MUSA</i>	5
1.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL GÉNERO <i>MUSA</i>	6
1.2. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE <i>MUSA</i>	6
1.3. PRODUCCIÓN MUNDIAL DE BANANO.....	7
1.4. ENFERMEDADES DEL BANANO.....	9
1.5. PROPAGACIÓN IN VITRO Y REGENERACIÓN DE ESPECIES VEGETALES	10
1.5.1. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA	10
1.5.2. MADURACIÓN DEL EMBRIÓN SOMÁTICO.....	13
1.6. GENES EXPRESADOS DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS Y DESARROLLO/MADURACIÓN DEL EMBRION SOMÁTICO EN CULTIVO <i>IN VITRO</i>	16
1.7. TRANSCRIPTÓMICA EN PLANTAS.....	20
1.8. RNA-SEQ	22
HIPÓTESIS	26
OBJETIVO GENERAL	26
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	27

BIBLIOGRAFÍA.....	28
CAPITULO II	37
EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE <i>MUSA</i> SSP CV. MANZANO (AAB, SUBGRUPO SILK)..	37
2.1. INTRODUCCION	37
2.2. MATERIALES Y METODOS	38
2.2.1. INDUCCIÓN DE CALLO EMBRIOGÉNICO A PARTIR DE FLORALES MASCULINAS INMADURAS, PROLIFERACIÓN DEL CALLO E INDUCCIÓN DE SUSPENSIONES CELULARES.....	38
2.2.2. MADURACIÓN DE ES	39
2.3. GERMINACIÓN DE ES MADUROS.....	39
2.3. RESULTADOS.....	40
2.3.1. INDUCCIÓN DE CALLO A PARTIR FLORALES MASCULINAS INMADURAS DE <i>MUSA</i> SPP. AAB CV. MANZANO.....	40
2.3.2. EXPERIMENTO DE MADURACIÓN DEL EMBRIÓN SOMÁTICO	42
2.3.3. GERMINACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS	48
2.4 DISCUSIÓN	49
BIBLIOGRAFIA.....	52
CAPITULO III	55
CAMBIOS FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS EN EL EMBRIÓN SOMÁTICO DE BANANO CV. MANZANO (AAB, SUPGRUPO SILK) DURANTE SU PROCESO DE DESARROLLO-MADURACIÓN.....	55
3.1. INTRODUCCIÓN	55
3.2. MATERIALES Y METODOS	56

3.2.1. DETERMINACIÓN DE CONTENIDO DE AGUA Y PORCENTAJE DE PESO SECO (PS) EMBRIONES SOMÁTICOS DE PLÁTANO CV. MANZANO.	56
3.2.2. EXTRACCIÓN DE CARBOHIDRATOS TOTALES Y ALMIDÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS.....	56
3.2.3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS SOLUBLES Y ALMIDÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS.....	57
3.2.4. DETERMINACIÓN DE PERFILES DE CARBOHIDRATOS EN EMBRIONES SOMÁTICOS DE <i>MUSA</i>	58
3.2.5. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ABCÍSICO (ABA) EN DIFERENTES ESTADIOS DEL EMBRIÓN SOMÁTICO.....	58
3.2.6. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS SOLUBLES DE EMBRIONES SOMÁTICOS	59
3.2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	60
3. RESULTADOS	60
3.3.1. CONTENIDO DE AGUA Y PORCENTAJE DE PS DE ES DURANTE SU DESARROLLO-MADURACIÓN.....	60
3.3.2. NIVELES DE CARBOHIDRATOS SOLUBLES TOTALES Y ALMIDÓN, Y PERFILES DE CARBOHIDRATOS DE EMBRIONES SOMÁTICOS	63
3.3.3. NIVELES DE ABA EN EMBRIONES SOMÁTICOS EN DESARROLLO	67
3.3.4. NIVELES DE PROTEÍNAS TOTALES DURANTE LA MADURACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS	68
3.4 DISCUSIÓN.....	69
BIBLIOGRAFIA.....	75
CAPITULO IV.....	79
ANALISIS DEL TRANSCRIPTOMA DURANTE LA MADURACION DE EMBRIONES	

SOMÁTICOS DE BANANO	79
4.1. INTRODUCCION	79
4.2. MATERIALES Y METODOS	79
4.2.1. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL	79
4.2.2. ANÁLISIS DEL ARN TOTAL EN GEL DE AGAROSA	80
4.2.3. ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN DEL ARN TOTAL	81
4.2.4. TRATAMIENTO CON DNASA Y PURIFICACIÓN DEL ARN	81
4.2.5. SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN USANDO LA PLATAFORMA ILLUMINA	82
4.2.6. ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA	82
4.2.6.1. ANÁLISIS DE CALIDAD Y FILTRADO DE LAS SECUENCIAS CRUDAS	82
4.2.6.2. ENSAMBLADO DE LAS SECUENCIAS CON TRINITY	83
4.2.6.3. IDENTIFICACIÓN DE ORFs Y CDS (SECUENCIAS CODIFICANTES)	83
4.2.6.3. ANOTACIÓN DE UNIGENES.	84
4.2.6.4. CATEGORIZACIÓN ONTOGÉNICA DE UNIGENES DE LA MADURACIÓN DEL EMBRIÓN SOMÁTICO DE CV. MANZANO	84
4.2.6.5. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES IMPLICADOS EN EL TRANSCRIPTOMA DEL EMBRIÓN SOMÁTICO	85
4.2.6.6. VALIDACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL DURANTE LA MADURACIÓN DEL EMBRIÓN SOMÁTICO.....	85
4.3. RESULTADOS.....	87
4.3.1 EXTRACCIÓN DE ARN DE LOS EMBRIONES SOMÁTICOS.....	87

4.3.2 ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA	88
4.3.2.1. ANÁLISIS DE LA CALIDAD, FILTRADO Y ENSAMBLADO DE LAS SECUENCIAS.....	88
4.3.2.2. ANOTACIÓN FUNCIONAL Y CLASIFICACIÓN DE ONTOLOGÍA DE GENES (GO) DE LOS UNIGENES.	90
4.3.2.3. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL EN ESTADIOS DE MADURACIÓN DEL EMBRIÓN SOMÁTICO DE <i>MUSA</i> CV. MANZANO.....	93
4.3.2.4. VALIDACIÓN DE GENES DEL TRANSCRIPTOMA POR REAL-TIME PCR (QPCR)	100
4.4 DISCUSIÓN	101
BIBLIOGRAFIA.....	105
Capítulo V	111
5.1 CONCLUSIONES	111
5.2. PERSPECTIVAS	112

LISTADO DE FIGURA

Figura 1.1.- Distribución geográfica de las secciones de <i>Musa</i>	5
Figura 1.2.- Morfología de <i>Musa</i>	7
Figura 1.3.- Proceso de embriogénesis somática.....	12
Figura 1.4.- Mecanismo de interacción de los genes involucrados en la embriogénesis somática en <i>Arabidopsis thaliana</i>	18
Figura 1.5.- Estrategia experimental.	27
Figura 2.1.- Formación de diferentes tipos de callo a partir de flores masculinas inmaduras inducidas en medio MA1.....	40
Figura 2.2.- Callos embriogénicos obtenidos a partir de la inducción de flores masculinas inmaduras cv. Manzano.....	41
Figura 2.3.- Suspensiones embriogénicas de <i>Musa</i> spp. cv. Manzano.	42
Figura 2.4.- Maduración de embriones somáticos de manzano expuestos a dos tratamientos.....	43
Figura 2.5.- Embriones somáticos a 60 días de maduración bajo dos tratamientos de maduración.....	43
Figura 2.6.- Maduración de embriones somáticos, de plátano cv. Manzano, expuestos a dos tratamientos.	44
Figura 2.7.- Porcentaje de embriones somáticos inmaduros y maduros de plátano del cv. Manzano desarrollados bajo dos tratamientos (MM1 y MM2).	46
Figura 2.8.- Estadios de desarrollo del embrión somático <i>Musa</i> spp. AAB cv. Manzano.	47
Figura 2.9.- Estadios de desarrollo del embrión de Manzano observado a través del microscopio electrónico de barrido.....	48

Figura 2.10.- Tasa de germinación de embriones somáticos del cv. Manzano.....	49
Figura 3.1.- Contenido de agua de embriones somáticos en estadios globular (Glo), Pera, Coleoptilar temprano (CTem) y coleoptilar tardío (CTar), colectados a los 90 y 120 días de cultivo, los medios de maduración MM1 y MM2.....	61
Figura 3.2.- Porcentaje de peso seco (%PS) de embriones somáticos, globular (Glo), Pera, Coleoptilar temprano (CTem) y coleoptilar tardío (CTar) colectados a los 90 y 120 días, en los medios de maduración MM1 y MM2.....	62
Figura 3.3.- Contenido carbohidratos solubles totales de embriones somáticos, globular (Glo), Pera, Coleoptilar temprano (CTem) y coleoptilar tardío (CTar) colectados a los 90 y 120 días, en los medios de maduración MM1 y MM2	63
Figura 3.4.- Contenido de almidón de embriones somáticos, globular (Glo), Pera, Coleoptilar temprano (CTem) y coleoptilar tardío (CTar) colectados a los 90 y 120 días, que se desarrollaron en el medio de maduración MM1 y MM2.	64
Figura 3.5.- Niveles de carbohidratos solubles en embriones somáticos, globular (Glo), Pera, Coleoptilar temprano (CTem) y coleoptilar tardío (CTar) colectados a los 90 y 120 días, que se desarrollaron en el medio de maduración MM1.	66
Figura 3.6.- Niveles de carbohidratos solubles en embriones somáticos, globular (Glo), Pera, Coleoptilar temprano (CTem) y coleoptilar tardío (CTar) colectados a los 90 y 120 días, en el medio de maduración MM2.	67
Figura 3.7.- Niveles de ácido abscísico (ABA) en cuatro estadios de maduración del embrión somático bajo los tratamientos MM1 y MM2.....	68
Figura 3.8.- Niveles de proteínas totales en cuatro estadios de maduración del embrión somático durante un curso temporal de 90 días en los tratamientos MM1 y MM2.	69
Figura 4.1.- A) Electroforesis en gel de agarosa de los extractos de ARN 1% teñido con bromuro de etidio de los embriones globular (1, 2), tipo pera (3, 4), embrión CTEM (5, 6), embrión CTar ₉₀ (7, 8). B) Electroferograma del ARN de embriones tipo globular.....	88

Figura 4.2.- Distribución de tamaño de unigenes expresado en embriones somáticos de <i>Musa</i> en diferentes estados de desarrollo.....	90
Figura 4.3.- Anotación funcional del transcriptoma de Manzano usando nueve genomas como referencia empleando el algoritmo de BLASTp.	91
Figura 4.4.- Anotación funcional de los unigenes del transcriptoma de <i>Musa</i> cv. Manzano bajo las tres categorías de GO.	92
Fig 4.5.- Reconstrucción del mapa metabólico del transcriptoma de <i>Musa</i> cv. Manzano a través de la base de datos del KEGG.	93
Figura 4.6.- Genes expresados presentes en cuatro estadios de desarrollo del embrión somático de <i>Musa</i> cv. Manzano.....	94
Figura 4.7.- MA plot y Volcano plot de genes expresados diferencialmente entre el estadio globular y pera. logFC (logaritmo del valor de cambio (fold change)), logCounts (logaritmo del número de cuentas o lecturas).	95
Figura 4.8.- Mapa de calor de los perfiles de expresión de cuatro estadios de maduración del embrión somático de <i>Musa</i> cv. Mazano.	96
Figura 4.9.- Unigenes expresados diferencialmente asociados a las categorías del GO en 4 estadios de maduración el embrión somático.	99
Figura 4.10.- Expresión relativa de genes candidatos validados por tiempo real (qPCR) del transcriptoma de cv. Manzano.	101

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1.- Principales estados productores de banano y plátano en México.....	8
Cuadro 1.2. Genes identificados durante el desarrollo/maduración de ES en plantas.....	19
Cuadro 4.1.- Genes candidatos para la validación del transcriptoma de la maduración del embrión somático del cv. Manzano.....	86
Cuadro 4.1.- Contenido pureza (Cociente A260/280) del ARN extraído de cuatro estadios de maduración.....	87
Cuadro 4.2- Lecturas generadas por secuenciación del ARN obtenido de embriones somáticos de Musa en diferentes estados de desarrollo.....	89
Cuadro 4.3.- Genes expresados diferencialmente en embriones somáticos de Musa cv. Manzano durante el proceso de maduración	97

ABREVIATURAS

ABA: Acido abscisión

BO: Blanco-opaco

BT: Blanco-traslúcido

CE: Callo embriogénico

ES: Embrión somático

M.a x M.b: Musa acuminata x Musa balbisiana

PF: Peso fresco

PS: Peso seco

PVC: Paquete de volumen celular

UE: Unidades experimentales

RFO's: Rafino-oligosacáridos

AIA: Ácido indolacético

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

CTem: Coleoptilar temprano

CTem₆₀: Coleoptilar temprano de 60 días

CTem₉₀: Coleoptilar tardío de 90 días

CTem₁₂₀: Coleoptilar tardío de 120 días

LEC1: Leafy cotyledon 1

LEC2: Leafy cotyledon 2

BBM: Baby boom

TAR2: Triptófano aminotransferasa

RESUMEN

La embriogénesis somática es un proceso mediante el cual una célula o grupos de células somáticas es inducida a formar un embrión somático (ES) que se desarrolla en una nueva planta. Al igual que en otras especies, en *Musa* spp. la maduración del embrión es un paso limitante de los protocolos de embriogénesis existentes. En este trabajo desarrollamos y optimizamos un protocolo de embriogénesis somática indirecta de plátano *Musa* spp. (AAB) cv. Manzano, logrando tasas del 95% germinación de los ES y 100% de conversión a planta. Utilizando dicho modelo, investigamos el cómo se modula la pérdida de agua, la ganancia de biomasa, la acumulación de reservas de carbohidratos solubles, almidón, proteínas, y el ácido abscísico ABA durante el desarrollo y la maduración del embrión. Para identificar las características moleculares involucradas en el desarrollo y la maduración del ES, se generó (Illumina-RNAseq) y ensambló el transcriptoma de 4 estadios de desarrollo por los que transita el ES, identificándose por genómica comparativa un total de 87,556 unigenes, de estos se encontraron expresados diferencialmente 1,468 genes entre los estadios globular (Glo) y tipo pera (TP), 925 genes entre los estadios TP y coleoptilar temprano (CTem), 2,120 entre el CTem y coleoptilar tardío (CTar), y 5,080 entre el estadio CTar y Glo. Los análisis por tiempo real (RT-PCR) confirmaron la expresión de genes relacionados a factores de transcripción, a la ruta de síntesis de oligosacáridos (rafinosa sintasa y estaquiosa sintasa) y a síntesis de auxinas (triptófano aminotransferasa 2 (TAR2)). Nuestros datos sugieren que el estrés osmótico debido al aumento en la concentración de gelificante en el medio de cultivo induce la expresión de genes relacionados al desarrollo y maduración del embrión somático. Los resultados de este trabajo de investigación proporcionan un panorama acerca de los mecanismos implicados en la maduración del embrión somático, información de utilidad para generar nuevas estrategias en sistemas de mejoramiento biotecnológico en *Musa*.

ABSTRACT

Somatic embryogenesis is a process by which single somatic cells or groups of somatic cells can be induced experimentally to form somatic embryos (SEs), which can develop into new plantlets. In *Musa* spp., as in other species, the maturation of the SEs is a limiting step of the existing embryogenesis protocols. In this work, we developed and optimized a protocol of indirect somatic embryogenesis in banana, *Musa* spp. (AAB) cv. Manzano, achieving rates of 95% germination of the SE and 100% plant conversion. Using this model, we investigate the water loss, biomass gain, and the accumulation of soluble carbohydrate reserves, starch, proteins, and abscisic acid (ABA) modulation during the development and maturation of the SEs. To identify the molecular characteristics involved in the growth and maturation of ESs, we generated (Illumina-RNAseq) and assembled a transcriptome of the four stages of development throughout which the SEs passes. A total of 87,556 unigenes were identified by comparative genomics, of these 1,468 genes were differentially expressed between the globular (Glo) and pear (TP) stages, 925 genes between the early stages of PT and coleoptilar (CTem), 2,120 between the CTem and late coleoptilar (CTar), and 5,080 between the CTar stage and Glo. Real-time analyzes (RT-PCR) confirmed the expression of genes related to transcription factors, and enzymes of the oligosaccharide (raffinose synthase and stachyose synthase) and auxin (tryptophan aminotransferase 2 (TAR2)) biosynthetic pathways. Our data suggest that the osmotic stress caused by the increase in the concentration of gelling agent in the culture medium, induces the expression of genes linked to the development and maturation of the somatic embryo. The results of this research provide an overview of the mechanisms involved in the maturation of the somatic embryo; this information can be used to design new strategies for banana genetic improvement.

INTRODUCCION

El plátano (*Musa* spp.) es un frutal de gran importancia a nivel mundial, que es afectado por diversas adversidades bióticas (patógenos) y abióticas que generan grandes pérdidas económicas al cultivo. Su mejoramiento genético es un foco de atención con el fin de obtener variedades resistentes a plagas y enfermedades causadas por patógenos, y a diversos tipos de estrés abiótico. Sin embargo, su mejoramiento se ha visto limitado dada la naturaleza poliploide, la partenocarpia y la esterilidad parcial o total de la mayoría de las variedades cultivadas; asociado a ello, la propagación vegetativa del plátano, mediante hijuelos, puede ser un factor limitante para la obtención de semilla agronómica libre de patógenos.

En plátano, la embriogénesis somática (ES) es una valiosa herramienta para la multiplicación masiva de plantas libres de patógenos, y para su mejoramiento biotecnológico mediante mutagénesis y transformación genética. No obstante, la maduración del embrión somático representa un paso limitante de los protocolos de ES indirecta (ESI) existentes. En este sentido en el presente trabajo, primero nos avocamos a desarrollar y optimizar el protocolo de ESI de plátano *Musa* spp. (AAB) cv. Manzano, y en segundo lugar se utilizó la ES como modelo para estudiar el proceso de desarrollo y maduración del embrión somático con el objetivo de identificar marcadores fisiológicos (perdida de agua y ganancia de biomasa), bioquímicos (acumulación de carbohidratos solubles, almidón, proteínas y ácido abscísico) y moleculares (Secuenciación masiva, RNA-seq) de dicho proceso biológico.

En la presente tesis el capítulo 2 describe el desarrollo del protocolo de ESI a partir de flores masculinas inmaduras del cv. Manzano, y la optimización de dicho protocolo para obtener altas tasas de germinación y conversión a planta de los embriones somáticos derivados de suspensiones embriogénicas. Para ello, probamos la hipótesis de que el estrés osmótico inducido experimentalmente (uso de diferentes concentraciones de gelificante en el medio) sobre las células embriogénicas y pro-embriones promueve el correcto desarrollo y maduración del embrión, evitando la proliferación de masivos embriogénicos y embriogénesis secundaria sobre los embriones. Para ello partiendo de suspensiones embriogénicas, el desarrollo y la maduración del embrión se dio en ausencia de reguladores

de crecimiento (RG) en un medio semi-sólido bajo dos concentraciones de gelificante (0.2 y 0.3% p/v), tratamiento MM1 y MM2, respectivamente. El desarrollo del embrión se monitoreo desde la inoculación de la suspensión en el medio MM1 y MM2 de maduración, tiempo 0, hasta 120 días del desarrollo en el mismo medio. Se identificaron cuatro estadios del embrión, globular (Glo), tipo pera (TP), coleoptilar temprano (CTemp) y tardío (CTar). Como resultado, de evaluar el efecto del gelificante del medio sobre la maduración de los embriones somáticos, encontramos que el tratamiento MM2 fue el más adecuado para la maduración y para lograr una mayor tasa de germinación (95%) de los embriones del estadio CTar, a los 90 y 120 días de maduración, sin embargo, para los embriones CTar de 120 días de maduración en el tratamiento MM1, el porcentaje disminuyó significativamente (72%), resultados publicados Enríquez-Valencia *et al.* (2018).

El capítulo 3 describe los resultados de evaluar aspectos fisiológicos y bioquímicos de los embriones durante los estadios de desarrollo (Glo y TP) y maduración (CTem y CTar). El análisis de resultados mostró que bajo el tratamiento MM2 (0.3% de gelificante) se logra una mayor ganancia de biomasa (mayor peso seco), una más temprana desecación (perdida de agua) del embrión maduro (CTar), una mayor acumulación de compuestos de reserva (carbohidratos solubles, almidón y proteínas) y de ABA (en estadio pera y coleoptilar temprano y tardío) en comparación con el tratamiento MM1, los datos anteriores aportaron evidencias sobre el papel del estrés osmótico, promovido por la concentración de gelificante en el medio, durante la maduración del embrión somático.

El capítulo 4 presenta evidencias de la generación y ensamblado del transcriptoma de cuatro estadios de desarrollo del embrión somático del cv. Manzano, usando un enfoque de secuenciación por RNAseq. El transcriptoma de los cuatro estadios incluye un total de 465,643 unigenes, estos fueron anotados mediante genómica comparativa con ayuda de nueve genomas de referencia, identificándose un total del 87,556 unigenes con alguna función putativa. El análisis bioinformático mostró la expresión diferencial de 1,468 genes entre los estadios Glo y TP, 925 genes entre los estadios TP y CTem, 2,120 entre el CTem y CTar, y por último se identificaron 5,080 genes expresados diferencialmente entre el estadio CTar y Glo. Finalmente fue posible correlacionar los perfiles de expresión diferencial y validar cinco genes considerados genes marcadores de suma importancia en el proceso de maduración del embrión somático. Este estudio aporta nuevos conocimientos sobre los

mecanismos fisiológicos, bioquímicos y moleculares del desarrollo del embrión somático, y sugiere estrategias que pueden utilizarse para regular el proceso de desarrollo/maduración del ES.

CAPÍTULO I**ANTECEDENTES****1. Género *Musa***

El género *Musa* L. (familia *Musáceae* Juss.) está representado por cerca de 75 especies nativas a los bosques tropicales húmedos del sureste asiático. Las especies del género se subdividen en dos secciones: *Musa* y *Callimusa* con números cromosómicos $x=11$ y $x=7,9,10$, respectivamente. Esta subdivisión en secciones está sustentada por estudios con marcadores moleculares tipo AFLPs (Wong *et al.* 2002) y filogenéticos que utilizan secuenciación de ADN nuclear y cloroplástico ((Häkkinen 2013; Christelova *et al.* 2011; Wong *et al.* 2002).

La distribución geográfica y centro de origen primario del género *Musa* comprende la India, las islas del Océano Pacífico, Nepal, extendiéndose hasta el norte de Australia (Figura 1.1) (INIBAP, 2006).

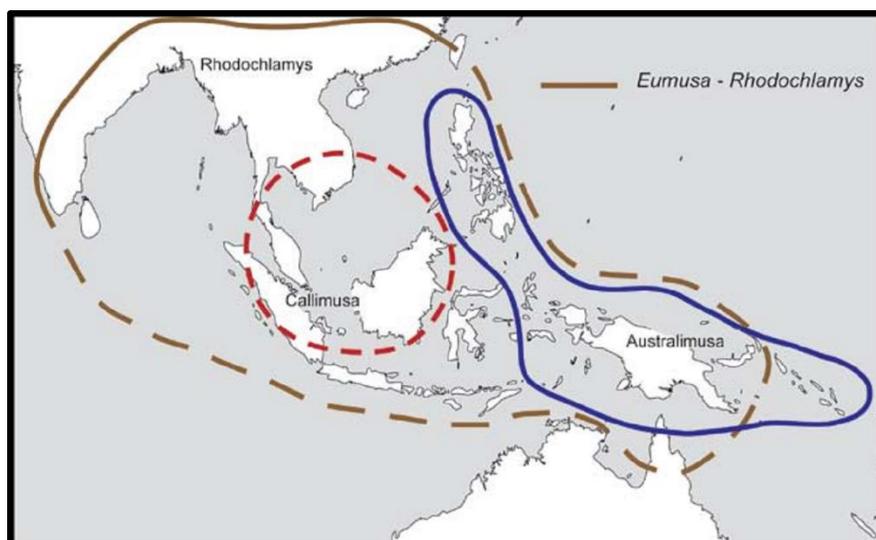


Figura 1.1.- Distribución geográfica de las secciones de *Musa* (De Langhe *et al.* 2009).

La sección *Musa* posee gran diversidad, incluye 33 especies diploides ($2n= 2x=22$ cromosomas), entre las cuales se encuentran *Musa acuminata* y *Musa balbisiana*,

consideradas progenitores de los cultivares comestibles que conocemos hoy en día (Häkkinen 2013) denominados bananos o plátanos en América Latina. El plátano es de gran importancia económica como cultivo.

Los plátanos comestibles se clasifican en cultivares de *M. acuminata* (clonas de *M. acuminata* x *M. acuminata*) y cultivares híbridos (clonas de *M. acuminata* (AA) x *M. balbisiana* (BB)) (Soto 1985). Entre los cultivares de *M. acuminata* se distinguen tres grupos: AA, AAA, AAAA, las letras se refieren a su composición genómica (Pillay *et al.* 2006). La cruce intraespecífica de los diploides silvestres AA dieron lugar a los triploides AAA tras un evento de restitución cromosómica durante la meiosis, siendo los AAA los bananos comestibles que más se comercializan a nivel mundial (Karamura 1999). Las clonas de origen híbrido se clasifican en cuatro grupos: AB, AAB, ABB y ABBB.

1.1. Clasificación taxonómica del género *Musa*.

La taxonomía del género *Musa* es la siguiente según Tree of Life Web Project, 2015 (<http://tolweb.org/tree/phylogeny.html>):

Reino: Vegetal

Clase: Angiospermae

Subclase: Monocotiledoneae

Orden: Zingiberales

Familia: *Musáceae*

Los estudios de filogenia molecular soportan la asignación de la familia *Musáceae* del orden Zingiberales, al clado de las commeliníidas, comprendiendo tres géneros: *Musa*, *Ensete* y *Musella* (Christelova *et al.* 2011).

1.2. Descripción botánica de *Musa*

Las formas botánicas de las variedades comerciales de *Musa*, son muy particulares y responden al nivel de ploidía que poseen. Las variedades diploides son por lo general fértiles y de reproducción sexual, mientras que las formas triploides y tetraploides

(obtenidos por mejoramiento tradicional), son casi infértiles y partenocárpicos (Soto 1985). Los poliploides presentan frutos más grandes y pseudotallos más robustos. Las plantas de banano son herbáceas gigantes de 2 a 9 metros con pseudotallos aéreos, que surgen a partir del tallo verdadero llamado rizoma; o cormo; de los cuales se desarrollan vegetativamente hijuelos (Nelson *et al.* 2006) (Figura 1.2). Las hojas tienen una distribución helicoidal las cuales envuelven el meristemo apical, nuevas hojas emergen enrolladas y compactas dando origen al pseudotallo de la planta (Robinson y Galán Saúco 2012). La hoja más reciente tiene forma de “cigarro”, surgieron a través del pseudotallo, esta presenta una coloración verde, posteriormente al alcanzar la madurez está conformada por la lámina foliar, el pecíolo, la nervadura central y el ápice (Ortiz *et al.* 2001). La inflorescencia surge a partir del meristemo apical del rizoma y surge en la parte aérea del pseudotallo, este evento tiene como consecuencia la detención del desarrollo de hojas foliares. Los frutos de las variedades comestible se desarrollan por partenocarpia (formación del fruto en ausencia de fertilización, resultando en frutos sin semilla) dentro los ovarios de las flores pistiladas, los cuales muestran un aumento de volumen considerable (Robinson y Galán Saúco 2012).

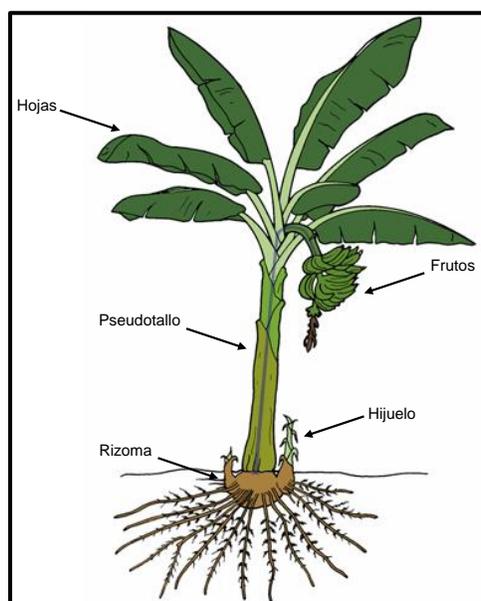


Figura 1.2.- Morfología de *Musa* (Robinson y Galán Saúco 2012).

1.3. Producción mundial de banano

La producción de banano económicamente activa es a través de los cultivares triploides

partenocárpicos principalmente del subgrupo Cavendish (AAA), dicha producción ubica al banano como la fruta de mayor exportación a nivel mundial en términos de volumen y; después de los cítricos, el segundo lugar en términos de valor comercial. La quinta parte de la producción mundial del cultivo de banano se comercializa internacionalmente (SIAP, 2013).

Según la FAO en el 2016, se produjeron 148, 344,104 millones de toneladas de plátano y banano en el mundo. Siendo la India, el principal productor con 29,124,000 millones de toneladas que representan el 20 % de la producción mundial, seguido por China con una producción de 13,066,778 millones de toneladas, lo cual representa el 9 % de la producción mundial y posteriormente Indonesia con una producción de 7,007,125 que es el 6 % de plátanos y banano.

En México el cultivo de bananos triploides del grupo genómico AAA (subgrupo Cavendish) ocupa una superficie de 80,021 ha que producen 2,384,778 millones de toneladas de fruta fresca, de las cuales el 95% se destina para el consumo nacional y el 5% restante para exportación (SIAP 2016). Los principales estados productores de banano son: Chiapas, Tabasco, Veracruz, Colima, Jalisco y Michoacán. Yucatán, aunque minoritario, también se ubica entre éstos (Cuadro 1.1).

Cuadro 1.1.- Principales estados productores de banano y plátano en México (SIAP, 2016).

Estado	Producción (Ton)	% de producción
Chiapas	716285.84	30.04%
Tabasco	610744.79	25.61%
Veracruz	325563.9	13.65%
Colima	195193.97	8.18%
Jalisco	163079.97	6.84%
Michoacán	155951.94	6.54%
Guerrero	73893.3	3.10%
Oaxaca	67246.17	2.82%
Nayarit	33952.11	1.42%
Puebla	32065.7	1.34%
Quintana Roo	7536	0.32%
Campeche	1491.09	0.06%
Yucatán	1118.87	0.05%
Total	2384778.25	

En nuestro país se cultivan nueve variedades de plátanos: Dominico (AA), Valery (AAA), Tabasco conocido como Roatán y Enano gigante (AAA grupo Cavendish), y Pera y Morado (AAA), además del plátano Macho (AAB subgrupo Plantain), Manzano (AAB subgrupo Silk), y Cuadrado o Cuatrofilos (ABB, subgrupo Bluggoe), las últimas seis variedades se cultivan en parcelas pequeñas o traspatios por pequeños productores para el consumo regional y nacional. Todas estas variedades cultivadas son susceptibles a diversas plagas y enfermedades.

1.4. Enfermedades del banano

Las cultivares triploides comestibles poseen un acervo genético reducido debido principalmente a su esterilidad, y disminuida variabilidad genética, ello ocasiona cierta susceptibilidad al ataque de diversos fitopatógenos, los cuales son los responsables en gran medida del elevado costo de producción del cultivo debido al uso de agroquímicos fúngicos para erradicarlos (Almodóvar *et al.* 2001).

Entre las enfermedades fúngicas que afectan al banano destacan: sigatoka negra (*Pseudocercospora fijiensis*, sinónimo: *Mycosphaerella fijiensis*) sigatoka amarilla (*Pseudocercospora musae*, sinónimo: *Mycosphaerella musicola*); marchitez del plátano o Mal de Panama (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*); mancha foliar (*Cordana musae*); punta de cigarro o “cigar-end rot” (*Verticillium theobromae*).

Entre las enfermedades bacterianas que afectan al banano se cuentan la enfermedad del moko (*Ralstonia solanacearum* raza 2 = *Pseudomonas solanacearum*); pudrición blanca del pseudotallo y cormo (*Erwinia carotovora*); y entre las principales enfermedades virales: virus del mosaico del pepinillo y enfermedad del rayado de Guineo (Almodóvar *et al.* 2001).

La susceptibilidad al ataque de patógenos ha incrementado los costos de producción del banano de exportación tipo Cavendish en las zonas productoras del mundo. Así mismo, el plátano macho y manzano son apreciados a nivel nacional, sin embargo, estos son susceptibles a patógenos. El subgrupo Silk (AAB) incluye clonas que producen un fruto con alto valor económico, cuyo sabor dulce-ácido es parecido a la manzana, por lo que se le denomina plátano manzano (México) y en otros países se conoce como Nanjangud Rasbale

(syn. 'Rasthali', India), Figue Pome y Maca (Brasil) y Latundan (Panamá). Su susceptibilidad a *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* (Foc) race 1 causal del mal de Panamá ha contribuido a la declinación del cultivo de este tipo de plátano, mismo que está en peligro de extinción en su hábitat natural y donde antes se explotaba. Sin embargo, hoy en día existen herramientas para la propagación *in vitro* de especies de importancia económica y alimentaria, una de ellas es la embriogénesis somática (ES) de gran utilidad para el mejoramiento biotecnológico por mutagénesis y transformación genética (Suprasanna y Bapat 2006).

1.5. Propagación *in vitro* y regeneración de especies vegetales

La propagación *in vitro* puede llevarse a cabo a través del cultivo de tejidos, el cual es el conjunto de técnicas para la multiplicación o propagación de especies vegetales. El cultivo de tejidos puede iniciar a partir de un tejido o célula vegetal, la cual es transferido a un medio de cultivo rico en nutrientes y bajo condiciones de crecimiento controladas (George *et al.* 2008). El cultivo de tejidos y regeneración *in vitro* puede llevarse por dos vías: la organogénesis y la embriogénesis somática. La primera como su nombre lo indica es la formación de órganos o brotes a partir de un explante o tejido donador, esto se da por la concentración de reguladores de crecimiento vegetal adicionados al medio de cultivo. En el caso de la embriogénesis somática las células que tienen capacidad embriogénicas o totipotencia celular dan lugar a embriones somáticos los cuales posteriormente darán lugar a un planta completa (Bhatia y Bera 2015; George *et al.* 2008).

El cultivo de tejidos es de interés en estudios de división celular, fisiológicos, bioquímicos, mutagénesis, transformación genética entre otros. Este sistema ha sido de gran utilidad en *Musa*, ya que se obtenido material libre de patógenos se ha conservado una gran variedad de genotipos *in vitro* y se ha promovido el uso de plántulas provenientes de cultivo de tejidos para las plantaciones comerciales, ahorrando tiempo y disminuyendo los costos de producción. Biodiversidad internacional antiguamente llamada INIBAP y en la actualidad conocido como Bioversity International, conserva más de 1100 accesiones de especies silvestres y cultivares de *Musa*, esto con ayuda del cultivo *in vitro*, por lo que gracias a estos avances es posible conservar la diversidad genética de una especie (Panis 2009).

1.5.1. Embriogénesis somática

La embriogénesis somática es el proceso de desarrollo de un embrión somático a partir de una célula somática sin la fusión de células gaméticas (Tisserat *et al.* 1979). Esto ocurre en un medio sintético, bajo condiciones *in vitro*, las células somáticas diferenciadas son inducidas a retornar a un estadio meristemático basal característico de células embriogénicas (Quiroz-Figueroa *et al.* 2006; Komamine *et al.* 2005; Schmidt *et al.* 1997).

Este proceso ocurre en plantas superiores debido a su “totipotencia celular”, la cual hace referencia a la capacidad que poseen las células somáticas para regenerar una planta completa (Namasivayam 2007; Reinert 1959). Cabe señalar, que el término “célula embriogénica” se limita a las células que han completado el proceso de transición, desde un estadio somático a un estadio donde no requiere más estímulos endógenos, tales como la aplicación de reguladores de crecimiento, esenciales para el desarrollo de ES (Komamine *et al.* 2005; de Jong *et al.* 1993).

El proceso de embriogénesis somática *in vitro* se divide en dos fases: inducción y expresión (Jimenez 2001). La mayoría de las células somáticas no son naturalmente embriogénicas, por lo que es necesario la inducción de la dediferenciación celular para alcanzar la competencia embriogénica (Namasivayam 2007; Dodeman *et al.* 1997).

En la fase de expresión la célula embriogénica desarrolla competencia embriogénica y se diferencia para formar el embrión somático (Jimenez 2001). El embrión somático atraviesa estadios morfológicos similares al embrión cigótico, estos estadios son: el globular, el oblongo, el acorazonado, el torpedo y el cotiledonario en dicotiledóneas (Figura 1.3) (Nakamura *et al.* 1992). En el primer estadio, el embrión globular inicia su diferenciación celular y el establecimiento de la estructura básica de la futura planta, en este estadio se observa la formación de protoderma, el cual posteriormente permite que los embriones sigan con la transición hacia el siguiente estadio de diferenciación llamado acorazonado. Posteriormente en el estadio acorazonado se observa la formación del procambium; tejido que dará lugar a la formación de los ejes vasculares de la planta (Ramakrishnan *et al.* 2005). En el estadio torpedo se forman pequeñas protuberancias en el meristemo apical, lo cual da lugar a los cotiledones (Quiroz-Figueroa *et al.* 2006). Por último, en el estadio cotiledonar, los cotiledones se expanden debido a la deposición de sustancias de reserva que promoverán la posterior germinación del embrión somático (Joshi y Kumar 2013).

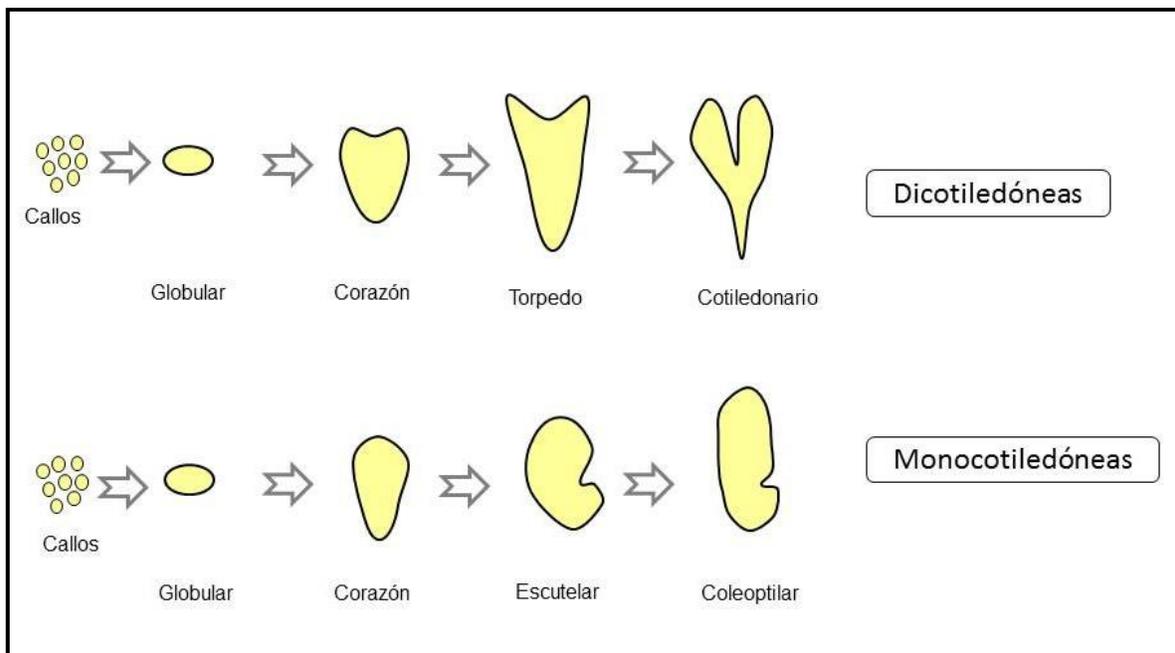


Figura 1.3.- Proceso de embriogénesis somática (Zimmerman 1993).

Los estadios de morfogénesis y desarrollo del embrión somático en monocotiledóneas ocurren de manera diferente al de especies dicotiledóneas. Los estadios en monocotiledóneas son el estadio globular, acorazonado y por último el coleoptilar (George *et al.* 2008) (Figura 1.3).

La embriogénesis somática es una herramienta valiosa para la propagación *in vitro* de plantas, siendo que a través de esta se pueden realizar estudios bioquímicos, fisiológicos, morfológicos y moleculares, los cuales ayudarán a desarrollar tecnologías para el mejoramiento genético de cultivos de interés comercial (Aguilar 2008).

En *Musa* se ha logrado la regeneración de diversos cultivares a través de la embriogénesis somática indirecta con la formación la formación de un tejido desdiferenciado o callo. Novak *et al.* (1989) fue de los primeros en obtener la regeneración *in vitro* vía embriogénesis somática empleando hojas y rizoma de cultivares AA, AA y AAB. Por su parte Grapin *et al.* (1996) empleo flores masculinas inmaduras para la formación de callo embriogénico de un genotipo AAB, obteniendo una tasa de regeneración del 10 al 40%. Remakanthan *et al.* (2014) utilizaron brotes para la regeneración *in vitro* vía embriogénesis somática de enano gigante (AAA) y obtuvieron una tasa de regeneración del 3%. Youssef y colaboradores

recurrió a la embriogénesis somática para la regeneración de plántulas de los cultivares enano gigante (AAA) y cavendish (AAA), obteniendo una tasa de regeneración del 35% (Youssef *et al.* 2010). Sin embargo, además de la respuesta a la formación de callo embriogénico, una de las etapas limitantes fue la maduración del embrión somático. Se ha observado que una deficiente maduración del embrión somático, puede generar embriones con anomalías morfológicas y de igual manera impacta en la tasa de germinación y conversión a plántula (Perán-Quesada *et al.* 2004; Ammirato 1986).

1.5.2. Maduración del embrión somático

La maduración del embrión somático es una etapa crítica en los sistemas de regeneración *in vitro* (Grapin *et al.* 1996). Esta etapa se caracteriza por la expansión celular, la diferenciación; que implican que los cotiledones se expandan e inicien el almacenamiento compuestos de reservas en compartimientos subcelulares para su posterior movilización y uso (Merkle *et al.* 1995; Thomas 1993); la desecación y la acumulación de sustancias de reserva promueven la correcta germinación de los embriones somáticos (Vale *et al.* 2014). Cuando son acumulados compuestos de reservas entre ellos el almidón, los embriones visiblemente pueden cambiar su morfología con una transición de un color blanco-traslúcido a blanco-opaco, dependiendo de la especie (Márquez-Martín *et al.* 2011).

Uno de los factores importantes durante la maduración es el estrés hídrico al que están sometidos los embriones somáticos (Attree y Fowke 1993), esto da como resultado un estado de “desecación”, el cual estimula la acumulación de proteínas, carbohidratos, lípidos entre otros compuestos de reserva (Vale *et al.* 2014; Klimaszewska *et al.* 2000). La desecación induce la quiescencia metabólica de los embriones; dependiendo del tiempo de exposición a está, lo que promueve la pérdida gradual de agua dando como respuesta la activación de mecanismos de tolerancia a la desecación favoreciendo el desarrollo de los embriones para su posterior germinación (Dekkers *et al.* 2015; Bewley *et al.* 2013; Bomal *et al.* 2002). Se ha observado que, en respuesta a la pérdida gradual de agua, la célula es capaz de realizar cambios estructurales con la finalidad de recuperar su estado natural posterior al ser sometida a un estrés por déficit de agua, de igual manera durante esta etapa se acumulan compuestos los cuales actúan como agentes protectores (Bomal *et al.* 2002). Entre estos se encuentra la prolina, los azúcares no reductores como la sacarosa, trehalosa y oligosacáridos de la familia de la rafinosa tales como la rafinosa y estaquiosa;

los cuales interactúan con los grupos funcionales hidrofílicos de los componentes estructurales de la membrana, ayudando a mantener la integridad y que el daño sea reversible (Bewley *et al.* 2013).

Para inducir la tolerancia a la desecación en condiciones *in vitro* se han empleado diversas estrategias que impactan sobre la disponibilidad de agua presente en el medio de cultivo o en el potencial osmótico intracelular del embrión; entre ellas están: 1) la adición de compuestos de bajo peso molecular, tales como sales orgánicas, aminoácidos y azúcares (sacarosa); 2) la adición de compuestos de alto peso molecular, como el polietilenglicol (PEG) entre otros (Márquez-Martín *et al.* 2011).

Una de las estrategias empleadas para la maduración del embrión somático es el uso de sacarosa, que se incluye como fuente de carbono en el medio de cultivo (Iraqi y Tremblay 2001) pero que puede actuar como agente osmótico de bajo peso molecular (Tremblay y Tremblay 1995). En gimnospermas, como las coníferas, las altas concentraciones de sacarosa promueven la producción de embriones somáticos (Finer *et al.* 1989). En un trabajo en el que se evaluaron cuatro concentraciones de sacarosa (1, 3, 6 y 12%) durante el desarrollo de embriones somáticos de *Pinus strobus* L., *Picea Mariana* (Mills) y *Picea rubens* Sarg, se obtuvieron embriones somáticos viables en el tratamiento que contiene 6% (175 mM) de sacarosa, los autores sugieren que altas concentraciones de sacarosa actúan como agente osmótico promoviendo la acumulación de compuestos de reserva favoreciendo el desarrollo de los embriones somáticos (Tremblay y Tremblay 1991). Resultados similares obtuvieron Tremblay y Tremblay (1995) quienes observaron que en una concentración del 6% de sacarosa se obtienen un mayor número de embriones somáticos maduros en *Picea marianis* (Mills), sugiriendo que la sacarosa actúa como un agente osmótico favoreciendo el desarrollo de embriones somáticos de esta especie. En *Picea abies* (L.) Karst se encontró que una concentración de 3% (87.64 mM) de sacarosa fue capaz de promover la acumulación de carbohidratos y proteínas, siendo estos compuestos de reserva favoreciendo la germinación de los embriones somáticos (Businge *et al.* 2013).

Por su parte el (polietilenglicol) PEG es un agente osmótico no permeable al ser adicionado al medio del cultivo simula un ambiente a déficit de agua promoviendo el proceso de desecación, lo cual se ha observado favoreciendo el desarrollo de los embriones somáticos (Zhang *et al.* 2007).

Uno de los reguladores de crecimiento que intervienen en el proceso de desecación del embrión es el ácido abscísico (ABA), cuya biosíntesis ocurre por la vía de los carotenoides. Si bien es cierto que aún no se conoce el mecanismo de acción de este regulador, existen evidencias que apuntan que este regula la expresión de genes relacionados con el proceso de maduración (Fischerova *et al.* 2008).

Otro compuesto que actúa como agente osmótico es el gelificante, el cual restringe la disponibilidad de agua presente en el medio de cultivo (Klimaszewska *et al.* 2000), ayudando a promover la acumulación de lípidos, carbohidratos y compuestos de reserva para una correcta maduración de los embriones somáticos, pero a diferencia de la sacarosa este no es un agente osmóticamente activo debido a que no interactúa con la membrana celular (Ali *et al.* 2010; Perán-Quesada *et al.* 2004). Diversos estudios se han realizado enfocados a analizar el papel del agente gelificante durante la maduración del embrión somático. Klimaszewska y Smith (1997) evaluaron 5 concentraciones de gelificante (0.45, 0.6, 0.8, 1 y 1.2%) (Phytigel) en *Pinus strobus* L., los autores observaron que una concentración de 1% de gelificante presente en el medio de cultivo es favorable para la maduración de embriones somáticos de esta especie, sin embargo, este efecto es variable dependiendo la especie y el genotipo usado.

Resultados similares fueron obtenidos por Garin *et al.* (2000), quienes evaluaron dos concentraciones de gelificante (0.6 y 1%) (Gelrite), observando una mayor población de embriones somáticos presentes en un medio de maduración suplementado con 1% de gelificante, concluyendo que el agente gelificante juega un papel crítico durante la maduración de los embriones somáticos en *Pinus strobus* L. Así mismo un estudio más reciente en la especie *Pinus pinaster* Ait, a la concentración de 0.9% de agente gelificante promovió la acumulación de compuestos de reservas, la ganancia en peso fresco y seco teniendo un efecto favorable en la maduración de los embriones somáticos. Los autores sugieren que altas concentraciones de gelificante tiene un impacto en la disponibilidad de agua presente en el medio de cultivo promoviendo el proceso de maduración (Morel *et al.* 2014)

En estudios realizados en angiospermas se han reportado de igual manera el uso de agentes gelificantes como estrategia para promover la maduración de embriones somáticos. Perán-Quesada *et al.* (2004) analizaron el efecto de dos concentraciones de

gelificante (0.34% y 0.68%) en la maduración de embriones somáticos con un fenotipo blanco-opaco en *Persea americana*; sus resultados indican que el embrión acumula compuestos de reserva; el mayor número de embriones somáticos blancos-opacos en el medio de cultivo suplementado con 0.68% de agente gelificante. Ali *et al.* (2010) evaluaron cuatro concentraciones de gelificante y de PEG adicionado a un medio de cultivo durante la embriogénesis somática de *Juglans regia*, obteniendo una mejor respuesta en la maduración de embriones somáticos con la concentración del 3 gL⁻¹ de gelificante.

En *Musa* existen pocos trabajos enfocados a la maduración del embrión somático. En un estudio realizado por Khalil y Elbanna (2004), observaron el efecto de 4 tratamientos en la maduración del embrión somático del cv. Dwarf Brazilian, obteniendo como resultado que el tratamiento SK13, el cual contiene sales y vitaminas MS (vitaminas Murashige and Skoog), extracto de malta, glutamina, ácido naftalenacético y zeatina, alcanza una tasa de germinación del 90 al 96%. Sholi *et al.* (2009) evaluaron el efecto de ABA durante la maduración del embrión del cv. Spambia (AAB), observando que al adicionar 2.5 µM de ABA en combinación con 1.25 µM de bencilaminopurina (BAP), se alcanza una tasa de germinación del 85%, lo cual indica que el ABA induce favorablemente el desarrollo de los embriones somáticos, así como la adición de citoquinina exógena.

A pesar de las estrategias empleadas para promover las condiciones adecuadas para alcanzar la maduración de los embriones somático aún hay preguntas por responder, de igual manera aún no se han elucidado los mecanismos involucrados en el proceso de maduración y el cual posteriormente impacta en la germinación de los embriones somáticos, por lo que es importante los estudios de genes y proteínas relacionadas a este proceso.

1.6. Genes expresados durante la embriogénesis y desarrollo/maduración del embrión somático en cultivo *in vitro*

Durante la iniciación de la embriogénesis se da la reprogramación de la expresión de genes, para que las células diferenciadas transiten hacia el estadio de célula meristemática, recuperando su totipotencia celular. Dicha reprogramación de genes ocurre durante el proceso transcripcional o post-transcripcional, por lo que es clave identificar aquellos protagonistas que estén involucrados en estos procesos. Entender dichos procesos nos ayudaría a comprender de mejor manera los factores que interactúan durante el cultivo *in*

vitro en plantas (Fujimura y Komamine 1980).

Se han identificado diferentes genes que participan en las etapas de la embriogénesis de *Daucus carota* y *Arabidopsis thaliana*. Algunos de los genes son: *WUSCHEL* (WUS), *SHOOT MERISTEMLESS* (STM), *SCARECROW* (SCR), *SHORTROOT* (SHR), *HOBBIT* (HBT) y *LEAFY COTILEDON* (LEC) (Park y Harada 2008); los cuales codifican para factores de transcripción involucrados en diferentes etapas de la embriogénesis somática (Yang y Zhang 2010). De igual forma se han identificado a las proteínas LATE-EMBRYOGENIC ABUNDANT (LEA), cuya expresión se encuentra regulada por el factor de transcripción ABA INSENSITIVE 3 (ABI3) (Ikeda *et al.* 2006).

Los factores de transcripción son proteínas regulatorias altamente conservadas y las cuales juegan un papel importante en la regulación de la expresión génica así como en otros procesos biológicos (Shivani *et al.* 2017). Se han reportado factores de transcripción involucrados en la embriogénesis somática de *Arabidopsis thaliana* y los cuales interactúan con genes claves en dicho proceso (Figura 1.4).

En el primer grupo se encuentran genes *leafy cotyledon* (LEC) que incluye a *LEC1*, *LEC2* y *FUSCA3*. *LEC1* codifica para una subunidad HAP3 con factor de unión a la caja CCAAT mientras que *LEC2* y *FUSCA3* codifican para una proteína con dominio B3 (Pelletier *et al.* 2017; Junker y Bäumllein 2012). Estos factores de transcripción intervienen en diferentes funciones durante la embriogénesis y desarrollo del embrión como: 1) el mantenimiento del suspensor, 2) la síntesis y la acumulación de reservas durante la maduración para el proceso de desecación del embrión, y 3) la inhibición de la germinación (Harada *et al.* 2001). Debido a la importancia de estos genes en la regulación de las etapas tempranas de la embriogénesis somática, se han aislado de diferentes especies, como maíz (*Zea mays*) (Zhang *et al.* 2007), Zanahoria (*Daucus Carota*) (Yazawa *et al.* 2004), y cacao (*Theobroma cacao* L.) (Alemanno *et al.* 2008).

LEC1 regula positivamente genes implicados en las rutas de síntesis de auxinas como *YUCCA10* (*YUC10*), por otro lado, *LEC2* estimula la activación de genes *YUCCA2* (*YUC2*) y *YUCCA4* (*YUC4*) lo cual favorece la acumulación endógena de auxinas durante la embriogénesis somática (Figura 1.4) (Guan *et al.* 2016; Novak *et al.* 1989). Se ha reportado que la pérdida de función de *LEC1* en mutantes de *Arabidopsis thaliana* tiene como consecuencia una deficiente acumulación de compuestos de reserva como lípidos y

proteínas, déficit para adquirir tolerancia a la desecación y por último impacta en el proceso de germinación (Pelletier *et al.* 2017; Harada 2001). Por otro lado, la pérdida de función de LEC2 tiene un efecto en la formación de los cotiledones, malformación del suspensor celular del embrión e intolerancia a la desecación (Wójcikowska *et al.* 2013; Gaj *et al.* 2005; Harada 2001).

En el segundo grupo se encuentra el factor de transcripción AGL15 que codifica para una proteína con dominio MADS, acumulándose en etapas tempranas de la embriogénesis y manteniendo los niveles durante la morfogénesis y maduración del embrión (Harding *et al.* 2003). Se ha reportado que AGL15 promueve la expresión del gen GA20x6 que codifica para una giberelina oxidasa, la cual inhibe la síntesis de ácido giberélico (Figura 1.4) (Nowak y Gaj 2016). En el tercer grupo se encuentra el gen *BABY BOOM* (*BBM*) el cual codifica para un factor de transcripción AP2/ERF, cuya expresión se detecta en cultivos de micrósporas y en etapas tempranas de desarrollo del embrión (Guan *et al.* 2016; Boutilier *et al.* 2002).

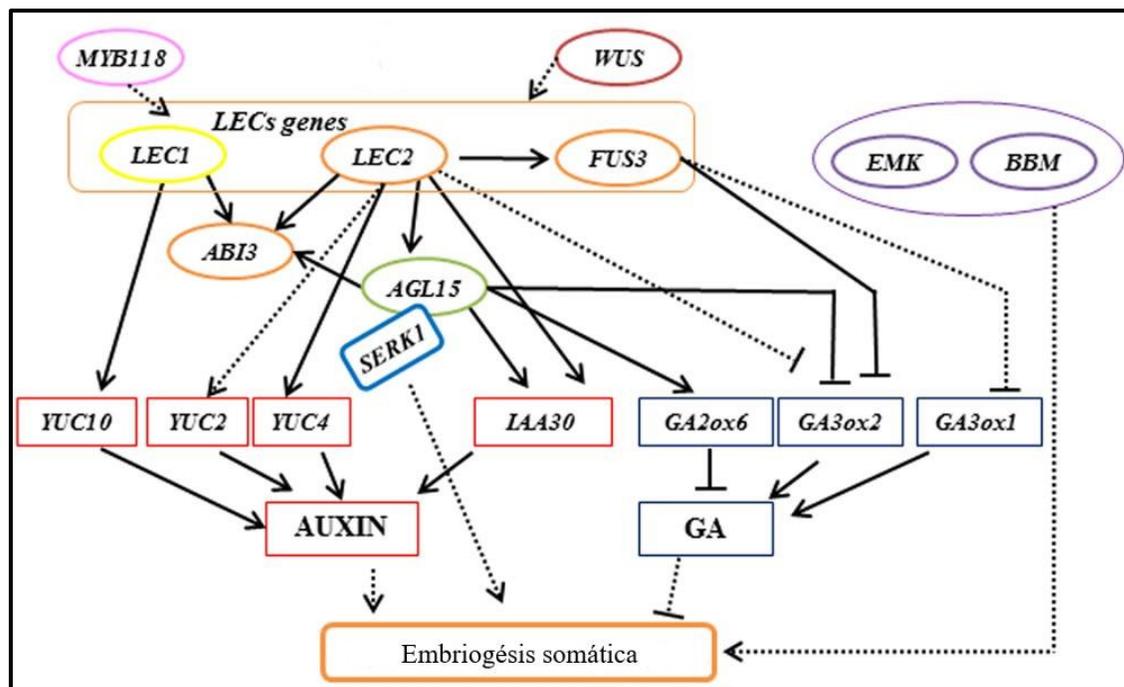


Figura 1.4.- Mecanismo de interacción de los genes involucrados en la embriogénesis somática en *Arabidopsis thaliana* (Guan *et al.* 2016).

Proteínas cinasas como las proteínas receptoras de la embriogénesis somática (SERK,

somatic embryogenesis receptor kinases) se les ha identificado también durante la embriogénesis temprana (Becraft 1998), estas proteínas están involucradas en numerosos procesos de señalización y transducción de señales, las cuales son percibidas desde la membrana plasmática hasta el sitio de acción, regulando de manera negativa a los transductores de señales (Yang y Zhang 2010).

Durante el proceso de desarrollo/maduración se han identificado genes los cuales están involucrados en el proceso de tolerancia a la desecación (Cuadro 1.2), sin embargo, aún hace falta más estudios a fondo para comprender de mejor manera este proceso.

Cuadro 1.2. Genes identificados durante el desarrollo/maduración de ES en plantas.

Genes	Especie	Proceso putativo	Referencias
ERD 15	<i>Pinus pinaster</i> Ait	Respuesta temprana a estrés	(Morel <i>et al.</i> 2014)
LEAs	<i>Pinus pinaster</i> Ait	estrés/maduración	(Morel <i>et al.</i> 2014)
MYB	<i>Gossypium hirsutum</i> cv. YZ1	FT inducido por estrés	(Jin <i>et al.</i> 2014)
WRKY	<i>Gossypium hirsutum</i> cv. YZ1	FT en respuesta a estrés	(Jin <i>et al.</i> 2014)
LEAs	<i>Gossypium hirsutum</i> cv. YZ1	estrés/maduración	(Jin <i>et al.</i> 2014)
ERDs	<i>Gossypium hirsutum</i> cv. YZ1	Respuesta temprana a estrés	(Jin <i>et al.</i> 2014)
RDs	<i>Gossypium hirsutum</i> cv. YZ1	Respuesta a deshidratación	(Jin <i>et al.</i> 2014)
EDGP	<i>Gossypium hirsutum</i> cv. YZ1	Respuesta a estrés osmótico	(Jin <i>et al.</i> 2014)
GDH1	<i>Gossypium hirsutum</i> cv. YZ1	Respuesta a estrés osmótico	(Jin <i>et al.</i> 2014)
ERD	<i>Musa acuminata</i> ssp. <i>malaccensis</i>	Respuesta temprana a estrés	(Maldonado-Borges <i>et al.</i> 2013)

En la especie *Pinus pinaster* Ait., se identificaron transcritos expresados diferencialmente (TFs) relacionados a genes en respuesta a estrés (Morel *et al.* 2014) (Cuadro 1.2); se evaluaron embriones somáticos en etapa temprana de maduración; encontrando TFs de ERD 15 (genes de respuesta temprana a la deshidratación los cuales se han reportado como genes en respuesta temprana a estrés en *Solanum pennellii* y en otras especies (Ziaf *et al.* 2011). Así mismo encontraron genes LEA del grupo 1 y grupo 6, lo del grupo 1 se encuentran implicados en la protección osmótica durante el déficit de agua y las del grupo 6 aún no se han identificado su función (Hong-Bo *et al.* 2005).

Jin y colaboradores realizaron una comparativa del transcriptoma de embriones somáticos versus embriones cigóticos de *Gossypium hirsutum* cv. YZ1, identificando la expresión diferencial de transcritos que derivan de genes en respuesta a estrés e implicados en el desarrollo de ES (Jin *et al.* 2014) (Cuadro 1.2), dichos autores identificaron TFs de 5 LEAs que pertenecen al grupo 3 y un LEA que forma parte del grupo 2. Las LEAs del grupo 3 se ha visto que están implicados en el enriquecimiento de iones durante la deshidratación (Hong-Bo *et al.* 2005) y las del grupo 2 han sido llamadas dehidrinas, las cuales son inducidas durante un evento de deshidratación protegiendo la membrana celular durante este proceso (Wang *et al.* 2007). Se han reportado factores de transcripción (FT) del tipo MYB y WRKY los cuales se ha visto están implicados en procesos de estrés (Lata *et al.* 2011).

En un estudio realizado en la especie *Musa acuminata* spp. *malaccensis* durante el proceso de maduración del embrión somático, se identificaron TDFs implicados en la embriogénesis somática, así como en el proceso de maduración del embrión, entre los cuales se identificó un ERD (Repuesta temprana a deshidratación) los cuales tienen una respuesta rápida antes condiciones de estrés (Maldonado-Borges *et al.* 2013).

A pesar de los esfuerzos realizados aún faltan muchos mecanismos por elucidar, sin embargo, en la actualidad existen herramientas que nos podría ampliar el panorama acerca de los genes implicados en el proceso de maduración del embrión somático.

1.7. Transcriptómica en plantas

La transcriptómica se encarga del estudio del conjunto de transcritos generados por un evento determinado en una célula, siendo esto de importancia en estudios de genómica funcional (Wang *et al.* 2009). Los datos obtenidos a partir de un transcriptoma puede proporcionar gran información para generar estrategias para el descubrimiento de genes de interés y marcadores moleculares, los cuales complementan estudios de proteómica funcional en un futuro (Zhuang *et al.* 2014; Wolf 2013; Ali *et al.* 2010).

Entre las herramientas que se han empleado en el estudio del transcriptoma se encuentran los microarreglos a partir de cDNA, el análisis serial de la expresión génica (SAGE), hibridación sustractiva por supresión (SSH), polimorfismo de la longitud de fragmentos de amplificadas usando como templado ADN complementario (cDNA-AFLP) y polimorfismo

amplificado de secuencias relacionadas a partir de ADN complementario (cDNA-SRAP). Sin embargo estas herramienta se encuentran limitada debido al bajo rendimiento, al alto costo, la baja sensibilidad y que se debe tener información del genoma (Strickler *et al.* 2012). En la actualidad gracias al avance científico se han desarrollado nuevas técnicas de secuenciación (NGS, Next Generation Sequencing), las cuales generan grandes cantidades de información por lo que se la ha considerado una tecnología de alta eficiencia (Tiwary 2015).

Las plataformas actualmente disponibles para la secuenciación del ADN y ARN se encuentran: Roche/454, Solexa/illumina, Ion Torrents y SOLID/Life Technologies. Cada plataforma cuenta con sus ventajas y desventajas, sin embargo las más utilizadas para el análisis del transcriptoma son Roche/454 y Solexa/illumina (Strickler *et al.* 2012).

Roche/454 fue la primera tecnología de nueva generación, la cual se basa en la pirosecuenciación por emulsión. En la pirosecuenciación se genera una cadena doble de ADN a partir de una cadena sencilla, este proceso ocurre por la adición de nucleótidos lo cual genera una reacción luminiscente siendo posteriormente detectados por la emisión de luz que genera, dicho proceso ocurre en un perla (Tiwary 2015; Egan *et al.* 2012). El tamaño de lecturas o “reads” que género en su primera versión es de 100 a 150 pares de bases y posteriormente los equipos fueron actualizados generando lecturas con un tamaño de 700 pb que a su vez genera una base de datos de 0.7 Gigabites (Liu *et al.* 2012).

La plataforma de illumina utiliza el principio de secuenciación por síntesis. El cDNA generado a partir del ARNm o ARNt, es utilizado para ligar adaptadores en los extremos 5´ y 3´ de la cadena, la secuencia de los adaptadores es complementarios a secuencias que se encuentran en una plataforma que contiene la celda de flujo, los adaptadores tendrán la función de cebadores. Durante el proceso de secuenciación las lecturas o secuencias generadas adheridas a la celda de flujo formaran un puente lo cual generada millones de lecturas durante todo el proceso, posteriormente serán desnaturalizados y se irán integrando nucleótidos marcados, lo cuales emitirán fluorescencia y será captado por una cámara especial, terminado el primer ciclo se eluye la celda de flujo liberando la cadena sintetizada y comienza otro ciclo (Egan *et al.* 2012; Sedano y Carrascal 2012).

En la actualidad se ha generado la secuenciación del RNA o también llamada RNA-seq, la

cual hace uso de las nuevas tecnologías de secuenciación, por lo que se puede generar secuencias masivas de RNA para el estudio del transcriptoma (Ward *et al.* 2012).

1.8. RNA-Seq

El RNA-Seq es una herramienta transcriptómica que utiliza las nuevas tecnologías de secuenciación ayudando a caracterizar transcriptomas y comprender los procesos de la expresión génica (Sedano y Carrascal 2012). Durante la secuenciación del ARN por RNA-Seq se puede obtener información acerca de todos los RNA de una muestra, así mismo otra ventaja de esta tecnología es que se puede descubrir nuevos exones, sitios de empalme, fusión de genes y de igual manera la expresión un gen de interés (Vikman *et al.* 2014). De manera experimental el RNA-Seq se basa en la secuenciación del ARNm o ARNt de una muestra o tejido. Unos de los pasos claves para que esta tecnología funcione correctamente es la obtención de ARNm o ARNt de buena calidad (Strickler *et al.* 2012). Posteriormente se realiza la fragmentación del ARN obtenido, la mayoría de las plataformas de secuenciación necesitan fragmentos con tamaños aproximados de 200 a 500 pares de bases. Es importante mencionar que así mismo se puede sintetizar el cDNA y posteriormente fragmentarse. Posteriormente se sintetiza la doble cadena de cDNA y son ligados adaptadores en los extremos 3' y 5' de los fragmentos obtenidos. Para la secuenciación de los fragmentos pueden ser por síntesis o ligación dependiendo de la plataforma que se utilizara para secuenciar la muestra (Wang *et al.* 2009).

Para la realización del RNA-seq se necesitan considerar varios aspectos como el diseño experimental que se utilizara, el trabajo experimental que se desarrollara en el laboratorio, la plataforma a usar y el ensamblado del transcriptoma.

Dentro del diseño experimental se pueden considerar los siguiente puntos: diseño estadístico y condiciones controladas para el experimento, en este punto se considera las réplicas biológicas para reducir los errores experimentales y poder alcanzar el objetivo planteado (Wolf 2013). El tejido o explante a usar y la especie, dentro de este punto se tiene que considerar el origen del tejido o explante, en el caso que provenga de cultivo *in vitro* es importante considerar la etapa de desarrollo en el que se encuentre, a su vez es importante tener información del genoma a usar, si ya se encuentra disponible o liberado en una base de datos y por último si nuestra especie a usar tiene duplicación de genes o tiene poliploidía

para considerar las variantes alélicas en el análisis de datos (Strickler *et al.* 2012). Para el trabajo en el laboratorio se consideran los siguientes puntos: la colecta del material biológico, la secuenciación y el ensamblado. La colecta del material es de suma importancia, ya que realizar una colecta en condiciones no favorables puede conllevar a la degradación del ARNt (Wang *et al.* 2009). En la actualidad existe sustancias que previenen la degradación del material genético, entre ellos está el RNAlater de la compañía Life Technologies. Extracción del RNA y calidad, en este punto se debe adecuar un protocolo de extracción de ARN dependiendo de la especie a usar o recurrir al uso de kit de extracción que se adecue a nuestras necesidades.

Para la de secuenciación y ensamblado es importante definir la plataforma de secuenciación. En esta etapa es importante considerar parámetros como costo total de la secuenciación, el tamaño de las lecturas, los errores de secuenciación y el número total de lecturas deseadas, por lo que dependiendo del tipo de estudio a realizar se elegirá la mejor plataforma (Wolf 2013). Para el procesamiento de las lecturas y ensamblado es importante la verificación de la calidad de las lecturas o *reads* obtenidos y el tamaño de éstas, sin embargo, existen herramientas como Fastqc para verificar estos parámetros (Strickler *et al.* 2012). Posteriormente se remueven las secuencias de los adaptadores usados para la secuenciación, para ello se usan programas como Seqclean, entre otros.

Realizados los pasos anteriores se procede al ensamblado del transcriptoma, para esto se puede usar dos estrategias, la primera es realizar el ensamblado con ayuda del genoma de referencia (genoma secuenciado) y la segunda es realizar un ensamblado *de novo* (sin genoma de referencia) (Martin y Wang 2011).

Para el ensamblado con un genoma de referencia de primera instancia se hace un alineamiento de empalme de las lecturas sobre el genoma descargado previamente, este paso se lleva a cabo con ayuda de programas como el TopHat, Splice Map, Mapslice, o GSNAP. Posteriormente cada lectura empalmada en el genoma es agrupada para construir una gráfica que pueda representar todas las isoformas o transcritos, por último se resuelven dichas gráficas generadas para dar como resultados las isoformas individuales (Martin y Wang 2011).

Otra estrategia usada en caso de que no se cuente con el genoma secuenciado de la

especie de interés es el uso del ensamblado *de novo*, el cual se basa en el solapamiento de las lecturas cortas para generar una lectura con mayor longitud (llamado contigs) y posteriormente dos contigs son solapados generando un super contigs (llamados scaffolds) para al finalmente generar transcritos (Martin y Wang 2011). Existen estrategias para realizar un ensamblado *de novo*, una de ellas es usar el método de superposición/disposición/consenso (OLC, por sus siglas en inglés overlap/layout/consensus). En éste se usa una gráfica de superposición en el cual consta de 3 fases, en la primera fase se pretende encontrar o revelar superposiciones que contengan a todos contra todos y a su vez comparando lecturas por pares, en la segunda fase se hace una construcción o manipulación del gráfico de superposición que conduzca a una disposición aproximada, y en la última fase se utiliza el alineamiento múltiple de secuencias (MSA, por sus siglas en inglés Multiple sequence alignment) para determinar la disposición precisa y a su vez determinar la secuencia consenso (Miller *et al.* 2010). Entre los ensambladores que utilizan este método podemos mencionar a Celera assembler (Myers *et al.* 2000), Arachne (Batzoglou *et al.* 2002), CAP3 (Huang y Madan 1999) y el Newbler. Otro método usado para realizar un ensamblado *de novo* es a través de los gráficos de Brujin, los cuales se basan en la relación de la superposición de los K-mers y de los nucleótidos adyacentes (Li *et al.* 2011). Entre los programas de ensamblado que usan este método está el Velvet (Zerbino y Birney 2008), ABySS (Simpson *et al.* 2009) y SOAPdenovo (Li *et al.* 2010).

El uso de herramientas de secuenciación masiva como el RNA-seq en procesos embriogénicos como la maduración del embrión somático en *Musa*, proporcionaría información para elucidar mecanismo de respuesta a embriogénesis, diferenciación celular y maduración del embrión, creando estrategias a futuro para el mejoramiento genético de esta especie.

La presente tesis se encuentra organizada por capítulos, los capítulos 2, 3 y 4 contienen una introducción, materiales y métodos, los resultados, la discusión y su respectiva bibliografía. El capítulo 1 presenta los antecedentes, el capítulo 2 describe los resultados sobre el sistema de regeneración *in vitro*, el capítulo 3 está enfocado en la evaluación de los parámetros fisiológicos y bioquímicos, el capítulo 4 presenta los resultados acerca del análisis molecular el proceso de maduración del embrión somático por último el capítulo 5

muestran las conclusiones y perspectivas.

HIPÓTESIS

Sí el embrión somático (ES) de *Musa* spp., se desarrolla y madura bajo condiciones limitantes de disponibilidad de agua que promuevan la acumulación de reservas y la ganancia en peso seco, incrementando su tasa de germinación y su conversión a planta, entonces mediante el análisis de su transcriptoma se identificarán los genes cuya expresión diferencial son clave para dicho proceso del desarrollo.

OBJETIVO GENERAL.

Evaluar parámetros fisiológicos, bioquímicos y moleculares durante la maduración del embrión somático de *Musa*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Desarrollar el protocolo de regeneración a través de embriogénesis somática indirecta a partir de flores masculinas inmaduras de *Musa* spp. (AAB) cv Manzano.
2. Determinar los parámetros fisiológicos peso fresco, peso seco y contenido de agua de embriones somáticos durante 30, 45, 60, 90 y 120 días de cultivo.
3. Analizar los niveles de carbohidratos totales, almidón, proteínas y ABA en embriones somáticos de *Musa* spp. (AAB) cv Manzano. durante 30, 45, 60, 90 y 120 días de cultivo bajo condiciones limitantes de agua, y definir su relación con los estadios de ES inmaduro y maduro.
4. Analizar los transcriptomas de cuatro estadios (globular, pera, coleoptilar temprano y coleoptilar tardío) de desarrollo de embriones somáticos de *Musa* spp. (AAB) cv Manzano.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental planteada para alcanzar los objetivos fue la inducción de la embriogénesis somática del cv. Manzano y promover la maduración de los embriones somáticos. A partir de la identificación de cuatro estadios de maduración se determinaron parámetros fisiológicos, bioquímicos y moleculares.



Figura 1.5.- Estrategia experimental.

CTem: Coleoptilar temprano

CTar: Coleoptilar tardío

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, M.E. (2008). Embriogenesis somático en plátanos Y bananos: perspectivas y limitaciones. (técnica, CATIE—Serie, ed.), Vol. 27, pp. 50. Boletín técnico CATIE.
- Alemanno, L., M. Devic, N. Niemenak, C. Sanier, J. Guilleminot, M. Rio, J.-L. Verdeil y P. Montoro (2008). Characterization of leafy cotyledon1-like during embryogenesis in *Theobroma cacao* L. *Planta*, 227, 853-866.
- Ali, S., V. Kourosch, B.S. Hassan, K. Siamak y L. Charles (2010). Enhancement of maturation and germination of somatic embryos in Persian walnut (*Juglans regia* L.) using osmolites, hormones and cold treatments. *African Journal of Food Science*, 4, 735-743.
- Almodóvar, W., M. Díaz y A. Alvarado (2001). Enfermedades de Plátano y Guineo. Colegio de Ciencias Agrícolas-Servicio de Extensión Agrícola. Universidad de Puerto Rico.
- Ammirato, P.V. (1986). Organizational events during somatic embryogenesis. *Plant biology (USA)*.
- Attree, S. y L. Fowke (1993). Maturation, desiccation, and encapsulation of gymnosperm somatic embryos. PCT-application, published as WO93/11660.
- Batzoglou, S., D.B. Jaffe, K. Stanley, J. Butler, S. Gnerre, E. Mauceli, B. Berger, J.P. Mesirov y E.S. Lander (2002). ARACHNE: a whole-genome shotgun assembler. *Genome research*, 12, 177-189.
- Becraft, P.W. (1998). Receptor kinases in plant development. *Trends in Plant Science*, 3, 384-388.
- Bewley, J.D., K. Bradford, H.M. Hilhorst y H. Nonogaki (2013). Development and Maturation, *en: Seeds*, Springer New York pp. 27-83.
- Bhatia, S. y T. Bera (2015). Somatic Embryogenesis and Organogenesis, *en: Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences* (Bhatia, Saurabh, Kiran Sharma, Randhir Dahiya y Tanmoy Bera, eds.), Academic Press, Boston. pp. 209-230.
- Bomal, C., V.Q. Le y F.M. Tremblay (2002). Induction of tolerance to fast desiccation in black spruce (*Picea mariana*) somatic embryos: relationship between partial water loss, sugars, and dehydrins. *Physiologia Plantarum*, 115, 523-530.
- Boutilier, K., R. Offringa, V.K. Sharma, H. Kieft, T. Ouellet, L. Zhang, J. Hattori, C.-M. Liu, A.A.M. van Lammeren, B.L.A. Miki, J.B.M. Custers y M.M. van Lookeren Campagne (2002). Ectopic Expression of BABY BOOM Triggers a Conversion from Vegetative to Embryonic Growth. *The Plant Cell*, 14, 1737-1749.
- Businge, E., J. Bygdell, G. Wingsle, T. Moritz y U. Egertsdotter (2013). The effect of carbohydrates and osmoticum on storage reserve accumulation and germination of

-
- Norway spruce somatic embryos. *Physiologia Plantarum*, 149, 273-285.
- Christelova, P., M. Valarik, E. Hribova, E. De Langhe y J. Dolezel (2011). A multi gene sequence-based phylogeny of the *Musaceae* (banana) family. *BMC Evolutionary Biology*, 11, 103.
- de Jong, A., E.L. Schmidt y S. de Vries (1993). Early events in higher-plant embryogenesis. *Plant Molecular Biology*, 22, 367-377.
- De Langhe, E., L. Vrydaghs, P. de Maret, X. Perrier y T. Denham (2009). Why Bananas Matter: An introduction to the history of banana domestication. 2009, 7, 13.
- Dekkers, B.W., M. Costa, J. Maia, L. Bentsink, W. Ligterink y H.M. Hilhorst (2015). Acquisition and loss of desiccation tolerance in seeds: from experimental model to biological relevance. *Planta*, 241, 563-577.
- Dodeman, V.L., G. Ducreux y M. Kreis (1997). Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany*, 48, 1493-1509.
- Egan, A.N., J. Schlueter y D.M. Spooner (2012). Applications of next-generation sequencing in plant biology. *American Journal of Botany*, 99, 175-185.
- Enríquez-Valencia, A.J., F.A. Vázquez-Flota, J.R. Ku-Cauich y R.M. Escobedo-GraciaMedrano (2018). Differentially expressed genes during the transition from early to late development phases in somatic embryo of banana (*Musa* spp. AAB group, Silk subgroup) cv. Manzano. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*.
- Finer, J., H. Kriebel y M. Becwar (1989). Initiation of embryogenic callus and suspension cultures of eastern white pine (*Pinus strobus* L.). *Plant Cell Reports*, 8, 203-206.
- Fischerova, L., L. Fischer, Z. Vondrakova y M. Vagner (2008). Expression of the gene encoding transcription factor PaVP1 differs in *Picea abies* embryogenic lines depending on their ability to develop somatic embryos. *Plant Cell Reports*, 27, 435-441.
- Fujimura, T. y A. Komamine (1980). Mode of action of 2,4-D and zeatin on somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 99, 1-8.
- Gaj, M.D., S. Zhang, J.J. Harada y P.G. Lemaux (2005). Leafy cotyledon genes are essential for induction of somatic embryogenesis of *Arabidopsis*. *Planta*, 222, 977-988.
- Garin, É., M. Bernier-Cardou, N. Isabel, K. Klimaszewska y A. Plourde (2000). Effect of sugars, amino acids, and culture technique on maturation of somatic embryos of *Pinus strobus* on medium with two gellan gum concentrations. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 62, 27-37.
- George, E., M. Hall y G.-J. Klerk (2008). Somatic Embryogenesis, *en: Plant Propagation by Tissue Culture* (George, Edwin F., Michael A Hall y Geert-Jan De Klerk, eds.), Springer
-

Netherlands pp. 335-354.

- Grabin, A., J. Schwendiman y C. Teisson (1996). Somatic embryogenesis in plantain banana. *In Vitro - Plant*, 32, 66-71.
- Guan, Y., S.-G. Li, X.-F. Fan y Z.-H. Su (2016). Application of Somatic Embryogenesis in Woody Plants. *Frontiers in Plant Science*, 7.
- Häkkinen, M. (2013). Reappraisal of sectional taxonomy in *Musa* (Musaceae). *Taxon*, 62, 809-813.
- Harada, J.J. (2001). Role of *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON genes in seed development. *Journal of Plant Physiology*, 158, 405-409.
- Harada, J.J., M.F. Belmonte y R.W. Kwong (2001). Plant Embryogenesis (Zygotic and Somatic), *en: eLS*, John Wiley & Sons, Ltd pp.
- Harding, E.W., W. Tang, K.W. Nichols, D.E. Fernandez y S.E. Perry (2003). Expression and Maintenance of Embryogenic Potential Is Enhanced through Constitutive Expression of AGAMOUS-Like 15. *Plant Physiology*, 133, 653-663.
- Hong-Bo, S., L. Zong-Suo y S. Ming-An (2005). LEA proteins in higher plants: Structure, function, gene expression and regulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 45, 131-135.
- Huang, X. y A. Madan (1999). CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome research*, 9, 868-877.
- Ikeda, M., M. Umehara y H. Kamada (2006). Embryogenesis-related genes; its expression and roles during somatic and zygotic embryogenesis in carrot and *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology*, 23, 153-161.
- Iraqi, D. y F.M. Tremblay (2001). Analysis of carbohydrate metabolism enzymes and cellular contents of sugars and proteins during spruce somatic embryogenesis suggests a regulatory role of exogenous sucrose in embryo development. *Journal of Experimental Botany*, 52, 2301-2311.
- Jimenez, V.M. (2001). Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 13, 196-223.
- Jin, F., L. Hu, D. Yuan, J. Xu, W. Gao, L. He, X. Yang y X. Zhang (2014). Comparative transcriptome analysis between somatic embryos (SEs) and zygotic embryos in cotton: evidence for stress response functions in SE development. *Plant Biotechnology Journal*, 12, 161-173.
- Joshi, R. y P. Kumar (2013). Regulation of somatic embryogenesis in crops. *Agricultural Reviews*, 34.
- Junker, A. y H. Bäumllein (2012). Multifunctionality of the LEC1 transcription factor during

-
- plant development. *Plant Signaling & Behavior*, 7, 1718-1720.
- Karamura, D.A. (1999). Numerical Taxonomic Studies of the East African Highland Bananas, *Musa AAA-East Africa*, in Uganda. INIBAP p.
- Khalil, S.M. y A. Elbanna (2004). Highly efficient somatic embryogenesis and plant regeneration via suspension cultures of banana (*Musa spp.*). *Arab J Biotech*, 7, 99-110.
- Klimaszewska, K., M. bernier-Cardou, D.R. Cyr y B.C.S. Sutton (2000). Influence of gelling agents on culture medium gel strength, water availability, tissue water potential, and maturation response in embryogenic cultures of *Pinus strobus* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 36, 279-286.
- Klimaszewska, K. y D.R. Smith (1997). Maturation of somatic embryos of *Pinus strobus* is promoted by a high concentration of gellan gum. *Physiologia Plantarum*, 100, 949-957.
- Komamine, A., N. Murata y K. Nomura (2005). 2004 SIVB Congress Symposium Proceeding: Mechanisms of somatic embryogenesis in carrot suspension cultures—Morphology, physiology, biochemistry, and molecular biology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 41, 6-10.
- Lata, C., A. Yadav y M. Prasad (2011). Role of Plant Transcription Factors in Abiotic Stress Tolerance. *Abiotic Stress Response in Plants - Physiological, Biochemical and Genetic Perspectives*, 269–296.
- Li, R., H. Zhu, J. Ruan, W. Qian, X. Fang, Z. Shi, Y. Li, S. Li, G. Shan y K. Kristiansen (2010). De novo assembly of human genomes with massively parallel short read sequencing. *Genome research*, 20, 265-272.
- Li, Z., Y. Chen, D. Mu, J. Yuan, Y. Shi, H. Zhang, J. Gan, N. Li, X. Hu, B. Liu, B. Yang y W. Fan (2011). Comparison of the two major classes of assembly algorithms: overlap–layout–consensus and de-bruijn-graph. *Briefings in Functional Genomics*.
- Liu, L., Y. Li, S. Li, N. Hu, Y. He, R. Pong, D. Lin, L. Lu y M. Law (2012). Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, 11.
- Maldonado-Borges, J.I., J.R. Ku-Cauich y R.M. Escobedo-GraciaMedrano (2013). Annotation of Differentially Expressed Genes in the Somatic Embryogenesis of *Musa* and Their Location in the Banana Genome. *The Scientific World Journal*, 2013, 7.
- Márquez-Martín, B., R. Sesmero, M.A. Quesada, F. Pliego-Alfaro y C. Sánchez-Romero (2011). Water relations in culture media influence maturation of avocado somatic embryos. *Journal of Plant Physiology*, 168, 2028-2034.
- Martin, J.A. y Z. Wang (2011). Next-generation transcriptome assembly. *Nat Rev Genet*, 12, 671-682.

-
- Merkle, S.A., W.A. Parrott y B.S. Flinn (1995). Morphogenic Aspects of Somatic Embryogenesis, *en: In Vitro Embryogenesis in Plants* (Thorpe, TrevorA, ed.), Springer Netherlands pp. 155-203.
- Miller, J.R., S. Koren y G. Sutton (2010). Assembly algorithms for next-generation sequencing data. *Genomics*, 95, 315-327.
- Morel, A., C. Teyssier, J.-F. Trontin, K. Eliášová, B. Pešek, M. Beaufour, D. Morabito, N. Boizot, C. Le Metté, L. Belal-Bessai, I. Reymond, L. Harvengt, M. Cadene, F. Corbineau, M. Vágner, P. Label y M.-A. Lelu-Walter (2014). Early molecular events involved in *Pinus pinaster* Ait. somatic embryo development under reduced water availability: transcriptomic and proteomic analyses. *Physiologia Plantarum*, 152, 184-201.
- Myers, E.W., G.G. Sutton, A.L. Delcher, I.M. Dew, D.P. Fasulo, M.J. Flanigan, S.A. Kravitz, C.M. Mobarry, K.H. Reinert y K.A. Remington (2000). A whole-genome assembly of *Drosophila*. *Science*, 287, 2196-2204.
- Nakamura, T., T. Taniguchi y E. Maeda (1992). Studies on Somatic Embryogenesis of Coffee by Scanning Electron Microscope. *Japanese Journal of Crop Science*, 61, 476-486.
- Namasivayam, P. (2007). Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 90, 1-8.
- Nelson, S.C., R.C. Ploetz y A.K. Kepler (2006). *Musa* species (banana and plantain). *Species Profiles for Pacific Island Agro forestry*, 9-22.
- Novak, F.J., R. Afza, M. Van Duren, M. Perea-Dallos, B.V. Conger y T. Xiaolang (1989). Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Suspension Cultures of Dessert (AA and AAA) and Cooking (ABB) Bananas (*Musa* spp.). *Bio/Technology*, 7, 154.
- Nowak, K. y M.D. Gaj (2016). Transcription Factors in the Regulation of Somatic Embryogenesis, *en: Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications* (Loyola-Vargas, Víctor M. y Neftalí Ochoa-Alejo, eds.), Springer International Publishing, Cham. pp. 53-79.
- Ortiz, R., A. López, S. Poncher y A. Segura (2001). *El cultivo del banano*. San José, CR, EUNED. 185p.
- Panis, B. (2009). *Crioconservación de germoplasma de Musa*. 2a edición. Guías técnicas No. 9. Bioversity International, Montpellier. Francia.
- Park, S. y J. Harada (2008). *Arabidopsis* Embryogenesis, *en: Plant Embryogenesis* (Suárez, MaríaF y PeterV Bozhkov, eds.), Humana Press pp. 3-16.
- Pelletier, J.M., R.W. Kwong, S. Park, B.H. Le, R. Baden, A. Cagliari, M. Hashimoto, M.D. Munoz, R.L. Fischer, R.B. Goldberg y J.J. Harada (2017). LEC1 sequentially regulates the transcription of genes involved in diverse developmental processes

- during seed development. Proceedings of the National Academy of Sciences, 114, E6710-E6719.
- Perán-Quesada, R., C. Sánchez-Romero, A. Barceló-Muñoz y F. Pliego-Alfaro (2004). Factors affecting maturation of avocado somatic embryos. *Scientia horticultrae*, 102, 61-73.
- Pillay, M., E. Ogundiwin, A. Tenkouano y J. Dolezel (2006). Ploidy and genome composition of *Musa* germplasm at the International Institute of Tropical Agriculture (IITA). *African Journal of Biotechnology*, 5.
- Quiroz-Figueroa, F., R. Rojas-Herrera, R. Galaz-Avalos y V. Loyola-Vargas (2006). Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86, 285-301.
- Ramakrishnan, K., R. Gnanam, P. Sivakumar y A. Manickam (2005). Developmental pattern formation of somatic embryos induced in cell suspension cultures of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]. *Plant Cell Reports*, 24, 501-506.
- Reinert, J. (1959). Über die Kontrolle der Morphogenese und die Induktion von Adventivembryonen an Gewebekulturen aus Karotten. *Planta*, 53, 318-333.
- Remakanthan, A., T.G. Menon y E.V. Soniya (2014). Somatic embryogenesis in banana (*Musa acuminata* AAA cv. Grand Naine): effect of explant and culture conditions. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 50, 127-136.
- Robinson, J. y V. Galán Saúco (2012). Plátanos y bananas. Editorial Paraninfo p.
- Schmidt, E., F. Guzzo, M. Toonen y S. De Vries (1997). A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development*, 124, 2049-2062.
- Sedano, J.C.S. y C.E.L. Carrascal (2012). RNA-seq: herramienta transcriptómica útil para el estudio de interacciones planta-patógeno. *Fitosanidad*, 16, 101-113.
- Shivani, P. Awasthi, V. Sharma, N. Kaur, N. Kaur, P. Pandey y S. Tiwari (2017). Genome-wide analysis of transcription factors during somatic embryogenesis in banana (*Musa* spp.) cv. Grand Naine. *PLoS ONE*, 12, e0182242.
- Sholi, N.J.Y., A. Chaurasia, A. Agrawal y N.B. Sarin (2009). ABA enhances plant regeneration of somatic embryos derived from cell suspension cultures of plantain cv. Spambia (*Musa* sp.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 99, 133-140.
- Simpson, J.T., K. Wong, S.D. Jackman, J.E. Schein, S.J. Jones y I. Birol (2009). ABySS: a parallel assembler for short read sequence data. *Genome research*, 19, 1117-1123.
- Soto, M. (1985). Bananos: cultivo y comercialización. Ministerio de Agricultura y Ganadería p.

-
- Strickler, S.R., A. Bombarely y L.A. Mueller (2012). Designing a transcriptome next-generation sequencing project for a nonmodel plant species¹. *American Journal of Botany*, 99, 257-266.
- Suprasanna, P. y V.A. Bapat (2006). Differential Gene Expression During Somatic Embryogenesis, *en: Somatic Embryogenesis* (Mujib, A. y Jozef Šamaj, eds.), Springer Berlin Heidelberg pp. 305-320.
- Thomas, T.L. (1993). Gene expression during plant embryogenesis and germination: an overview. *The Plant Cell*, 5, 1401.
- Tisserat, B., E. Esan y T. Murashige (1979). Somatic embryogenesis in angiosperms. *Horticultural Reviews*, Volume 1, 1-78.
- Tiwary, B. (2015). Next-Generation Sequencing and Assembly of Plant Genomes, *en: PlantOmics: The Omics of Plant Science* (Barh, Debmalya, Muhammad Sarwar Khan y Eric Davies, eds.), Springer India pp. 53-64.
- Tremblay, L. y F. Tremblay (1991). Carbohydrate requirements for the development of black spruce (*Picea mariana* (Mill.) B.S.P.) and red spruce (*P. rubens* Sarg.) somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 27, 95-103.
- Tremblay, L. y F. Tremblay (1995). Maturation of *black spruce* somatic embryos: Sucrose hydrolysis and resulting osmotic pressure of the medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 42, 39-46.
- Vale, E.M., A.S. Heringer, T. Barroso, A.T. Ferreira, M.N. da Costa, J.E.A. Perales, C. Santa-Catarina y V. Silveira (2014). Comparative proteomic analysis of somatic embryo maturation in *Carica papaya* L. *Proteome science*, 12, 37.
- Vikman, P., J. Fadista y N. Oskolkov (2014). RNA sequencing: current and prospective uses in metabolic research. *Journal of Molecular Endocrinology*, 53, R93-R101.
- Wang, X.-S., H.-B. Zhu, G.-L. Jin, H.-L. Liu, W.-R. Wu y J. Zhu (2007). Genome-scale identification and analysis of LEA genes in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Science*, 172, 414-420.
- Wang, Z., M. Gerstein y M. Snyder (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*, 10, 57-63.
- Ward, J.A., L. Ponnala y C.A. Weber (2012). Strategies for transcriptome analysis in nonmodel plants. *American Journal of Botany*, 99, 267-276.
- Wójcikowska, B., K. Jaskóła, P. Gąsiorek, M. Meus, K. Nowak y M.D. Gaj (2013). LEAFY COTYLEDON2 (LEC2) promotes embryogenic induction in somatic tissues of *Arabidopsis*, via YUCCA-mediated auxin biosynthesis. *Planta*, 238, 425-440.
- Wolf, J.B.W. (2013). Principles of transcriptome analysis and gene expression quantification: an RNA-seq tutorial. *Molecular Ecology Resources*, 13, 559-572.

-
- Wong, C., R. Kiew, G. Argent, O. Set, S.K. Lee y Y.Y. Gan (2002). Assessment of the validity of the sections in *Musa* (Musaceae) using AFLP. *Annals of Botany*, 90, 231-238.
- Yang, X. y X. Zhang (2010). Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *Critical Reviews in Plant Science*, 29, 36-57.
- Yazawa, K., K. Takahata y H. Kamada (2004). Isolation of the gene encoding Carrot leafy cotyledon1 and expression analysis during somatic and zygotic embryogenesis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42, 215-223.
- Youssef, M., A. James, A. Mayo-Mosqueda, J.R. Ku-Cauich, R. Grijalva-Arango y R.M. Escobedo-GM (2010). Influence of genotype and age of explant source on the capacity for somatic embryogenesis of two Cavendish banana cultivars (*Musa acuminata* Colla, AAA). *African Journal of Biotechnology*, 9, 2216-2223.
- Zerbino, D.R. y E. Birney (2008). Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome research*, 18, 821-829.
- Zhang, C.-X., Q. Li y L. Kong (2007). Induction, development and maturation of somatic embryos in Bunge's pine (*Pinus bungeana* Zucc. ex Endl.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 91, 273-280.
- Zhuang, J., J. Zhang, X.-L. Hou, F. Wang y A.-S. Xiong (2014). Transcriptomic, proteomic, metabolomic and functional genomic approaches for the study of abiotic stress in vegetable crops. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 33, 225-237.
- Ziaf, K., R. Loukehaich, P. Gong, H. Liu, Q. Han, T. Wang, H. Li y Z. Ye (2011). A Multiple Stress-Responsive Gene ERD15 from *Solanum pennellii* Confers Stress Tolerance in Tobacco. *Plant and Cell Physiology*, 52, 1055-1067.
- Zimmerman, J.L. (1993). Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *The Plant Cell*, 5, 1411.

CAPITULO II

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE *MUSA* ssp cv. MANZANO (AAB, subgrupo Silk)

2.1. INTRODUCCION

Las variedades cultivadas de plátano (*Musa* spp.) son poliploides, con frutos partenocárpicos que carecen de semillas, por lo que su propagación se lleva a cabo de manera vegetativa mediante brotes axilares, denominados hijuelos de espada, que surgen del cormo (tallo verdadero). Por ello, el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es una alternativa biotecnológica para la clonación, el mejoramiento genético y la conservación de germoplasma existente de plátano. En particular, la embriogénesis somática indirecta de plátano es un instrumento poderoso para la clonación y generación de semillas sintéticas libres de enfermedades y patógenos y la regeneración de plantas con una alta fidelidad genética a la planta original (Escobedo-GraciaMedrano *et al.* 2016; López-Gómez P *et al.* 2016).

En plátano, como otras especies de angiospermas y gimnospermas, uno de los principales cuellos de botella en la propagación *in vitro* mediante embriogénesis somática, es la baja tasa de germinación de los embriones formados. Estudios realizados con el cultivar Enano Gigante (AAA, subgrupo Cavendish), entre otros, muestran tasas de germinación que van desde un 3 a 35%. Esto último se ha logrado mediante variaciones en la concentración de reguladores de crecimiento utilizados durante la germinación (Youssef *et al.* 2010; Navarro *et al.* 1997; Côte *et al.* 1996). Estudios realizados en *Pinus* indican que un factor clave es el estrés hídrico al que son sometidos los embriones durante su maduración, que conlleva a un estado de desecación, durante el cual se promueve la acumulación de compuestos de reservas como proteínas, lípidos y carbohidratos (Vale *et al.* 2014; Klimaszewska *et al.* 2000), condición que no ha sido estudiada en plátano.

En este capítulo se describe el desarrollo de un protocolo de embriogénesis somática indirecta a partir de flores masculinas inmaduras de plátano, *Musa* spp. AAB cv Manzano, y su optimización mediante el desarrollo/maduración de los embriones derivados de suspensiones embriogénicas tipo II en un medio con 0.3% p/v de gelificante y sin reguladores del crecimiento. Para ello se realizaron dos tratamientos de maduración y se

evaluaron el número total de embriones maduros obtenidos por tratamiento y la tasa de germinación de los embriones.

2.2. MATERIALES Y METODOS

2.2.1. Inducción de callo embriogénico a partir de florales masculinas inmaduras, proliferación del callo e inducción de suspensiones celulares

Para la inducción del callo embriogénico, se partió de florales masculinas inmaduras según el siguiente procedimiento: la bellota de la inflorescencia masculina se redujo a un tamaño de 6 a 8 cm, y se aislaron manos de las posiciones 8 a 12 con flores inmaduras de 2 a 3 mm (como posición 0 se consideró el meristemo apical de la inflorescencia). Las flores fueron inoculadas en medio de inducción MA1 (Ma 1991), cuya composición fue: sales y vitaminas MS (Murashige y Skoog 1962), suplementando con 5.71 μM de IAA, 18 μM de 2, 4-D, 5.4 μM de NAA, 4.1 μM de biotina, 87 mM de sacarosa, el pH del medio se ajustó a 5.7, se aforó y añadieron 2 gL^{-1} del gelificante Gelrite (Gelzan^{MR}, Sigma-Aldrich). El medio se dosificó en volúmenes de 25 mL en frascos de 100 mL. Los frascos se cubrieron con tapas de plástico y fueron esterilizados en la autoclave a 120 ° C por 20 min. Los cultivos se mantuvieron a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ en oscuridad completa durante tres meses y fueron examinados dos veces por semana para observar la formación de callo embriogénico.

Tras haber transcurrido tres meses, se observó la formación de callo embriogénico y éste fue proliferado en medio a la mitad de la fuerza iónica de MA1. La composición del medio incluye las sales y vitaminas del medio MS (Murashige y Skoog 1962), suplementando con 2.85 μM de IAA, 9 μM de 2, 4-D, 2.7 μM de NAA, 4.1 μM de biotina, 87 mM de sacarosa y 2 gL^{-1} de gelificante, ajustando pH del medio a 5.8. Los frascos se cubrieron con tapas de plástico y fueron esterilizados en autoclave a 120°C por 20 min. Las condiciones de cultivo fueron a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ en oscuridad. Los callos fueron resembrados cada mes hasta alcanzar la masa embriogénica para la posterior inducción de las suspensiones celulares.

Las suspensiones se iniciaron partir del callo embriogénico, partiendo de 1.0 g que se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 250 mL, conteniendo 50 mL de medio M2 (Côte *et al.* 1996); compuesto por vitaminas y minerales del medio MS, suplementado con 87 mM de sacarosa, 4.52 μM de 2-4 D, 4.1 μM de biotina, 680 μM de glutamina y 100 mgL^{-1} de extracto de malta. El pH del medio se ajustó a 5.3 y las suspensiones se mantuvieron en agitación

a 90 rpm a 27 °C en oscuridad, renovando el medio cada semana. Transcurridas tres semanas, las suspensiones celulares se mantuvieron ajustando el paquete de volumen celular (PVC) a 3%.

2.2.2. Maduración de ES

Previo al desarrollo del experimento de maduración de los embriones, las suspensiones celulares son filtradas a través de una malla de 250 μm , dejando sedimentar las células que cruzaron a través del poro y posteriormente se ajustó el PVC al 3%, a su vez aquel material biológico que fue retenido por la malla fue transferido a un matraz de 250 mL para continuar con el mantenimiento de la suspensión madre y su proliferación. Transcurridas dos semanas de resiembra semanal, las células del filtrado fino fueron lavadas con medio M2 sin fitorreguladores y ajustadas a una densidad a 3% de PVC, para inocular un volumen de 500 μL en los medios semisólidos MM1 y MM2. Ambos medios contenían sales y vitaminas del medio MS, 131.2 mM de sacarosa (pH es 5.7), y 2 o 3 gL^{-1} de Gelrite, M1 y M2, respectivamente. Los medios se dosificaron en cajas Petri de 9 cm diámetro conteniendo un volumen de 25 mL. Las condiciones de cultivo fueron en oscuridad a 27 ± 2 °C. Se realizaron dos experimentos independientes, cada uno constó de dos tratamientos con 2 ó 3 gL^{-1} de Gelrite, con 10 réplicas cada uno, haciendo un total de 40 unidades experimentales (UE), representadas por cajas Petri.

2.3. Germinación de ES maduros

Los embriones somáticos de 60, 90 y 120 días sometidos a los tratamientos de maduración MM1 y MM2; aquellos que presenten una morfología blanco-opaco; fueron seleccionados y transferidos al medio de germinación. Se transfirieron ocho embriones por vial de cristal (frasco Gerber), el cual contenía 25 mL de medio semisólido MG, el cual incluye las sales y vitaminas del medio MS suplementado con 87 mM de sacarosa y 200 mgL^{-1} de KH_2PO_4 . El pH del medio se ajustó a 5.8 y se adicionaron 2.5 gL^{-1} de Gelrite. Las condiciones de cultivo fueron en oscuridad a 27 ± 2 °C durante 8 días y posteriormente se transfirieron a fotoperiodo (16 h:8 h, luz: oscuridad). Se evaluó el porcentaje de embriones somáticos que germinaron en cada tratamiento de maduración.

2.3. Resultados

2.3.1. Inducción de callo a partir florales masculinas inmaduras de *Musa spp.* AAB cv. Manzano

Después de tres meses de haber iniciado el experimento de inducción de callo sobre las flores masculinas jóvenes en medio MA1, se observó la formación de diferentes tipos de callos, *i.e.*, callo embriogénico ($35 \pm 6.9\%$), callo no-embriogénico ($27.5 \pm 5.11\%$), callo diferenciado translucido ($11.6 \pm 2.6\%$) y callo oxidado ($11.1 \pm 4.6\%$) (Figura 2.1).

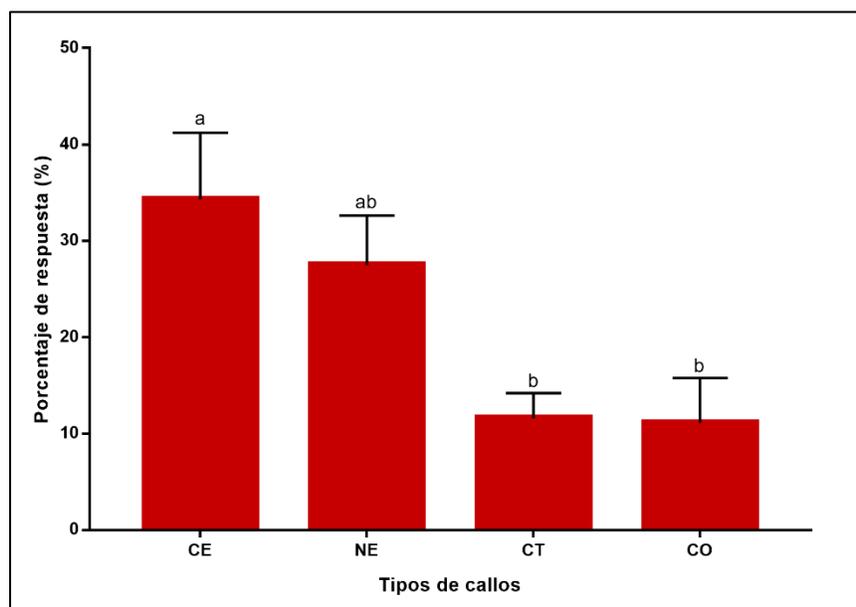


Figura 2.1.- Formación de diferentes tipos de callo a partir de flores masculinas inmaduras inducidas en medio MA1. CE= callo embriogénico, NE= callo no embriogénico, CT= callo translucido, CO= callo oxidado.

El callo no-embriogénico (NE) consiste en una mezcla de callo compacto blanco y amarillo intenso. Los callos embriogénicos friables (CE), cuya característica es una coloración amarillenta clara, con presencia de algunos embriones globulares, incrementó su masa después de dos meses de proliferación, y mostraron la formación de numerosos embriones en estadios globulares y más avanzados. Este tipo de callo constituye el ideal para iniciar suspensiones celulares (Figura 2.2).



Figura 2.1.- Callos embriogénicos obtenidos a partir de la inducción de flores masculinas inmaduras cv. Manzano. A) Callo embriogénico con presencia de embriones globulares inmaduros, B) callo embriogénico con embriones globulares.

Con la proliferación del callo embriogénico se observó la formación de embriones somáticos en un estadio de transición de globular a tipo pera, con apariencia blanco-translucido, siendo ésta una característica de un embrión inmaduro (Figura 2.2 A, señalado con una flecha blanca). De igual manera se observaron embriones diferenciados en estadios más avanzados de desarrollo con una coloración blanco-opaca, característica de los embriones maduros (Figura 2.2 B, señalado con una flecha negra). Los embriones en estadios avanzados (coleoptilar tardío), fueron removidos del callo en cada resiembra para prevenir su oxidación. Después de tres meses de proliferación, de este tipo de callos y cuando se contó con el material necesario, se iniciaron las suspensiones celulares embriogénicas.

Dos semanas después de haber inducido las suspensiones celulares, éstas formaban un sedimento con aspecto de arenilla en el fondo del matraz, siendo un indicativo de la presencia de pequeños agregados celulares, células embriogénicas y embriones bicelulares y globulares en activa división celular. Esto se vio reflejado en el PVC (paquete de volumen celular) durante cada resiembra. Para evitar oxidación de la suspensión por el incremento del PVC, éste se ajustó a 3% en cada resiembra, para posteriormente ser filtradas. Se obtuvieron dos tipos de suspensiones celulares; las suspensiones madre (Figura 2.3 A), compuesta por células de mayor tamaño, agregados heterogéneos y una coloración amarillenta; e hija, la cual contiene agregados embriogénicos de menor tamaño, siendo observados en forma de arenilla, característico de células embriogénicas y embriones globulares pequeños (Figura 2.3 B). Esta última corresponde a la suspensión ideal para realizar los experimentos de maduración de embriones somáticos.

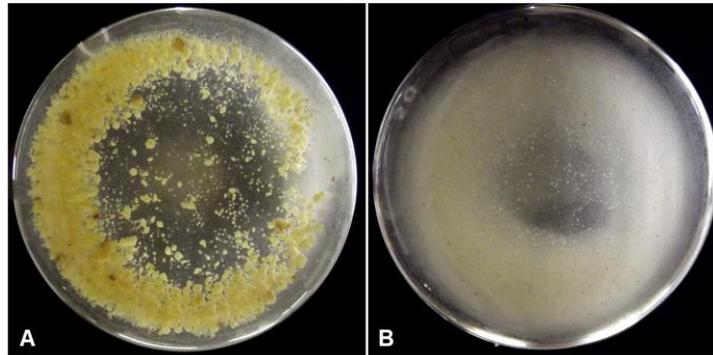


Figura 2.2.- Suspensiones embriogénicas de *Musa* spp. cv. Manzano. A) Suspensión madre con agregados heterogéneos, B) suspensión embriogénica fina. Fotografía tomada desde el fondo del matraz Erlenmeyer.

2.3.2. Experimento de maduración del embrión somático

Después de 30 días de haber inoculado la suspensión celular en los medios de maduración MM1 y MM2, se observó un incremento en la masa embriogénica, así como el tamaño de los embriones (Figura 2.4). En el medio MM1 se observó una mayor población de embriones inmaduros en un estadio globular (Figura 2.4 A, señalado con una flecha naranja). De igual manera se observaron embriones en el estadio pera con una morfología blanca-opaca, siendo un indicativo de la acumulación de almidón (Figura 2.4 A, señalado con una flecha blanca). A su vez, en el medio MM2 se percibió la presencia de los embriones en estadio globular, pero en menor proporción que en MM1. Sin embargo, fue más notoria la presencia embriones de tipo pera (Figura 2.4. B, señalados con una flecha verde). Estos resultados sugieren que el medio MM2 promueve más rápido la maduración de embriones somáticos.

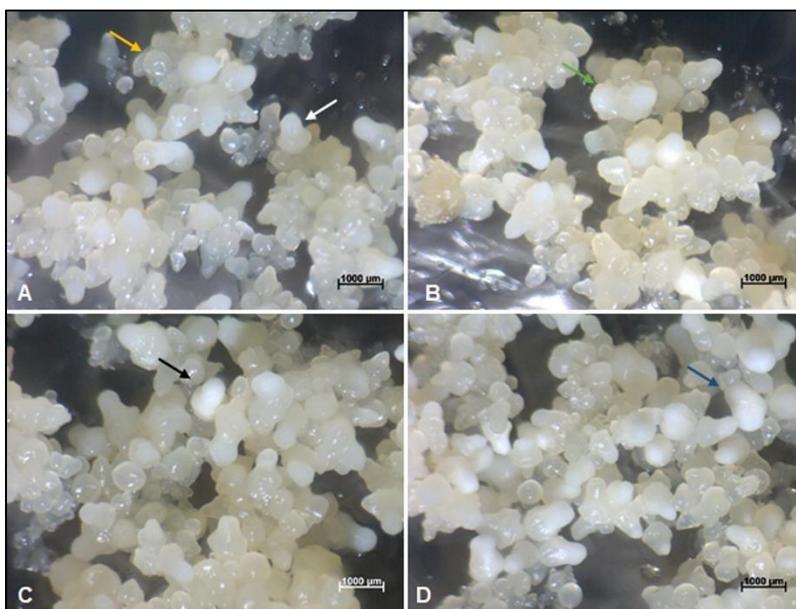


Figura 2.3.- Maduración de embriones somáticos de manzano expuestos a dos tratamientos. A) Embriones somáticos a 30 días en MM1, B) embriones somáticos a 45 días en MM1, C) embriones somáticos de 45 días en MM2, D) embriones somáticos a 45 días en MM2.

Después de 45 días se observaron embriones en un estadio globular más desarrollados en comparación a los de 30 días. Esto ocurrió para ambos tratamientos. En esta etapa se observaron embriones en estadio tipo pera con una morfología blanca-opaca. Sin embargo, a simple vista el este tipo de embriones estuvieron presentes en menor proporción en el tratamiento MM1 (Figura 2.4 C, señalado con una flecha negra) que en MM2 (Figura 2.4 D).

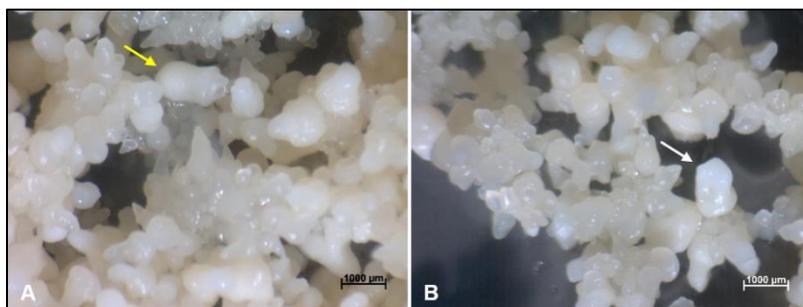


Figura 2.5.- Embriones somáticos a 60 días de maduración bajo dos tratamientos

de maduración. A) Tratamiento MM1, B) Tratamiento MM2.

A los 60 días los embriones somáticos expuestos a los tratamientos de maduración alcanzaron el estadio coleoptilar temprano (CTem). Para MM1 se observaron embriones en diferentes etapas, desde globular hasta CTem (Figura 2.5 A, señalado con una flecha amarilla). A su vez, en MM2 se observaron embriones en etapa pera y CTem (Figura 2.5 B, señalado con una flecha blanca), estos últimos tienen una morfología blanca-opaca con expuesto la hendidura cotiledonaria expuesta, por lo que fueron seleccionados para su posterior germinación.

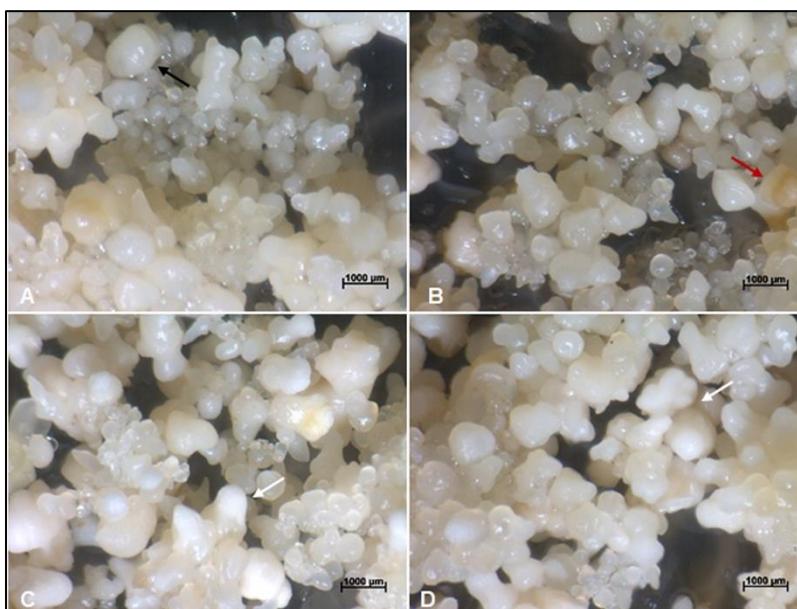


Figura 2.6.- Maduración de embriones somáticos, de plátano cv. Manzano, expuestos a dos tratamientos. A) Embriones somáticos a 90 días en MM1, B) embriones somáticos a 120 días en MM1, C) embriones somáticos de 90 días en MM2, C) embriones somáticos a 120 días en MM2.

Finalmente, a los 90 y 120 días se observaron embriones en estadios coleoptilar tardío de 90 días (CTar₉₀) y de 120 días (CTar₁₂₀). En el medio MM1 se visualizaron embriones tipo CTar₉₀ (Figura 2.6 A, señalado con una flecha negra) pero aún eran visibles numerosos embriones en estadios más tempranos (globular y tipo pera), siendo mayor la asincronía en la maduración en este tratamiento. Este comportamiento se observó de igual manera a los

120 días de maduración y, a su vez se observaron embriones con una tonalidad café-vítrea con tendencia a la fenolización (Figura 2.6 B, señalado con una flecha roja), lo que posiblemente pueda ser ocasionado por deficiencia de nutrientes. En el caso de MM2 se observó una mayor población de embriones en estadios CTar₉₀ y CTar₁₂₀ (Figura 2.6, C-D, señalados con una flecha blanca), en los cuales era visible la hendidura cotiledonaria, así como una morfología blanca opaca. Es importante mencionar que durante el transcurso del experimento el medio de cultivo no fue renovado, así como que se mantuvo sin reguladores de crecimiento vegetal, tanto para MM1 como MM2., Esto es algo novedoso en comparación con otros protocolos reportados para *Musa*.

Durante el proceso de diferenciación y desarrollo del embrión se analizaron las poblaciones de embriones somáticos en los estadios globular, tipo pera, coleoptilar temprano y coleoptilar tardío. Para ello, se cuantificó el número total de embriones, el número por cada estadio en los diferentes tiempos de cultivo, y se calculó el porcentaje de embriones en diferenciación (embriones inmaduros) y embriones en desarrollo/maduración (embriones maduros). Se designaron como embriones inmaduros al conjunto de embriones en estadio globular y tipo pera, y como maduros aquellos que se encontraban en estadio coleoptilar (Figura 2.7).

El número promedio del total de embriones somáticos desarrollados a partir de 0.5 mL de suspensión fue de $9,836 \pm 346$ (CV= 3.5%) para el tratamiento MM1, lo que hace un total de 9.83×10^5 ES por matraz de 50 mL. En tanto que para el tratamiento MM2 fue de $11,952 \pm 278$ (CV=2.33%) lo que hace un total de 1.2×10^6 ES por matraz de 50 mL.

El porcentaje de embriones inmaduros (globulares y tipo pera) fue significativamente mayor para los tratamientos MM1 (48.6%) que en el MM2 (36.8%), (Figura 2.7). A su vez se observaron diferencias significativas en el porcentaje de embriones maduros para el tratamiento MM1 (51.4%) respecto del tratamiento MM2 (63.2%), (Figura 2.7). Los resultados indican que los embriones en desarrollo bajo el tratamiento MM2 alcanzan su maduración en menor tiempo de manera más sincrónica, y que en el tratamiento MM2 se desarrollan/maduran en promedio 1.2 veces más que aquellos del tratamiento MM1.

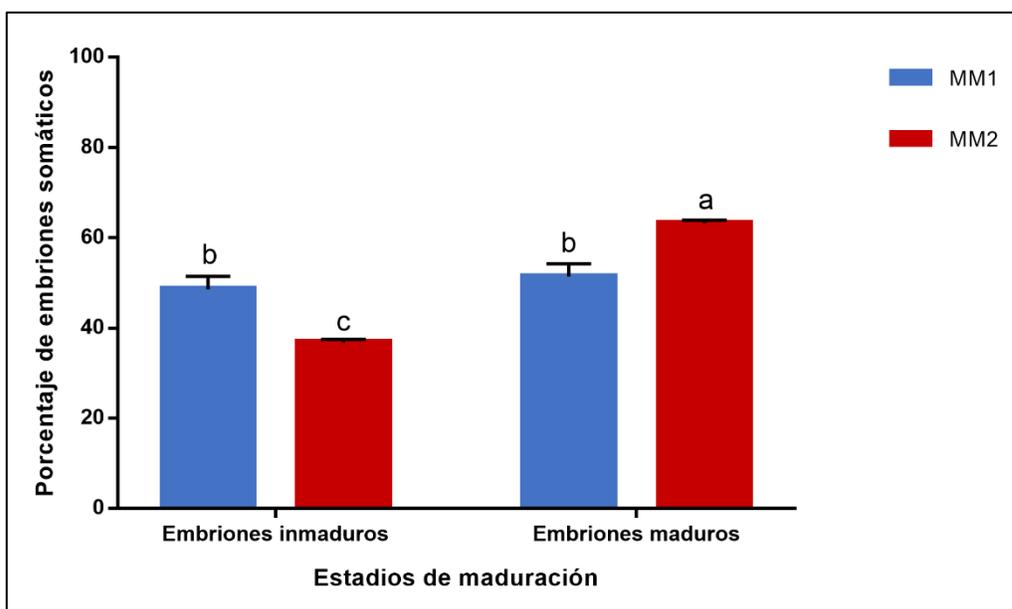


Figura 2.7.- Porcentaje de embriones somáticos inmaduros y maduros de plátano del cv. Manzano desarrollados bajo dos tratamientos (MM1 y MM2). Las barras representan el error estándar (n=3). Valores con diferentes letras tiene diferencia significativa ($p < 0.05$) de acuerdo con la prueba de Tukey.

En la Figura 2.8 se observan los estadios del embrión somático de *Musa* spp. AAB cv Manzano durante su desarrollo en medio de maduración. A los 30, 45, 60 y 90 días se observaron respectivamente los estadios globulares, con apariencia blanca transparente; tipo pera de mayor tamaño, coleoptilar temprano, con formación del escutelo (órgano en el cual se almacena los compuestos de reserva del embrión) y coleoptilar tardío, con una apariencia blanco-opaco completa y un mayor tamaño en comparación con los estadios anteriores.

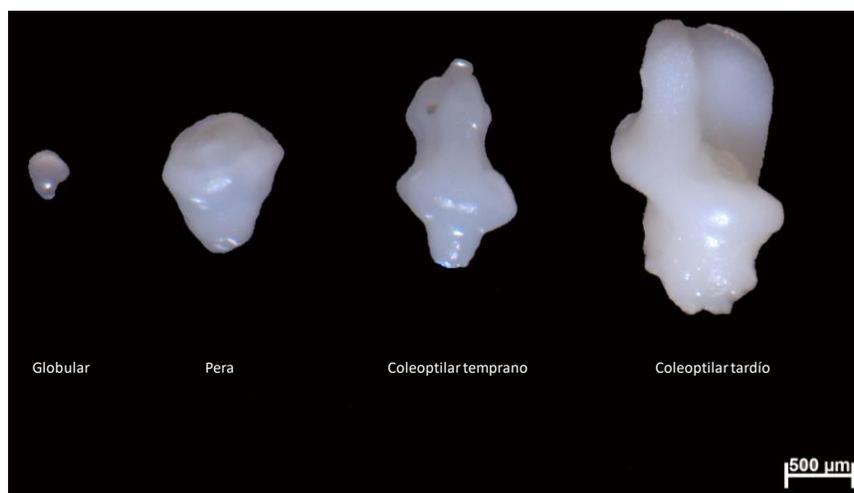


Figura 2.8.- Estadios de desarrollo del embrión somático *Musa* spp. AAB cv. Manzano.

El análisis morfológico de los embriones somáticos mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) permitió definir cuatro estadios (Figura 2.9). Se observó de primera instancia un embrión en estadio globular, con forma esférica y con un grupo de embriones globulares pequeños en la base inferior (Figura 2.9 A). La Figura 2.9 B, presenta un embrión tipo pera, de mayor tamaño comparado con el estadio anterior, en el cual se observan los ejes polares (apical y radicular). A los 60 días se observó la formación del estadio coleoptilar temprano, con una clara hendidura cotiledonaria (señalado con una flecha Figura 2.9 C) y con desarrollo del escutelo, el tejido encargado de la acumulación de nutrientes. Finalmente, a los 90 días se observó el completo desarrollado de los embriones somáticos, correspondientes al estadio coleoptilar tardío. También se logra observar el mayor tamaño la hendidura cotiledonaria y la emergencia la plúmula (Figura 2.9 D).

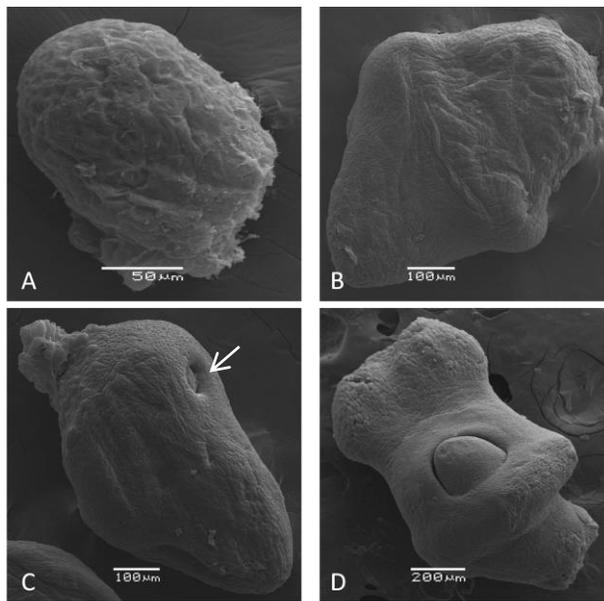


Figura 2.9.- Estadios de desarrollo del embrión de Manzano observado a través del microscopio electrónico de barrido. A) Embrión globular, B) embrión tipo pera, C) embrión coleoptilar temprano, D) embrión coleoptilar tardío.

2.3.3. Germinación de embriones somáticos

Cuando se estudió el efecto de la maduración de los embriones sobre la tasa de germinación de éstos, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los embriones en estadio coleoptilar colectados a los 60, 90 y 120 días de los tratamientos MM1 y MM2 (Figura 2.10).

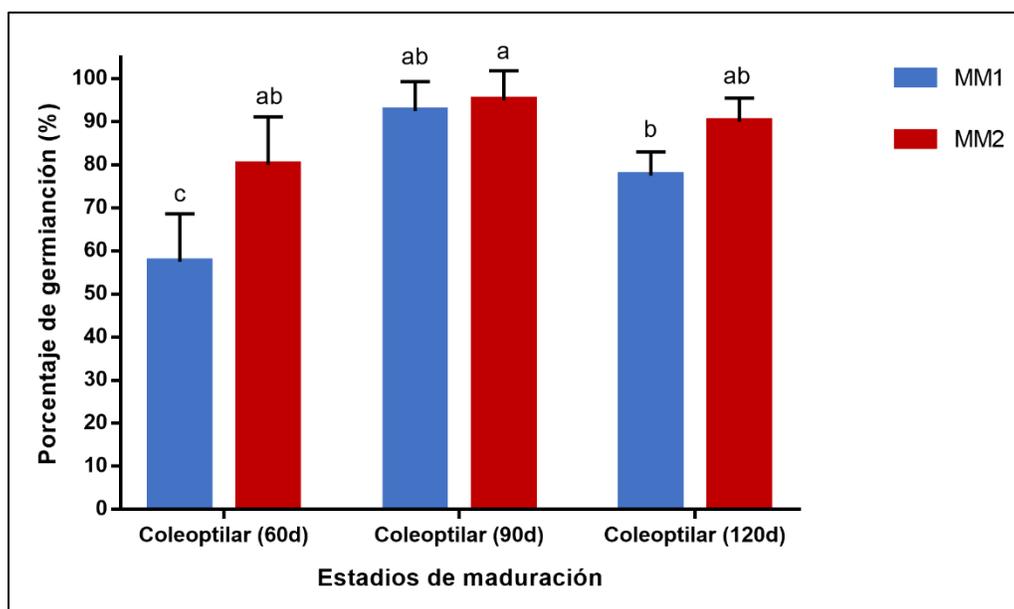


Figura 2.10.- Tasa de germinación de embriones somáticos del cv. Manzano. Los embriones en estadio coleoptilar se colectaron a los 60, 90 y 120 días de su desarrollo en los medios de maduración M1 y M2 (2 y 3 gL⁻¹ de Gelrite), respectivamente. Letras diferentes indican diferencias significativas, $p < 0.05$, de acuerdo con la prueba de Tukey.

Los embriones en estadio coleoptilar de 60 días provenientes de MM2 presentaron un mayor porcentaje de germinación ($80 \pm 5\%$) en comparación con los de MM1 ($57.5 \pm 5\%$). Los embriones somáticos de 90 días de maduración alcanzaron una mayor tasa de germinación, observándose un máximo de $95 \pm 3.06\%$ para MM2 y un menor porcentaje para MM1 con $92.5 \pm 3.06\%$ (MM1), sin mostrar diferencias significativas entre tratamientos. Por otra parte, los embriones de 120 días mostraron diferencias significativas en su tasa de germinación, $77 \pm 2.5\%$ en los embriones desarrollados en MM1, mientras que aquellos del tratamiento MM2 mostraron un $90 \pm 2.5\%$ de germinación, valor que no fue significativamente diferente de los 90 días para este mismo tratamiento.

2.4 Discusión

Aquí se describe el desarrollo de un protocolo optimizado de embriogénesis somática de plátano AAB cv. Manzano. La formación de callo embriogénico ideal, cuya respuesta de

formación reportada aquí fue del 36%, resultó ser superior a lo previamente reportado para otras variedades comerciales de plátano (Escalant *et al.* 1994). Las suspensiones celulares embriogénicas tipo II (Domergue *et al.* 2000) obtenidas de este callo embriogénico resultaron adecuadas para inducir el desarrollo y diferenciación de los embriones somáticos. A lo largo del periodo de desarrollo-maduración de los embriones se identificaron y definieron claramente cuatro estadios, (Figura 2.8), *i.e.*, globular, tipo pera y coleoptilar temprano y tardío, mismos que no han sido descritos con claridad en la literatura analizada. Una de las fases críticas en la regeneración *in vitro* de plátano se relaciona precisamente con la maduración del embrión, ya que el inadecuado desarrollo del embrión durante las etapas inmaduras (estadio globular y tipo pera) a maduras (coleoptilar temprano y tardío) causa una baja tasa de germinación de este (Grapin *et al.* 1996).

En el presente trabajo se encontró que la reducción de la disponibilidad de agua en el medio de cultivo, al aumentar la concentración del gelificante, y la ausencia de reguladores de crecimiento en el medio, aunado con el tiempo que permaneció la masa embriogénica en el medio durante el desarrollo-maduración del embrión, tuvieron un papel significativo en el número total de embriones desarrollados por mililitro de suspensión en el porcentaje de embriones maduros (Figura 2.7), así como en el aumento de la tasa de germinación (>90%). Esto fue notable al comparar los porcentajes de embriones en estadio coleoptilar desarrollados en 0.2 y 0.3% (p/v) de gelificante (Figura 2.10). En realidad, aunque todos los embriones germinados mostraron una completa conversión a plantas, las plantas provenientes de embriones desarrollados con menor concentración de gelificante, MM1 (0.2%), fueron menos vigorosas durante la aclimatación *ex-vitro*. En general, la germinación de embriones en el banano AAB, cv. Manzano fue mayor que los reportados para otros genotipos del mismo grupo genómico (AAB), como los cultivares Rasthali, Spambia, y Rajeli, cuyas tasas de germinación varían de 9, 85 y 15%, respectivamente (Kulkarni y Bapat 2013; Sholi *et al.* 2009; Ganapathi *et al.* 1999). Cabe señalar que los reguladores del crecimiento se incluyeron en el medio para la germinación de embriones en dichos estudios, en contraste con nuestro trabajo.

En este trabajo se obtuvieron tasas de germinación superiores a lo reportado en otros sistemas de regeneración *in vitro* de *Musa* (entre el 30 al 50 %), destacando que no se emplearon reguladores de crecimiento vegetal durante la maduración y germinación del

embrión somático, siendo algo novedoso para plátano.

BIBLIOGRAFIA

- Côte, F.X., R. Domergue, S. Monmarson, J. Schwendiman, C. Teisson y J.V. Escalant (1996). Embryogenic cell suspensions from the male flower of *Musa* AAA cv. Grand nain. *Physiologia Plantarum*, 97, 285-290.
- Domergue, F.G.R., N. Ferrière y F.X. Côte (2000). Morphohistological study of the different constituents of a banana (*Musa* AAA, cv. Grande naine) embryogenic cell suspension. *Plant Cell Reports*, 19, 748-754.
- Escalant, J.-V., C. Teisson y F. Cote (1994). Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). *In Vitro – Plant*, 30, 181-186.
- Escobedo-GraciaMedrano, R.M., A.J. Enríquez-Valencia, M. Youssef, P. López-Gómez, C.I. Cruz-Cárdenas y J.R. Ku-Cauich (2016). Somatic Embryogenesis in Banana, *Musa* ssp, *en: Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications* (Loyola-Vargas, Víctor M. y Neftalí Ochoa-Alejo, eds.), Springer International Publishing, Cham. pp. 381-400.
- Ganapathi, T., P. Suprasanna, V. Bapat, V. Kulkarni y P. Rao (1999). Somatic embryogenesis and plant regeneration from male flower buds in banana. *Current science*, 1228-1231.
- Grapin, A., J. Schwendiman y C. Teisson (1996). Somatic embryogenesis in plantain banana. *In Vitro - Plant*, 32, 66-71.
- Klimaszewska, K., M. bernier-Cardou, D.R. Cyr y B.C.S. Sutton (2000). Influence of gelling agents on culture medium gel strength, water availability, tissue water potential, and maturation response in embryogenic cultures of *Pinus strobus* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 36, 279-286.
- Kulkarni, V.M. y V.A. Bapat (2013). Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension cultures of Rajeli (AAB), an endangered banana cultivar. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 22, 132-137.
- López-Gómez P, E.G. RM, Y. M, E.-V. AJ, K.-C. JR y I.-D. L (2016). Variación somaclonal evaluado mediante marcadores moleculares en la regeneración *in vitro* de banano cv. Manzano. *Rev. Centro. Graduados e Invest. Inst. Tec. Mérida*, 31, 54-57.
- Ma, S. (1991). Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension culture of banana, *en: Proceedings of symposium on tissue culture of horticultural crops*, Taipei, Taiwan, 8-9 March 1988. pp. 181-188.
- Murashige, T. y F. Skoog (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- Navarro, C., R.M. Escobedo y A. Mayo (1997). *In vitro* plant regeneration from embryogenic cultures of a diploid and a triploid, Cavendish banana. *Plant Cell, Tissue and Organ*

Culture, 51, 17-25.

- Sholi, N.J.Y., A. Chaurasia, A. Agrawal y N.B. Sarin (2009). ABA enhances plant regeneration of somatic embryos derived from cell suspension cultures of plantain cv. Spambia (*Musa* sp.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 99, 133-140.
- Vale, E.M., A.S. Heringer, T. Barroso, A.T. Ferreira, M.N. da Costa, J.E.A. Perales, C. Santa-Catarina y V. Silveira (2014). Comparative proteomic analysis of somatic embryo maturation in *Carica papaya* L. *Proteome science*, 12, 37.
- Youssef, M., A. James, A. Mayo-Mosqueda, J.R. Ku-Cauich, R. Grijalva-Arango y R.M. Escobedo-GM (2010). Influence of genotype and age of explant source on the capacity for somatic embryogenesis of two Cavendish banana cultivars (*Musa acuminata* Colla, AAA). *African Journal of Biotechnology*, 9, 2216-2223.

CAPITULO III

CAMBIOS FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS EN EL EMBRIÓN SOMÁTICO DE BANANO CV. MANZANO (AAB, SUPGRUPO SILK) DURANTE SU PROCESO DE DESARROLLO-MADURACIÓN.

3.1. INTRODUCCIÓN

La embriogénesis somática *in vitro* es reconocida no solo como un método de clonación para la regeneración de plantas completas, sino también como un modelo para el estudio de los procesos fisiológicos y bioquímicos que ocurren durante el desarrollo del embrión, y la regulación de la expresión de sus genes. Además, es un sistema con mucho potencial para el mejoramiento genético y la conservación de germoplasma de plátano (*Musa spp.*).

Existen numerosos reportes de protocolos de embriogénesis somática indirecta en variedades comestibles de banano, mismos que difieren básicamente en el tipo de explante que utilizan para la formación de callo embriogénico como flores masculinas o femeninas inmaduras, yemas florales en proliferación (Curps) o meristemas en proliferación (Escalpos). No obstante, los trabajos encaminados para hacer más eficientes los protocolos de embriogénesis y lograr altas tasas de germinación del embrión y regeneración de plantas son escasos. Estos principalmente han evaluado el efecto de reguladores del crecimiento durante el cultivo *in vitro*, y carecen de información sobre posibles marcadores fisiológicos y bioquímicos durante el desarrollo-maduración del embrión, y su relación con la tasa de germinación del embrión que serían de gran utilidad para definir un sistema eficiente de regeneración.

El presente trabajo tuvo como objetivo general desarrollar un sistema eficiente de embriogénesis somática en *Musa spp.* AAB, cv. Manzano, el cual puede ser empleado para la micropropagación a gran escala, así como en estudios fisiológicos y bioquímicos (Capítulos 2 y 3).

Para ello, se evaluaron parámetros biológicos (contenido de agua, y peso seco (PS) y bioquímicos (contenido endógeno de carbohidratos solubles totales, almidón y proteínas totales), así como los perfiles de carbohidratos y ácido abscísico (ABA) en cuatro estadios desarrollo del embrión somático de plátano cv. manzano (AAB, subgrupo Silk) durante su proceso de desarrollo-maduración en medios que difieren en la concentración de gelificante

(0.2 y 0.3% p/v).

3.2. MATERIALES Y METODOS

3.2.1. Determinación de contenido de agua y porcentaje de peso seco (PS) embriones somáticos de plátano cv. Manzano.

Para la determinación del porcentaje de PS y contenido de agua, se colectaron embriones somáticos de los tratamientos MM1 y MM2 (Capítulo 2) en los estadios globular, tipo pera, coleoptilar temprano, coleoptilar tardío y coleoptilar tardío (30, 45, 60, 90 y 120 días, respectivamente). Se tomaron, 100 mg de peso fresco (PF) del material colectado en cada estadio y se transfirieron a tubos Eppendorf de 1.5 mL previamente tarados. Las muestras se liofilizaron durante 12 horas y transcurrido el tiempo los tubos fueron pesados para determinar por diferencia el PS (peso seco) de cada estadio. Para determinar el porcentaje de peso seco se usó la razón $PS/PF \times 100$. Con los resultados obtenidos del PS y PF se determinó el contenido de agua con la siguiente ecuación:

$$\text{Contenido de agua} = (PF - PS)/(PS)$$

El contenido de agua se expresó en unidades de $\text{mgH}_2\text{O}/\text{mg PS}$ (Dronne *et al.* 1997).

3.2.2. Extracción de carbohidratos totales y almidón de embriones somáticos

Para la extracción de carbohidratos totales se siguió el protocolo reportado por Verspreet *et al.* (2012) y para la extracción de almidón se siguió el protocolo de McCready *et al.* (1950). Se pesaron 10 mg embriones somáticos (de los cinco estadios mencionados) previamente liofilizados y posteriormente fueron pulverizados con nitrógeno líquido y un mortero. El material obtenido se transfirió a un tubo Eppendorf de 2 mL y se le adicionó 1 mL de etanol al 80% (v/v), incubando a 85 °C durante 30 min.. Transcurrido el tiempo los tubos fueron centrifugados a 9000 x g durante 10 min y el sobrenadante fue transferido a un tubo de vidrio de 10 mL (S1) añadiendo a la pastilla 1 mL de agua bidestilada, e incubando a 50 °C durante 30 minutos. Posteriormente los tubos fueron centrifugados 9,000 x g y el sobrenadante se transfiere al tubo S1 (previamente mencionado) y la pastilla resultante se conservó para la extracción de almidón. Cabe mencionar que el tubo S1 es liofilizado de primera instancia antes de realizar la determinación de los perfiles de carbohidratos.

Para la extracción de almidón, la pastilla obtenida mencionada en el paso anterior se le agrega 200 μL de agua bidestilada y se incubó a 85 °C por 15 min con agitaciones periódicas y disolviendo el precipitado con la ayuda de un pistilo. Posteriormente se dejan a temperatura ambiente durante 10 min, seguidamente se le adiciona 200 μL de solución de ácido perclórico 9.2 M (55 % v/v) dejando a temperatura ambiente durante 15 min, con agitaciones por inversión cada 5 min. Terminado el tiempo se ajusta el volumen a 1 mL; adicionado 600 μL ; y los tubos fueron centrifugados a 9000xg durante 15 min a 4 °C, inmediatamente se colecto el sobrenadante en un tubo Eppendorf de 2 mL (S2). La pastilla resultante es tratada con 200 μL de ácido perclórico 4.6 M a temperatura ambiente y agitando por inversión cada 5 min, al finalizar el tiempo se ajusta el volumen a 1 mL (adicionando 800 μL de agua bidestilada) seguido de una centrifugación a 9,000xg por 15 min a 4 °C, el sobrenadante obtenido fue transferido al tubo S2, el cual contiene el primer sobrenadante colectado y obteniendo un volumen final de 2 mL.

3.2.3. Determinación del contenido de carbohidratos solubles y almidón de embriones somáticos

Para la determinación del contenido de carbohidratos totales y almidón se realizó el siguiente procedimiento (McCready *et al.* 1950): En tubos de vidrio de 10 mL, se transfieren 460 μL de agua bidestilada y se adicionaron 40 μL de extracto obtenidos de carbohidratos totales y almidón hasta un volumen de 500 μL . Posteriormente los tubos fueron colocados en hielo y se añadió antrona- ácido sulfúrico (2 g de antrona en 100 ml de H_2SO_4), dejando que la solución corra por las paredes y agitando lentamente, seguidamente los tubos son colocados en baño maría a temperatura de ebullición durante 15 min; para evitar la condensación de la solución se colocan canicas de cristal en la parte superior de los tubos; transcurrido el tiempo los tubos son transferidos a hielo durante 5 minutos y finalizado el tiempo los tubos se dejan a temperatura ambiente durante 10 min. Cada muestra se hace por triplicado.

La cuantificación de carbohidratos solubles y almidón se realizó en un espectrofotómetro Jenway (modelo GENOVA), utilizando una celda de cuarzo y la absorbancia se midió a una longitud de onda de 630 nm. El contenido de carbohidratos solubles y almidón se determinó utilizando una curva estándar con concentraciones de D-glucosa (0.0275 μM , 0.55 μM , 0.11 μM , 0.1375 μM , 0.165 μM , 0.22 μM , 0.275 μM).

3.2.4. Determinación de perfiles de carbohidratos en embriones somáticos de *Musa*

Las muestras de cada estadio de maduración previamente extraídas y liofilizadas (Materiales y métodos 3.2.2) fueron disueltas en 1 mL de agua grado HPLC y se hicieron pasar a través de un filtro Phenomenex-NY de con tamaño de poro de 0.20 µm. Se realizó tres réplicas técnicas por muestra y tres experimentos independientes.

Para el análisis de carbohidratos, se utilizó el método de cromatografía de líquida de alta resolución (HPLC), en un cromatógrafo Agilent serie 1100® con un detector de índice de refracción (RID) acoplado y usando una columna Phenomenex® (Rezex, RCM-Monosaccharide). Las condiciones de corrida utilizadas: fase móvil de agua grado HPLC previamente filtrada y desgasificada, a un flujo de 0.5 mL/min y una temperatura de 75°C, con un tiempo de corrida de 30 min por muestra.

Para la cuantificación de los distintos carbohidratos, se utilizó el método de estándar externo, por lo que se realizaron curvas de calibración a partir de concentraciones conocidas de los estándares de glucosa (0.2 µM, 0.4 µM, 0.7 µM, 0.9 µM, 1.1 µM), fructosa (0.2 µM, 0.4 µM, 0.7 µM, 0.9 µM, 1.1 µM), sacarosa (0.12 µM, 0.23 µM, 0.35 µM, 0.47 µM, 0.58 µM), rafinosa (0.12 µM, 0.23 µM, 0.35 µM, 0.47 µM, 0.58 µM), estaquiosa (0.06 µM, 0.12 µM, 0.18 µM, 0.24 µM, 0.30 µM) y kestosa (0.08 µM, 0.16 µM, 0.24 µM, 0.32 µM, 0.40 µM).

Las concentraciones de los carbohidratos se estimó con la ecuación reportada por L'homme *et al.* (2001):

$$\text{Contenido del carbohidrato } (\mu\text{M g}^{-1} \text{ PS}) = \frac{CDVMr}{1000 PS}$$

Donde C es la concentración del carbohidrato presente en la muestra estimado a través de la curva de calibración, D es la dilución que se utilizó, V es el volumen del extracto total, Mr es el peso molecular del carbohidrato a analizar y PS es el peso seco de la muestra.

3.2.5. Determinación de ácido abscísico (ABA) en diferentes estadios del embrión somático

La determinación de ABA se llevó a cabo en 2 réplicas técnicas de 2 experimentos

independientes de cada uno de los 4 estadios de desarrollo del embrión somático (Quiroz-Figueroa *et al.* 2010). Para la extracción de ABA se pesaron 150 mg (peso fresco) de cada estadio de desarrollo del embrión. El tejido fue pulverizado con un mortero y nitrógeno líquido, y seguidamente se añadió 1 mL de HTB (hidroxitolueno butilado) y 1 mL de agua ácida pH de 2.8. La mezcla resultante se transfirió a un vial de cristal de 10 mL y se adicionó 2 mL de acetato de etilo, se agito vigorosamente por 1 min. A continuación, se centrifugó a 2,000 rpm (430 xg) por 5 min a 4°C, después de lo cual se aisló la fase orgánica que se encuentra en la parte superior, y a esta se le adicionó 1 mL de acetato de etilo, se centrifugó nuevamente a 2,000 rpm (430 xg) por 5 min a 4°C, este paso se realizó dos veces. La mezcla resultante es secada con nitrógeno gaseoso aproximadamente por 1 hora. Finalmente, las muestras se suspendieron en 1 mL de la solución de la fase móvil del sistema (70% acetonitrilo: 30% agua y 0.5% de ácido acético).

Para la cuantificación de los niveles de ABA se utilizó un equipo Agilent Technologies 1200, que está compuesto por una bomba cuaternaria conectada a un inyector automático. Para el análisis se usó una columna Phenomenex C₁₈ de fase reversa. Se inyectaron 20 µL de cada muestra extraída y se sometieron a cromatografía por elución isocrática con un flujo de 0.6 ml min⁻¹, para finalmente ser analizadas con el detector de fluorescencia; acoplado al sistema cromatográfico; usando una longitud de excitación de 240 nm y de emisión de 280 nm. Para determinar la concentración de ABA en las muestras se empleó el método de patrón externo. Se construyó una curva estándar de calibración a partir de concentraciones conocidas de ABA (0.0475 nM, 0.25 nM, 0.3562 nM, 0.95 nM, 1.9 nM y 4.75 nM).

3.2.6. Cuantificación de proteínas solubles de embriones somáticos

La extracción de proteínas solubles se basó en el protocolo reportado por Baud *et al.* (2002). Para ello, se maceraron con nitrógeno líquido ~50 mg de embriones somáticos en mortero pre-enfriado, el polvo fino se transfiere a tubo Eppendorf de 2 ml y se pone en cama de hielo para evitar su descongelamiento, y se le adicionan 200 µL del amortiguador de extracción que contiene 50 mM HEPES, 5 mM MgCl₂, 5 mM de DTT, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 10 % Glicerol y 2 % PVPP con un pH 7.5, se agito con ayuda del vortex y se centrifugó a 17,530xg durante 10 minutos a 4°C, trascurrido el tiempo se recuperó el sobrenadante y este se guardó a -80 °C. Para la cuantificación de las muestras se siguió el método reportado por Peterson (1977). Se realizó una curva estándar de albúmina sérica

bovina en un rango de 10 a 50 mg mL⁻¹ y posteriormente con ayuda de la ecuación obtenida se determinó la concentración de proteína de cada estadio de maduración. Se realizó 3 réplicas técnicas por estadio de maduración y tres experimentos independientes.

3.2.7. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos del contenido de peso seco, contenido de agua, contenido de carbohidratos, almidón, contenido de ABA y perfiles de carbohidratos fueron sometidos a un análisis de varianza de una vía (ANOVA) ($P < 0.05$) y seguido de una prueba de comparación de medias con Tukey usando el programa Minitab® Statistical Software (Version 18.0, Minitab ^{inc.})

3. Resultados

Diversos parámetros biológicos, como el peso seco (PS), y contenido de agua, así como otros datos bioquímicos cuantitativos (como los contenidos de carbohidratos solubles totales, de almidón, y de proteínas totales) y los perfiles de carbohidratos y ácido abscísico (ABA) fueron evaluados a lo largo del periodo de desarrollo-maduración de los embriones somáticos de plátano cv. Manzano., Con estos resultados se logró definir las condiciones de cultivo *in vitro* bajo las cuales se logra un mejor desarrollo y maduración del embrión somático.

3.3.1. Contenido de agua y porcentaje de PS de ES durante su desarrollo-maduración

El contenido de agua y % de PS de los embriones somáticos de plátano cv. Manzano durante su desarrollo-maduración en los medios MM1 y MM2 fueron evaluados a los 30, 45, 60, 90 y 120 días (Figura 3.1 y 3.2).

Durante los primeros 30 días de cultivo, los embriones en estadio globular (Glo) no presentaron diferencias significativas en cuanto al contenido de agua, con valores de 6.38 a 6.5 mg H₂O mg⁻¹ PS (Figura 3.1). El porcentaje de PS tampoco varió y se mantuvo en 14 ± 0.9 % (Figura 3.2) en ambos tratamientos. Conforme prosiguió el desarrollo, de 45 a 120 días se observó una marcada disminución en el contenido de agua, así como el aumento en porcentaje PS en ambos tratamientos. Sin embargo, los embriones en el medio MM2 alcanzaron una mayor biomasa, observable como un menor contenido de agua (Figura 3.1)

y un mayor porcentaje de PS (Figura 3.2). De hecho, a partir del estadio de pera (45 días) se presentó una pérdida significativa ($p < 0.5$) del contenido de agua (Figura 3.1), alcanzando valores de hasta 3.8 y 2.9 mg H₂O mg⁻¹ PS a los 120 días de tratamiento en los medios MM1 y MM2, respectivamente. Asimismo, es interesante señalar que el incremento en el porcentaje de PS fue más marcado en los estadios tardíos de desarrollo, coleoptilar temprano (CTem) y tardío (CTar), en ambos tratamientos, siendo significativamente ($p < 0.5$) mayor para los embriones desarrollados en MM2.

Estos resultados evidencian que a lo largo del proceso de maduración ocurre una desecación parcial de los embriones, siendo más significativa en aquellos sometidos al tratamiento MM2. debido a que desde el estadio globular hasta el CTar₁₂₀ hay una pérdida del 54.68% del contenido de agua en comparación con MM1, el cual pierde un 40.62%.

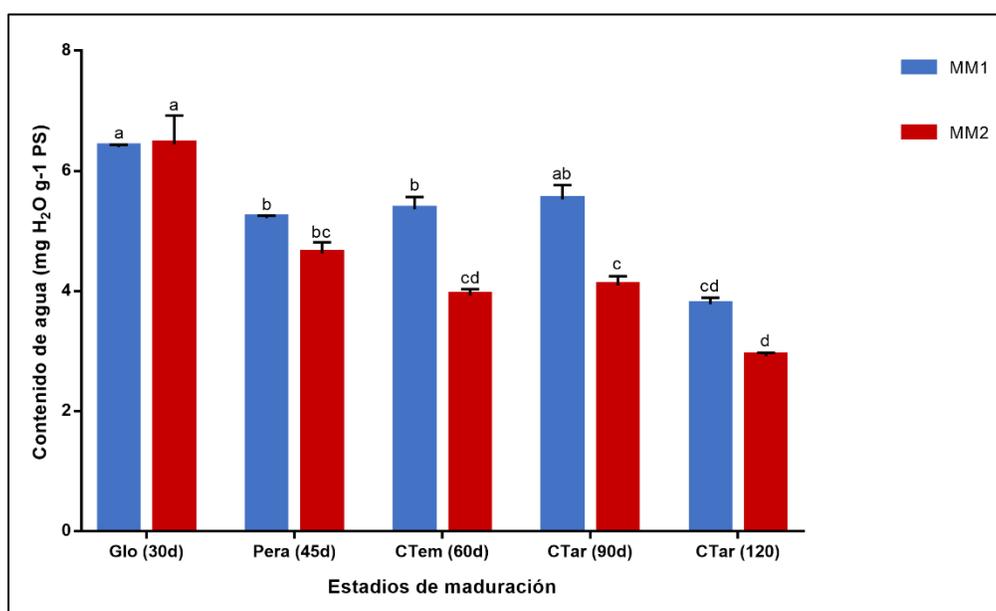


Figura 3.1.- Contenido de agua de embriones somáticos en estadios globular (Glo), Pera, Coleoptilar temprano (CTem) y coleoptilar tardío (CTar), colectados a los 90 y 120 días de cultivo, los medios de maduración MM1 y MM2. Las barras representan el promedio con el error estándar (n=3). Valores con diferentes letras tiene diferencia significativa ($p < 0.05$) de acuerdo con la prueba de Tukey.

Es claro que el contenido de agua es un marcador fisiológico de la maduración de los

embriones somáticos y que va de la mano con la ganancia de PS que ocurre por acumulación de compuestos de reserva durante el proceso de maduración.

El porcentaje de PS de embriones somáticos incrementó de manera significativa ($p > 0.05$) a partir del estadio pera (45 días), siendo del 18 ± 0.6 % para el tratamiento MM2 y 16 ± 0.10 % para MM1. Es notorio que los embriones en estadio CTem provenientes de MM2, tienen un incremento significativo del PS en comparación con el estadio pera, sin embargo, para el tratamiento MM1 no se observa diferencia significativa (Figura 3.2). Estos resultados se observaron en el estadio CTar₉₀ bajo ambos tratamientos. Para finalizar, el incremento en PS de los embriones en estadio CTar₁₂₀ del tratamiento MM2 fue significativo, ya que alcanzaron un valor de 26 %, que representa un incremento de casi 1.9 veces respecto al embrión en estadio globular. Más aún, fue mayor en comparación con el tratamiento MM1, en el cual fue de 21 %. Claramente se observó que con el incremento de agente gelificante en el tratamiento MM2 se favoreció el incremento de PS y la pérdida de agua a partir del estadio pera.

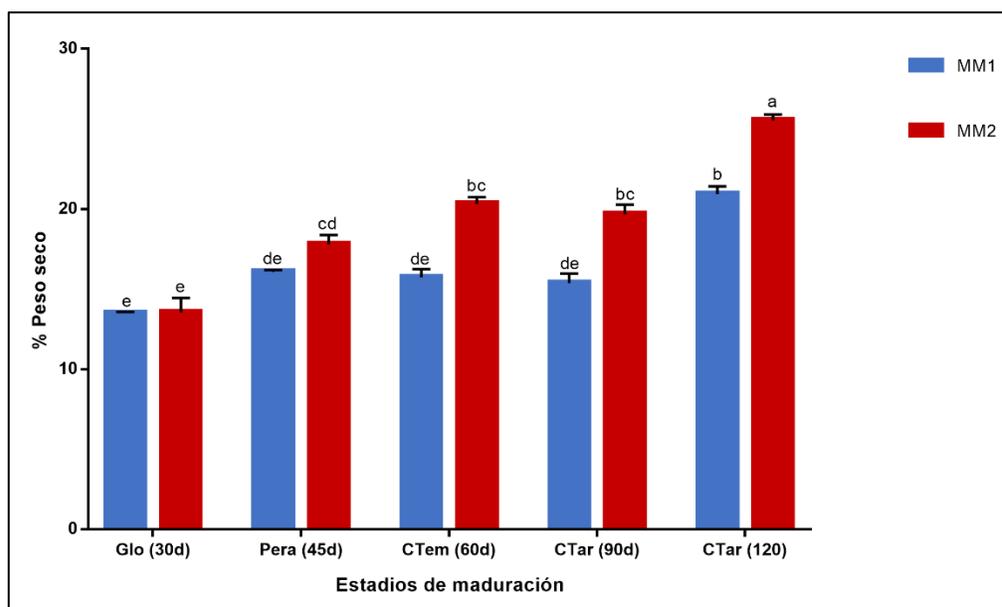


Figura 3.2.- Porcentaje de peso seco (%PS) de embriones somáticos, globular (Glo), Pera, Coleoptilar temprano (CTem) y coleoptilar tardío (CTar) colectados a los 90 y 120 días, en los medios de maduración MM1 y MM2. Las barras representan los promedios con el error estándar (n=3). Valores con diferentes letras tiene

diferencia significativa ($p < 0.05$) de acuerdo con la prueba de Tukey.

3.3.2. Niveles de carbohidratos solubles totales y almidón, y perfiles de carbohidratos de embriones somáticos

La Figura 3.3 a 3.6 presentan los datos de acumulación de azúcares solubles totales (Figura 3.3), almidón (Figura 3.4), y la variación en los perfiles de carbohidratos solubles de los embriones que se desarrollaron bajo los tratamientos MM1 y MM2 (Figuras 3.5 y 3.6).

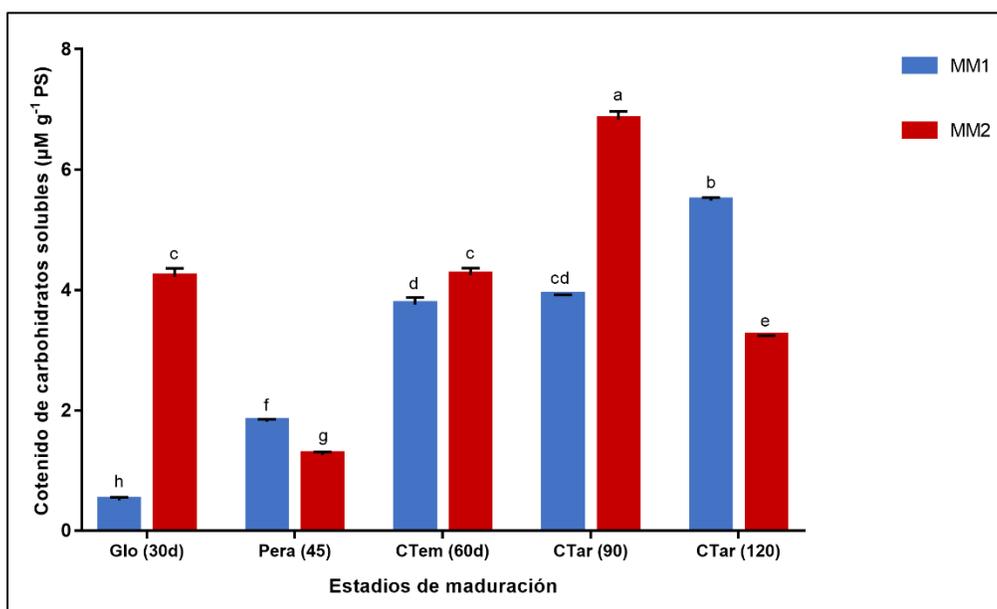


Figura 3.3.- Contenido carbohidratos solubles totales de embriones somáticos, globular (Glo), Pera, Coleoptilar temprano (CTem) y coleoptilar tardío (CTar) colectados a los 90 y 120 días, en los medios de maduración MM1 y MM2. Las barras representan los promedios con error estándar ($n=3$). Valores con diferentes letras tiene diferencia significativa ($p < 0.05$) de acuerdo con la prueba de Tukey.

El contenido de carbohidratos totales mostró variaciones a lo largo del periodo de maduración de los embriones (Figura 3.3). En el tratamiento MM1 la mayor acumulación fue en el estadio CTar₁₂₀ ($5.48\mu\text{M g}^{-1}$ PS) y la menor para el estadio globular ($0.506\mu\text{M g}^{-1}$ PS). En el tratamiento MM2 el mayor y contenido de carbohidratos se observaron en los estadios CTar₉₀ (6.834) y tipo pera (1.261 g^{-1} PS), respectivamente. Sin embargo, en general el contenido de carbohidratos solubles fue mayor en embriones Glo₃₀, y CTemp₆₀ y

CTar₉₀ del tratamiento MM2 que los MM1, con diferencias significativa ($p > 0.05$).

Por otra parte, la acumulación de almidón podría considerarse un marcador fisiológico durante el proceso de maduración de los embriones ya que permitió discriminar que el tratamiento MM2 promovió la mayor acumulación de este carbohidrato no-soluble en los embriones (Figura 3.4).

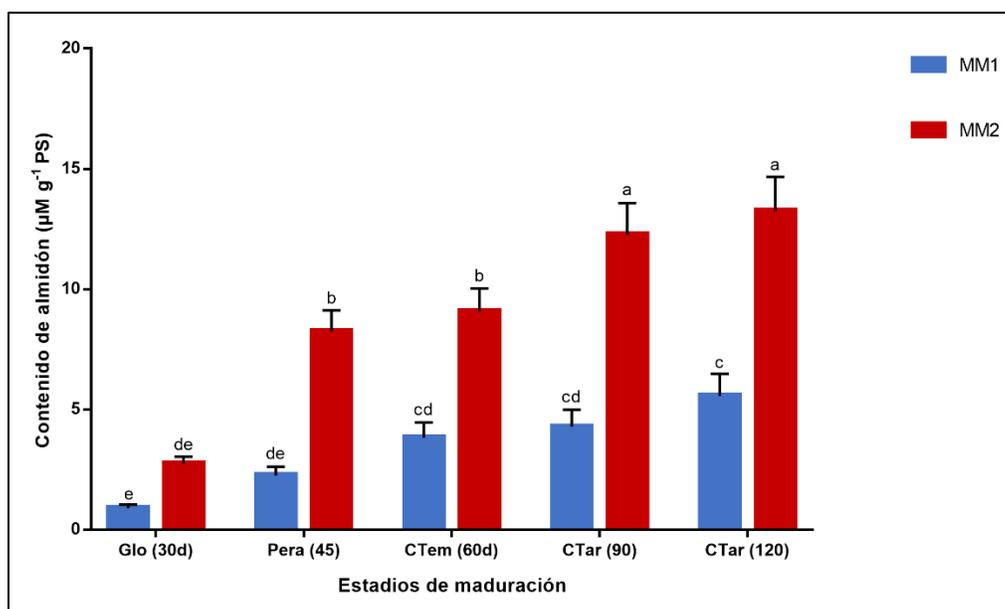


Figura 3.4.- Contenido de almidón de embriones somáticos, globular (Glo), Pera, Coleoptilar temprano (CTem) y coleoptilar tardío (CTar) colectados a los 90 y 120 días, que se desarrollaron en el medio de maduración MM1 y MM2. Las barras representan los promedios con error estándar ($n=3$). Valores con diferentes letras tiene diferencia significativa ($p < 0.05$) de acuerdo con la prueba de Tukey.

El contenido de almidón en los estadios inmaduros del embrión somático, globular y pera, fue bajo en tanto los tratamientos MM1 y MM2, y se incrementó progresivamente hasta su valor máximo en el estadio coleoptilar tardío de 90 y 120 días, encontrándose diferencias significativas entre tratamientos (Figura 3.4). Los embriones del tratamiento MM2, mostraron alrededor de 2.9 y 2.4 veces mayor acumulación de almidón en el estadio CTar₉₀ (12.27 vs 4.28 $\mu\text{M g}^{-1}$ PS de MM1) y en el estadio CTar₁₂₀ (13.25 vs 5.57 $\mu\text{M g}^{-1}$ PS), respectivamente. Estos resultados indican que bajo el tratamiento MM2 se favoreció una

mayor acumulación de almidón en los embriones.

Por otra parte, la Figura 3.5 presenta del perfil de los diferentes carbohidratos; sacarosa, fructuosa y glucosa, rafinosa y estaquiosa, de los embriones somáticos desarrollados bajo el tratamiento MM1. La sacarosa fue el carbohidrato con mayor acumulación en los cuatro estadios de maduración, con un menor contenido en el estadio pera ($1.48 \mu\text{M g}^{-1} \text{PS}$) y una mayor acumulación en el estadio CTar₁₂₀ ($3.87 \mu\text{M g}^{-1} \text{PS}$). Cabe señalar que este fue el único carbohidrato soluble detectado en el estadio globular. En el estadio pera se observó la acumulación de una pequeña cantidad de fructosa y glucosa y también estuvieron presentes los oligosacáridos rafinosa y estaquiosa. El contenido de rafinosa en el estadio pera fue de $0.139 \mu\text{M g}^{-1} \text{PS}$ y se incrementó en los estadios CTem, CTar₉₀, alcanzando el mayor contenido en el CTar₁₂₀ con $1.138 \mu\text{M g}^{-1} \text{PS}$. En el caso de la estaquiosa, se observó un menor contenido en el estadio pera con $0.107 \pm \mu\text{M g}^{-1} \text{PS}$ y una mayor acumulación en el estadio CTar₉₀ con $0.447 \mu\text{M g}^{-1} \text{PS}$. En general, se observó que el perfil de acumulación de carbohidratos en el estadio CTar₉₀ y CTar₁₂₀ se acumuló una mayor diversidad de carbohidratos, lo que sugiere que en este estadio existe un mayor número de compuestos de reservas bajo el tratamiento MM1.

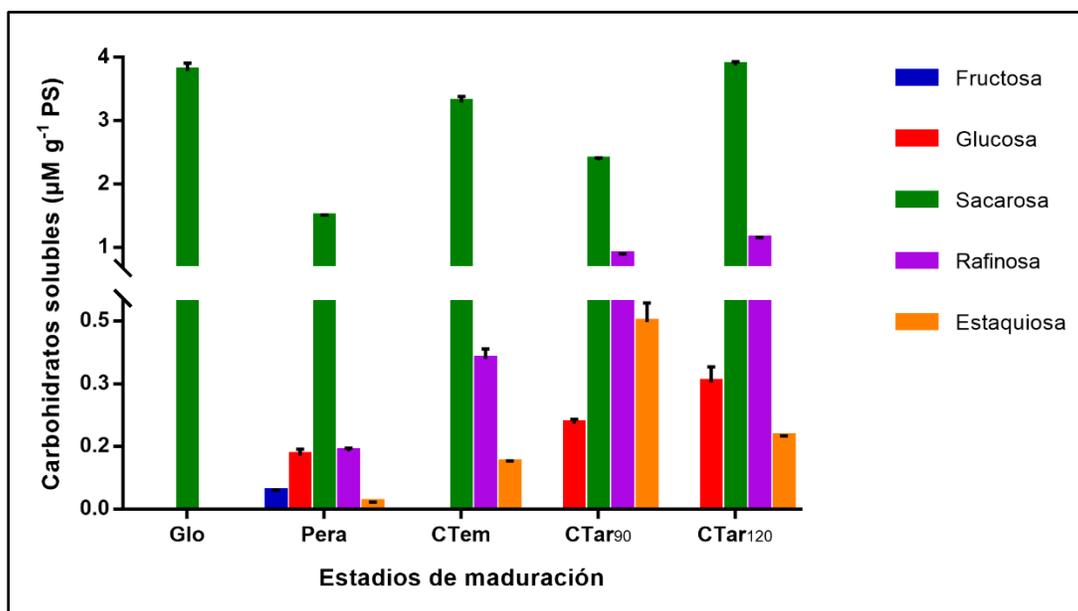


Figura 3.5.- Niveles de carbohidratos solubles en embriones somáticos, globular (Glo), Pera, Coleoptilar temprano (CTem) y coleoptilar tardío (CTar) colectados a los 90 y 120 días, que se desarrollaron en el medio de maduración MM1. Las barras representan los promedios con el error estándar (n=3).

La Figura 3.6 presenta el perfil de carbohidratos solubles, sacarosa, fructuosa y glucosa, y los oligosacáridos rafinosa y estaquiosa, así como el fructano 1-kestosa, presentes en los estadios de maduración de los embriones somáticos bajo el tratamiento MM2.

En el tratamiento MM2 la fructuosa y sacarosa fueron los únicos carbohidratos presentes en el estadio globular, siendo la sacarosa el más abundante en dicho estadio, así como en los otros tres estadios (Figura 3.6). La sacarosa mostró un menor contenido en el estadio pera (1.003 $\mu\text{M g}^{-1}$ PS), incrementándose en el estadio CTar₉₀ (5.35 $\mu\text{M g}^{-1}$ PS). En el caso de la fructosa, presente en los estadios inmaduros (globular y pera), mostró mayor contenido en el estadio globular (0.34 $\mu\text{M g}^{-1}$ PS) y disminuyó en el estadio pera (0.046 $\mu\text{M g}^{-1}$ PS). En el estadio pera se observó la acumulación de rafinosa y estaquiosa, que también se observaron en el tratamiento MM1. El nivel de rafinosa detectada desde el estadio pera (0.099 $\mu\text{M g}^{-1}$ PS) se incrementó durante los siguientes estadios para alcanzar su mayor acumulación en el estadio CTar₉₀ (0.86 \pm $\mu\text{M g}^{-1}$ PS). La estaquiosa se observó en un menor contenido en el estadio pera con 0.049 $\mu\text{M g}^{-1}$ PS, alcanzando su mayor contenido en el

estadio CTar₉₀, con valores de 0.350 $\mu\text{M g}^{-1}$ PS. Cabe señalar que en embriones en el tratamiento MM2, se detectó la presencia del fructano 1-kestosa sólo en el estadio CTar₁₂₀, siendo el primer reporte de la acumulación de este carbohidrato durante la maduración del embrión.

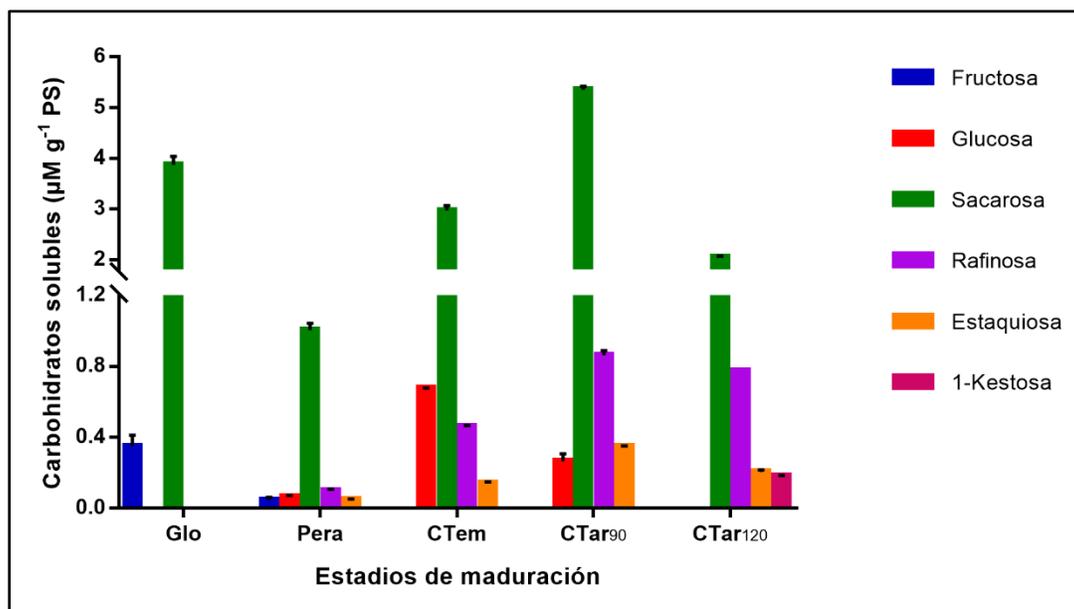


Figura 3.6.- Niveles de carbohidratos solubles en embriones somáticos, globular (Glo), Pera, Coleoptilar temprano (CTem) y coleoptilar tardío (CTar) colectados a los 90 y 120 días, en el medio de maduración MM2. Las barras representan promedios con el error estándar (n=3).

3.3.3. Niveles de ABA en embriones somáticos en desarrollo

Se encontraron niveles endógenos de ácido abscísico (ABA) en los embriones durante su desarrollo-maduración tanto en los tratamientos MM1 y MM2, aunque con diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 3.7). En el estadio globular no se detectó ABA y el pico de mayor acumulación se presentó en el estadio pera, encontrando casi dos veces más contenido de ABA en el tratamiento MM2 (4.2nM g^{-1}) que el tratamiento MM1 (2.2 g^{-1} PF). En el estadio CTem₆₀ se dio una disminución del contenido de ABA en ambos tratamientos, que fue de 2.07 y 3.06 nM g^{-1} PF para MM1 y MM2, respectivamente. Por último, en el estadio CTar₉₀, se observó un ligero incremento en ABA tanto para MM2 y

MM1 (3.45 y 1.74nM g⁻¹ PF, respectivamente). Es importante señalar que la acumulación de ABA fue siempre mayor para los embriones desarrollados en MM2.

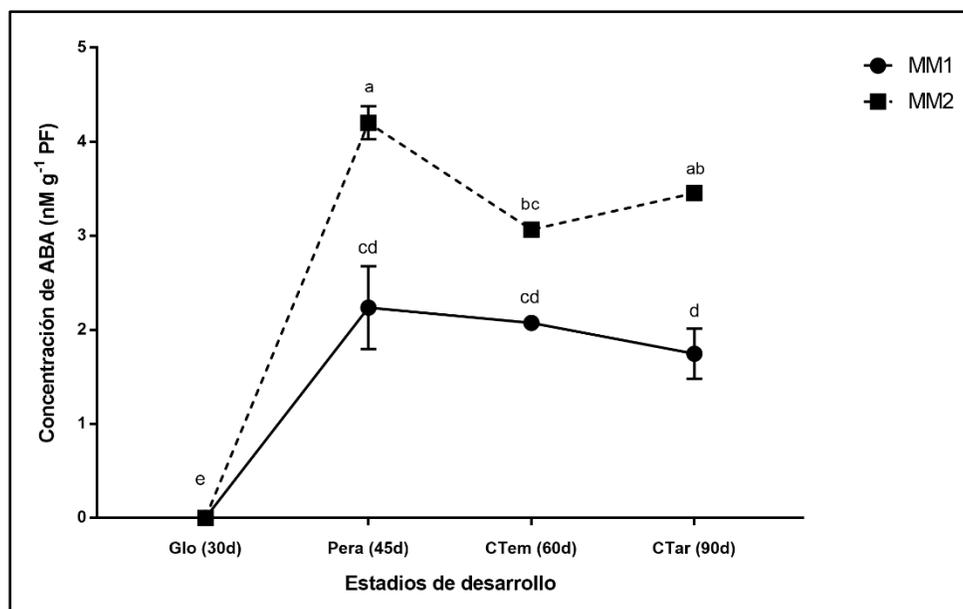


Figura 3.7.- Niveles de ácido abscísico (ABA) en cuatro estadios de maduración del embrión somático bajo los tratamientos MM1 y MM2. Las barras representan promedios con el error estándar (n=3). Valores con diferentes letras tiene diferencia significativa ($p < 0.05$) de acuerdo con la prueba de Tukey.

3.3.4. Niveles de proteínas totales durante la maduración de embriones somáticos

Los niveles de proteínas totales incrementaron con la progresión del desarrollo de los embriones en MM1 y MM2 (Figura 3.8). El contenido de proteínas de los embriones desarrollados en MM1 varió de 10.83 a 17.19 $\mu\text{g mg}^{-1}$ PF del estadio globular a al CTar₁₂₀. Para el tratamiento MM2 dicho contenido fluctuó de 10.21 a 18.74 $\mu\text{g mg}^{-1}$ PF del estadio globular a 18.742 y 18.316 a los estadios CTem₆₀ y CTar₉₀, para disminuir ligeramente a 16.86 $\mu\text{g mg}^{-1}$ PF en el estadio CTar₁₂₀. En ambos tratamientos no hubo diferencias significativas en los contenidos de proteínas en el estadio globular. Sin embargo, durante el estadio tipo pera y CTem₆₀ hubo un incremento significativo en el nivel de proteínas en los embriones MM2, valor que se mantuvo hasta los estadios tardíos.

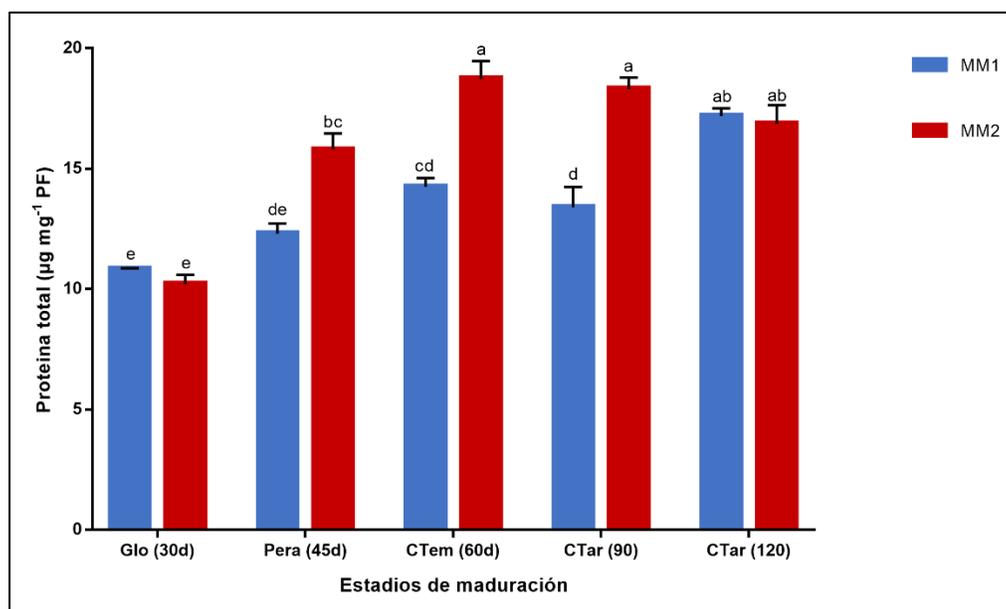


Figura 3.8.- Niveles de proteínas totales en cuatro estadios de maduración del embrión somático durante un curso temporal de 90 días en los tratamientos MM1 y MM2. Las barras representan promedios con el error estándar (n=3). Valores con diferentes letras tiene diferencia significativa ($p < 0.05$) de acuerdo con la prueba de Tukey.

3.4 Discusión

La maduración del embrión somático es una etapa crítica del desarrollo, marcada por un periodo de expansión celular y acumulación de sustancias de reserva (carbohidratos, almidón, aminoácidos, proteínas y lípidos), después de la histodiferenciación. Esto determina la calidad del embrión, el éxito de su germinación, y la regeneración a plántula (Businge *et al.* 2013; Márquez-Martín *et al.* 2011).

En el presente trabajo se estudió el efecto de modificar la concentración de gelificante del medio de desarrollo-maduración sobre la pérdida de agua, el incremento en biomasa (PS), y la acumulación de reservas de almacenamiento en cuatro estadios del desarrollo del embrión somático de plátano, *Musa spp.* AAB cv. Manzano. Para ello, se evaluaron los cambios cuantitativos en parámetros fisiológicos (contenido de agua y biomasa, PS) y bioquímicos (carbohidratos, almidón, proteínas, y niveles endógenos de ABA) a lo largo del

proceso, desde el estadio globular (Glob) del embrión hasta el estadio coleoptilar tardío (CTar₁₂₀). Los resultados aquí reportados pueden explicar las diferencias en la calidad de los embriones CTar₁₂₀, en cuanto a su vigor y capacidad de germinación (Capítulo 2).

Es sorprendente notar que con sólo modificar la concentración de gelificante del medio, (0.2 y 0.3% p/v medios MM1 y MM2 respectivamente), se logró promover en embriones somáticos de una misma línea celular de plátano AAB cv. Manzano cambios en el contenido de agua y PS. Asimismo, los niveles endógenos de carbohidratos solubles totales, almidón y proteínas totales y los perfiles de carbohidratos y ácido abscísico (ABA) variaron respecto del tratamiento a que estuvieron sujetos los embriones.

El contenido de agua de embriones desarrollados en MM1 y MM2 disminuyó de manera gradual. Sin embargo, para el tratamiento MM2 la pérdida de agua fue mayor y se dio en un periodo más temprano; esto es desde el estadio pera hasta el estadio CTar₁₂₀, respecto del MM1. Estos datos sugieren que probablemente existe una rápida pérdida de agua para activar el mecanismo de tolerancia a la desecación (Dronne *et al.* 1997). En embriones cigóticos de *Arabidopsis thaliana*, la pérdida gradual de agua desde la etapa de maduración temprana alcanza su máxima disminución en el estadio de maduración tardío es un proceso natural hacia la adquisición de la tolerancia a la desecación de la semilla.

Por otra parte, nuestros resultados evidenciaron que en ambos tratamientos ocurrió una ganancia en biomasa (peso seco) del embrión. Sin embargo, en embriones del tratamiento MM2 dicha ganancia fue mayor, desde el estadio pera hasta el estadio CTar₁₂₀, con diferencia significativa respecto al tratamiento MM1 (Figura 3.2). Esto sugiere que este tratamiento, además de potenciar la desecación, favoreció una mayor acumulación de biomasa (PS) como consecuencia de la acumulación de compuestos de reserva.

Nuestros resultados apoyan las observaciones de otros autores con relación a que la concentración de gelificante es capaz de modular la toma de agua del medio, generando un ambiente de desecación, lo que a su vez, tiene un efecto positivo en la maduración de los embriones somáticos (Morel *et al.* 2014; Teyssier *et al.* 2011). Teyssier *et al.* (2011) encontraron que el aumento de concentración de gelificante resultó en una reducción de la disponibilidad de agua del medio para los embriones en cultivo de *Larix x eurolepis* (hybrid larch), mismos que después de ocho semanas presentaron valores menores

potencial osmótico y de contenido de agua, así como mayor peso seco mayor. De estos concluyen que esta condición promovió la desecación de los embriones y favoreció su maduración.

El estatus de carbohidratos totales endógenos del embrión somático de plátano en desarrollo osciló de acuerdo con el estadio de maduración y el tratamiento (Figura 3.3). Bajo el tratamiento MM1, los carbohidratos incrementaron desde 0.5 hasta 5.48 $\mu\text{M g}^{-1}$ PS del estadio Glo al CTar₁₂₀, respectivamente. Mientras que bajo del tratamiento MM2, los niveles fluctuaron, esto es, en estadio pera se produjo una disminución de 3.3 veces respecto del estadio globular, y de allí se incrementó 5.4 veces hasta el estadio CTar₉₀ para volver a disminuir en el estadio CTar₁₂₀; es posible que las disminuciones sea reflejo de que estos fueron dirigidos a la ruta glucolítica para el crecimiento del embrión, y a la biosíntesis y acumulación de almidón. Se ha sugerido que los carbohidratos juegan un papel significativo no solo como fuente de carbono, sino también como agente osmótico y traductores de señales que favorece la maduración de los embriones somáticos (Navarro *et al.* 2017; Juan *et al.* 2012; Lipavská *et al.* 2000).

La acumulación de almidón (Figura 3.4) en los embriones somáticos se incrementó desde los estadios tempranos hasta los estadios tardíos en ambos tratamientos. Sin embargo, la acumulación de este carbohidrato no soluble fue siempre mayor en los embriones del tratamiento MM2, particularmente del estadio globular al de pera cuando hubo un incremento de 3 veces mientras que éste fue de sólo 2.2 veces para el tratamiento MM1. La diferencia fue de 2.9 veces mayor almidón acumulado en el estadio CTar₉₀ del tratamiento MM2 respecto a MM1. Se ha sugerido que el almidón acumulado en los estadios tempranos podría ser catabolizado para la formación de compuestos como lípidos (Baud *et al.* 2002). Navarro y colaboradores (Navarro *et al.* (2017) observaron que la acumulación de almidón inicia en los estadios tempranos de proliferación del embrión cigótico y somáticos de *Araucaria angustifolia*, alcanzando su mayor acumulación en los estadios tardíos de maduración, como se observó en nuestro caso, especialmente en el tratamiento MM2. Se ha reportado que el almidón actúa como reserva de energía, promoviendo el crecimiento y el desarrollo en plantas (Yu *et al.* 2018; Juan *et al.* 2012).

Los reportes de la literatura indican que los perfiles de carbohidratos ayudan a identificar líneas celulares que son capaces de producir embriones de alta calidad. Tanto la sacarosa,

principal sacárido como la presencia de oligosacáridos de la familia de la rafinosa (ROFs) tienen un papel fundamental durante la maduración y desecación del embrión (Hudec *et al.* 2016; Iraqi y Tremblay 2001; Lipavská *et al.* 2000).

Este es el primer trabajo que presenta evidencias de la dinámica de los perfiles de carbohidratos durante la maduración de los embriones somáticos de plátano (Figuras 3.5 y 3.6). Es notoria la prevalencia de mayores concentraciones de sacarosa a lo largo del desarrollo/maduración del embrión y la presencia de ROFs (rafinosa y estaquiosa) que se incrementaron a partir del estadio pera y hasta el CTard₁₂₀. Las bajas concentraciones de glucosa y fructosa encontradas en este trabajo coinciden con lo reportado por Businge *et al.* (2012). En dicho reporte, los autores determinaron que la acumulación de metabolitos específicos durante el desarrollo de embriones de *Picea abies*, promueva la maduración de estos y se observó que la acumulación de fructosa durante los estadios de diferenciación conllevó a la producción de embriones con deformidades.

Por otra parte, en el presente trabajo se determinó que la sacarosa es el carbohidrato más abundante en los estadios de maduración. La sacarosa acumulada puede tener un papel importante en vías de señalización, como regulador transcripcional, en el control de almacenamiento y en procesos de diferenciación (Smeekens *et al.* 2010; Gutierrez *et al.* 2007; Smeekens 2000). Así mismos la acumulación de sacarosa tiene papel clave para la adquisición del mecanismo de tolerancia a la desecación, esto fue observado en semillas en desarrollo de *Medicago truncatula* (Buitink *et al.* 2006).

Concomitante a la acumulación de sacarosa, también se detectó la acumulación de rafinosa y estaquiosa en los estadios tardíos de maduración (Figuras 3.5 y 3.6). Los ROFs juegan un papel como osmoprotectores durante eventos de estrés, como estabilizadores de la membrana celular así como depuradores de especies reactivas de oxígeno (Navarro *et al.* 2017; ElSayed *et al.* 2014; Van den Ende y Valluru 2009; Lipavská y Konrádová 2004). Sin embargo, algo que en nuestro trabajo llamó la atención es la detención de 1-kestosa en el estadio CTar₁₂₀ del tratamiento MM2. Este carbohidrato de la familia de los fructanos puede actuar como un estabilizador de membrana durante eventos de estrés e interactuar con otros carbohidratos para mantener la integridad de la célula (Valluru y Van den Ende 2008). La presencia de 1-kestosa, adicional a la de sacarosa y de ROFs posiblemente tenga algún papel en el mantenimiento de la viabilidad de los embriones CTar₁₂₀ del tratamiento MM2.

Este es el primer reporte de la presencia endógena de ABA en embriones somáticos de plátano. Su acumulación se observó a partir del estadio pera; en donde se detectó la mayor acumulación, decreciendo durante los estadios tardíos (Figura 3.7). Los altos contenidos de ABA en estadios tempranos de maduración, sugieren que este regulador tiene la función de prevenir la germinación precoz y promover la acumulación de compuestos de reservas. Esto se ha observado en embriones cigóticos de alfalfa (Fujii *et al.* 1990). Existen reportes de las posibles funciones de ABA como intermediario en la tolerancia a la desecación, en la acumulación de compuestos de reservar, como inhibidor de la germinación precoz y para favorecer la maduración de la semillas (Rai *et al.* 2011).

Concomitante con la acumulación de ABA, se observó la acumulación de oligosacáridos desde el estadio pera. Se ha sugerido que la presencia de ABA en embriones puede activar la ruta de síntesis de oligosacáridos como rafinosa y estaquiosa (Navarro *et al.* 2017). En un reporte publicado por Blöchl *et al.* (2005), se investigó la posible relación de ABA con la acumulación de oligosacáridos en embriones somáticos de *Medicago sativa* L. Se evaluó la adición exógena de ABA (0.05a 50 μ M). Los autores encontraron que al adicionar 5 μ M de ABA ocurrió la acumulación de rafinosa y estaquiosa, siendo 6.9 y 3.7 veces mayor que en el control. Estos resultados sugieren que este efecto se está llevando a cabo durante el desarrollo/maduración de embriones somáticos de plátano cv. Manzano, debido a que se promueve la síntesis endógena de ABA y a su vez se acumulan compuestos implicados en los eventos de maduración como los oligosacáridos.

En el presente trabajo se observó que la acumulación de proteínas totales varió de acuerdo con el estadio de maduración de los embriones, mostrando diferencias significativas entre los tratamientos MM1 y MM2 a partir del estadio de pera hasta el coleoptilar tardío CTar₉₀ (Figura 3.8). En el tratamiento MM2 el mayor contenido se alcanzó en el estadio coleoptilar temprano CTem₉₀, y estos valores se mantuvieron hasta los estadios CTar₉₀ y CTar₁₂₀. En contraste, para el tratamiento MM1 dicho valor se alcanza en el estadio CTar₁₂₀. De los reportes en la literatura se sabe que la acumulación de proteínas totales está relacionado con el estado desarrollo del embrión, incrementándose desde estadios de proliferación hasta estadios tardíos (Jimenez 2001) Esta variación se ha observado en embriones somáticos de *Acca sellowiana* (Cangahuala-Inocente *et al.* 2009).

En resumen, este es el primer trabajo donde se analizaron parámetros fisiológicos y bioquímicos en embriones somáticos de plátano cv. Manzano durante sus cuatro estadios de desarrollo. De los resultados obtenidos, se observó contrastes en el estrés osmótico causado por la reducción en disponibilidad de agua del medio de cultivo para el desarrollo del embrión bajo los tratamientos MM2 y MM1, ya que en el primero se promovió una mayor desecación del embrión (Capítulo 2), y a su vez, una mayor acumulación de compuestos de reserva, *i.e.*, sacarosa, almidón, y proteínas, y de ABA y oligosacáridos. De hecho, las evidencias sugieren que el estrés osmótico y la acumulación de ABA promovieron la adquisición de la tolerancia a la desecación en ambos tratamientos. Sin embargo, fue a más temprana etapa del desarrollo en MM2 que MM1. La presencia de ABA y de oligosacáridos, incluso fructanos en embriones de plátano no ha sido reportado anteriormente, ni para los embriones cigóticos en especies seminíferas ni en embriones somáticos de cultivares comestibles de plátano.

BIBLIOGRAFIA

- Baud, S., J.-P. Boutin, M. Miquel, L. Lepiniec y C. Rochat (2002). An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40, 151-160.
- Blöchl, A., G.G.-d. March, M. Sourdioux, T. Peterbauer y A. Richter (2005). Induction of raffinose oligosaccharide biosynthesis by abscisic acid in somatic embryos of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Science*, 168, 1075-1082.
- Buitink, J., J.J. Leger, I. Guisle, B.L. Vu, S. Wuillème, G. Lamirault, A.L. Bars, N.L. Meur, A. Becker, H. Küster y O. Leprince (2006). Transcriptome profiling uncovers metabolic and regulatory processes occurring during the transition from desiccation-sensitive to desiccation-tolerant stages in *Medicago truncatula* seeds. *The Plant Journal*, 47, 735-750.
- Businge, E., K. Brackmann, T. Moritz y U. Egertsdotter (2012). Metabolite profiling reveals clear metabolic changes during somatic embryo development of Norway spruce (*Picea abies*). *Tree physiology*, 32, 232-244.
- Businge, E., J. Bygdell, G. Wingsle, T. Moritz y U. Egertsdotter (2013). The effect of carbohydrates and osmoticum on storage reserve accumulation and germination of Norway spruce somatic embryos. *Physiologia Plantarum*, 149, 273-285.
- Cangahuala-Inocente, G.C., N. Steiner, S.B. Maldonado y M.P. Guerra (2009). Patterns of protein and carbohydrate accumulation during somatic embryogenesis of *Acacia sellowiana*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44, 217-224.
- Dronne, S., P. Label y M.-A. Lelu (1997). Desiccation decreases abscisic acid content in hybrid larch (*Larix X leptoeuropaea*) somatic embryos. *Physiologia Plantarum*, 99, 433-438.
- EISayed, A., M. Rafudeen y D. Gollack (2014). Physiological aspects of raffinose family oligosaccharides in plants: protection against abiotic stress. *Plant Biology*, 16, 1-8.
- Fujii, J.A.A., D. Slade, R. Olsen, S.E. Ruzin y K. Redenbaugh (1990). Alfalfa somatic embryo maturation and conversion to plants. *Plant Science*, 72, 93-100.
- Gutierrez, L., O. Van Wuytswinkel, M. Castelain y C. Bellini (2007). Combined networks regulating seed maturation. *Trends in Plant Science*, 12, 294-300.
- Hudec, L., H. Konrádová, A. Hašková y H. Lipavská (2016). Norway spruce embryogenesis: changes in carbohydrate profile, structural development and response to polyethylene glycol. *Tree physiology*, 36, 548-561.
- Iraqi, D. y F.M. Tremblay (2001). Analysis of carbohydrate metabolism enzymes and cellular contents of sugars and proteins during spruce somatic embryogenesis suggests a regulatory role of exogenous sucrose in embryo development. *Journal of Experimental Botany*, 52, 2301-2311.

-
- Jimenez, V.M. (2001). Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 13, 196-223.
- Juan, Y., G. Rui-Zi, W. Yong-Qing y Q. Hong-Mei (2012). Dynamic changes of main metabolic substances during anther-derived embryos development in loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl. cv. 'Dawuxing'). *African Journal of Biotechnology*, 11, 9765-9769.
- L'homme, C., J.L. Peschet, A. Puigserver y A. Biagini (2001). Evaluation of fructans in various fresh and stewed fruits by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Journal of Chromatography A*, 920, 291-297.
- Lipavská, H. y H. Konrádová (2004). Somatic embryogenesis in conifers: The role of carbohydrate metabolism. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 40, 23-30.
- Lipavská, H., H. Svobodová, J. Albrechtová, L. Kumstýřová, M. Vágner y Z. Vondráková (2000). Carbohydrate status during somatic embryo maturation in Norway spruce. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 36, 260-267.
- Márquez-Martín, B., R. Sesmero, M.A. Quesada, F. Pliego-Alfaro y C. Sánchez-Romero (2011). Water relations in culture media influence maturation of avocado somatic embryos. *Journal of Plant Physiology*, 168, 2028-2034.
- McCready, R.M., J. Guggolz, V. Silveira y H.S. Owens (1950). Determination of Starch and Amylose in Vegetables. *Analytical Chemistry*, 22, 1156-1158.
- Morel, A., C. Teyssier, J.-F. Trontin, K. Eliášová, B. Pešek, M. Beaufour, D. Morabito, N. Boizot, C. Le Metté, L. Belal-Bessai, I. Reymond, L. Harvengt, M. Cadene, F. Corbineau, M. Vágner, P. Label y M.-A. Lelu-Walter (2014). Early molecular events involved in *Pinus pinaster* Ait. somatic embryo development under reduced water availability: transcriptomic and proteomic analyses. *Physiologia Plantarum*, 152, 184-201.
- Navarro, B.V., P. Elbl, A.P. De Souza, V. Jardim, L.F. de Oliveira, A.F. Macedo, A.L.W. dos Santos, M.S. Buckeridge y E.I.S. Floh (2017). Carbohydrate-mediated responses during zygotic and early somatic embryogenesis in the endangered conifer, *Araucaria angustifolia*. *PLoS ONE*, 12, e0180051.
- Peterson, G.L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical biochemistry*, 83, 346-356.
- Quiroz-Figueroa, F., A. Rodríguez-Acosta, A. Salazar-Blas, E. Hernández-Domínguez, M.E. Campos, N. Kitahata, T. Asami, R.M. Galaz-Avalos y G.I. Cassab (2010). Accumulation of high levels of ABA regulates the pleiotropic response of the nhr1 *Arabidopsis* mutant. *Journal of Plant Biology*, 53, 32-44.
- Rai, M.K., N.S. Shekhawat, Harish, A.K. Gupta, M. Phulwaria, K. Ram y U. Jaiswal (2011).

- The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent progress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 106, 179-190.
- Smeekens, S. (2000). Sugar-induced signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51, 49-81.
- Smeekens, S., J. Ma, J. Hanson y F. Rolland (2010). Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Current Opinion in Plant Biology*, 13, 273-278.
- Teyssier, C., C. Grondin, L. Bonhomme, A.-M. Lomenech, M. Vallance, D. Morabito, P. Label y M.-A. Lelu-Walter (2011). Increased gelling agent concentration promotes somatic embryo maturation in hybrid larch (*Larix x eurolepsis*): a 2-DE proteomic analysis. *Physiologia Plantarum*, 141, 152-165.
- Valluru, R. y W. Van den Ende (2008). Plant fructans in stress environments: emerging concepts and future prospects. *Journal of Experimental Botany*, 59, 2905-2916.
- Van den Ende, W. y R. Valluru (2009). Sucrose, sucrosyl oligosaccharides, and oxidative stress: scavenging and salvaging? *Journal of Experimental Botany*, 60, 9-18.
- Verspreet, J., A. Pollet, S. Cuyvers, R. Vergauwen, W. Van den Ende, J.A. Delcour y C.M. Courtin (2012). A Simple and Accurate Method for Determining Wheat Grain Fructan Content and Average Degree of Polymerization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 2102-2107.
- Yu, L., J. Fan, C. Yan y C. Xu (2018). Starch deficiency enhances lipid biosynthesis and turnover in leaves. *Plant Physiology*, 178, 118-129.

CAPITULO IV

ANALISIS DEL TRANSCRIPTOMA DURANTE LA MADURACION DE EMBRIONES SOMÁTICOS DE BANANO

4.1. INTRODUCCION

La transcriptómica es el estudio del conjunto de genes expresados durante una etapa determinada, abriendo ventanas a estudios sobre la funcionalidad de los genes, la cuantificación de la expresión y de genómica comparativa (Garg y Jain 2013). Gracias a esta herramienta se han podido realizar estudios durante la embriogénesis somática en diversas especies (Cao *et al.* 2017; Jin *et al.* 2014; Yang *et al.* 2012), sin embargo, hasta hoy no existen reportes en *Musa*.

La falta de conocimiento sobre el proceso de desarrollo y maduración del embrión somático de *Musa*, suscitó la pregunta ¿Cuáles son los genes involucrados en el desarrollo del embrión somático y los cambios en su expresión? Nuestra hipótesis plantea que el estrés experimental debido a la desecación parcial promueve el desarrollo y maduración del embrión mediante la regulación de la expresión de genes relacionados con el estrés y evita la proliferación de callo embriogénico.

Para dilucidar los mecanismos moleculares que subyacen al desarrollo y maduración del embrión somático de plátano (AAB, cv. Manzano, subgrupo Silk), se evaluaron los cambios en la abundancia de transcritos mediante secuenciación masiva (RNA-seq) de los estadios de desarrollo del embrión globular (30 días posteriores a la inoculación de suspensión embriogénica en medio de desarrollo-maduración MM), pera (45 d), coleoptilar temprano (CTemp 60d) y coleoptilar tardío (CT 90 y CT120d). Luego de generar el transcriptoma, se obtuvo la información molecular del proceso embriogénico. Este estudio aporta nuevos hallazgos en la regulación del desarrollo/maduración del embrión somático de *Musa* AAB cv. Manzano.

4.2. MATERIALES Y METODOS

4.2.1. Extracción de ARN total

Para la extracción de ARN total se siguió la metodología de Chomczynski y Sacchi (Chomczynski y Sacchi). Se pesaron 100 mg de embriones somáticos provenientes del

tratamiento MM2 en los estadios globular, pera, Ctem₆₀, CTar₉₀ y CTar₁₂₀, y se transfirieron a tubos Eppendorf estériles de 1.5 ml, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su posterior uso.

La extracción de ARN se inició pulverizando el material biológico en un mortero con ayuda de nitrógeno líquido. Se adicionaron 200 µL de TRIZOL al tejido pulverizado y se continuó macerando. La mezcla se transfirió un tubo Eppendorf y se adicionaron 200 µL de Trizol, se mezcló vigorosamente con ayuda del vortex y se incubó en hielo durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo, los tubos fueron centrifugados a 13000 rpm (16060 g) y 4°C durante 15 minutos. El sobrenadante fue transferido a un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se le adicionaron 2/10 volúmenes de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), posteriormente se agitó vigorosamente con ayuda del vortex y la mezcla se centrifugó a 13000 rpm (16060 g) a 4°C durante 20 minutos. El sobrenadante obtenido se transfirió con mucho cuidado a un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se adicionó 1 volumen de isopropanol frío; se agitó por inversión con gentileza; y se incubó a -80 °C durante 30 minutos. Finalizado el tiempo los tubos fueron colocados en hielo durante 5 minutos, posteriormente se centrifugaron a 13000 rpm (16060 g) a 4°C durante 25 minutos. El sobrenadante se desechó y la pastilla formada en la parte inferior del tubo se lavó con 300 µL de etanol 70% (v/v); se agitó por inversión gentilmente y se centrifugó a 13000 rpm (16060 g) a 4°C durante 5 minutos. Este paso se realizó dos veces. Posteriormente se desechó el sobrenadante y se adicionaron 300 µL de etanol 100% frío, se centrifugó a 13000 rpm (16060 g) a 4°C durante 15 minutos. Finalmente se decantó el sobrenadante con precaución y los tubos fueron colocados de manera invertida sobre un papel estéril a temperatura ambiente. La pastilla se disolvió en 50 µL de agua ultrapura y se almacenó a -20°C para su posterior uso. Todo el material de uso, como los morteros, pistilo, puntas y tubos se esterilizaron previamente, por autoclave y por UV para degradar a las nucleasas.

4.2.2. Análisis del ARN total en gel de agarosa

El análisis de la integridad del ARN total fue realizado en un gel de agarosa al 1 % (p/v) con TBE 10X (890 mM de Tris-base, 890 mM de ácido bórico, 20 mM de EDTA) en condiciones desnaturalizantes.

Las muestras de ARN fueron preparadas de la siguiente manera: 1 µL del extracto de ARN

total se mezcló con 4 μL de agua con DEPC y se adicionaron 17 μL del buffer desnaturalizante (2.77 M de formamida, MOPS 10X, 12.3 M de formaldehído). La mezcla se incubó a 65 °C durante 5 minutos y fueron después transferidas a un baño de hielo. Posteriormente se añadieron 2 μL de buffer de carga (50% de glicerol, 1 mM de EDTA, 0.025% de azul de bromofenol, 10 mg/mL de bromuro de etidio) (Rodríguez-García *et al.* 2010). Las condiciones de corrida del gel de agarosa fueron 90 volts durante 30 min. Para analizar la integridad ARN, las bandas fueron observadas con ayuda de un fotodocumentador Biorad.

4.2.3. Análisis de la concentración del ARN total

Para determinar la concentración de ARN total se usó un equipo Nanodrop (modelo 2000). Se cargaron 2 μL de las muestras y se anotaron las lecturas arrojadas por el equipo a longitudes de onda de 230, 260 y 280 nm. Para verificar la pureza del ARN total se analizaron las relaciones 260/230, 260/280 y la concentración de ARN total en ng/ μL presente en la muestra.

4.2.4. Tratamiento con DNasa y purificación del ARN

La secuenciación del ARN total se realizó utilizando plataformas de nueva generación. Para ello, se requiere un ARN libre de ADN genómico. Por ello, el ARN fue tratado con DNasa libre de RNasa (Deoxiribonucleasa I, grado amplificación, de Invitrogen Cat. No. 18068-015). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10 μL , el cual contenía 1 μg de RNA total, 1 μL del amortiguador de reacción 10X DNase I (1X final), 1 U/ μL de DNase I y agua libre de DNasa/RNasas. La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 15 min, y posteriormente se adicionó 1 μL 25 mM EDTA (2.5 mM) y se incubó a 65°C durante 10 minutos para detener la reacción. Un total de 5 μg de RNA de cada estadio de maduración fue tratado como una réplica biológica.

La purificación del ARN se llevó a cabo a partir de 5 μg tratados con DNasa. Como paso inicial se realizó una extracción con un volumen de fenol:cloroformo (1:1)(v/v), se mezcló vigorosamente con un vortex y se centrifugó a 13000 rpm (16060 g) a 4°C durante 20 minutos. Posteriormente, se recuperó el sobrenadante y se adicionaron 1/10 volumen de acetato de sodio 3M (pH 5.2), así como 2.5 volúmenes de etanol absoluto, dejando incubar las muestras a -20 °C durante 2 horas. Al finalizar el tiempo, las muestras fueron

centrifugadas a 13000 rpm (16060 g) a 4°C durante 20 minutos, se desechó el sobrenadante y la pastilla obtenida se lavó con 300 µL de etanol al 70% y las muestras se centrifugaron a 13000 rpm (16060 g) a 4°C durante 5 minutos. Este paso se realizó tres veces y finalmente las muestras se dejaron secando sobre un papel estéril. El ARN purificado se disolvió en 40 µL de agua ultrapura.

4.2.5. Secuenciación de nueva generación usando la plataforma Illumina

Para la secuenciación del ARN total se requirió 3 µg de los cuatro estadios de maduración de embriones del tratamiento MM2, con una dos réplicas biológicas por estadio dando un total de ocho muestras. La secuenciación se realizó a través de la empresa MacroGen (Japon), quienes emplearon el kit TruSeq SBS Kit v3 para la elaboración de las bibliotecas de cDNA y estas últimas fueron secuenciadas en un equipo Hiseq 2000, el cual genera lecturas cortas de 100 pb (pares de bases) con extremos pareados (R1 y R2). Los datos crudos nos fueron enviados a través de la página de la empresa para el análisis del transcriptoma.

4.2.6. Análisis del transcriptoma.

4.2.6.1. Análisis de calidad y filtrado de las secuencias crudas.

Para realizar los análisis bioinformáticos correspondientes se empleó el cluster de supercomputo (Huitzilin) del Instituto de Ecología, A.C., INECOL (Xalapa, Veracruz), este equipo cuenta con 200 procesadores y 5,000,000 gigabites de memoria ram.

Las secuencias pareadas (2x100 pb, forward (R1) y reverse (R2)) generadas por la plataforma de Hiseq2000 fueron analizadas con ayuda del programa Fastx (Version 0.013); el cual analiza su calidad. La calidad se evaluó en formato Phred con un mínimo de Q>30 (Q>30: nos indica que hay un error de secuenciación por cada 1000 pb secuenciadas) y los resultados fueron visualizados en gráficas de cajas (boxplot).

Las secuencias para R1 y R2 fueron filtradas empleando un script de Phyton (<https://github.com/Czh3/NGSTools/blob/master/qualityControl.py>), para descartar secuencias de que no cumplan con un Q>30 en formato Phred. Los parámetros usados son: -q 30 (valor de 30 minino de calidad en formato Phred), -p 90 (porcentaje minino de pares de bases de la secuencia que deben tener calidad) y -a 30 (calidad promedio

estimada para lo largo de la secuencia), por lo que toda aquella secuencia que no cumpliera con los parámetros se descartó.

Obtenidas las secuencias pareadas de R1 y R2 se procedió a formar contigs con las lecturas de R1 y R2 (sobrelapamiento de secuencias pareadas de R1 y R2) con el programa Seqprep (<https://github.com/jstjohn/SeqPrep>), el cual tiene como finalidad converger las secuencias con extremos pareados R1 y R2 para dar como resultado una secuencia de mayor longitud. Los parámetros usados fueron que las secuencias convergentes tuvieran una homología de 20 pb y un tamaño mínimo de 30 pb., Todas aquellas que cumplieron con dichos parámetros fueron almacenadas en una ubicación y aquéllas que no, fueron descartadas.

4.2.6.2. Ensamblado de las secuencias con Trinity.

Las secuencias generadas por el Seqprep sirven para el ensamblado del transcriptoma, el cual se realizó con el programa Trinity (Grabherr *et al.* 2011). Este programa se ha empleado para el ensamblado de transcriptomas *de novo* usando algoritmos de gráficos de Brujin (Li *et al.* 2011).

Los datos generados por el ensamblador Trinity (unigenes) fueron procesados por el programa Deconseq (<http://deconseq.sourceforge.net/>), el cual elimina secuencias contaminantes provenientes de bacterias, virus y hongos que pueden estar presentes durante la extracción del ARN. Se generó una base de datos con secuencias de bacterias, hongos y virus Y se descartaron unigenes que compartían un porcentaje de cobertura del 90% y una identidad del 90% con secuencias provenientes de esas bases de datos.

Los unigenes que cumplieron con el paso anterior se ingresaron al programa Seqclean (<https://sourceforge.net/projects/seqclean/files/>), para descartar unigenes que contengan bases de baja complejidad o extremos N' de baja calidad, así como colas de poli A/T. Las secuencias resultantes de un tamaño de 200 pb o mayor fueron almacenadas para análisis posteriores y aquéllas que no cumplieron con estos parámetros fueron descartadas.

4.2.6.3. Identificación de ORFs y CDS (secuencias codificantes)

Para la identificación de marcos de lecturas abierto (open reading frames; ORFs) y secuencias codificantes (CDS) de los unigenes se utilizó un script de Python

(https://github.com/peterjc/pico_galaxy/tree/master/tools/get_orfs_or_cdss). Este programa genera la secuencia codificante de mayor tamaño para cada unigen, analizando la presencia de un codón de inicio (ATG), así como de los codones de paro (TGA, TAA y TAG). Se empleó como parámetros que cada CDS traducido a secuencia de aminoácidos tenga una longitud mínima de 90 aminoácidos. La salida del programa generó diferentes archivos que contenían los ORFs, los CDS en nucleótidos y la traducción de la secuencia del CDS en aminoácidos, siendo este último el que se empleó para los análisis posteriores.

4.2.6.3. Anotación de unigenes.

Para la anotación del transcriptoma generado, se descargó el genoma secuenciado y disponible de 8 plantas monocotiledóneas las cuales fueron *Musa acuminata* DH Phang (D'Hont *et al.* 2012), *Musa balbisiana* PWK (Davey *et al.* 2013), *Musa itinerans* (Wu *et al.* 2016), *Brachypodium distachyon* (Vogel *et al.* 2010), *Oryza sativa* grupo Japonica (Goff *et al.* 2002), *Setaria itálica* (Zhang *et al.* 2012), *Sorghum bicolor* (Paterson *et al.* 2009) y *Zea mays* (Schnable *et al.* 2009), e incluyendo una planta dicotiledónea la cual fue *Arabidopsis thaliana* (The Arabidopsis Genome 2000), siendo la primera angiosperma en ser secuenciada y siendo la mejor caracterizada hasta el momento. Para la anotación se usó el algoritmo de BLASTp con parámetro un valor de e-value de 10^{-5} .

4.2.6.4. Categorización ontogénica de unigenes de la maduración del embrión somático de cv. Manzano

Posterior a la anotación de los unigenes, se asignaron los términos de ontología de genes (GO: gene ontology;(The Gene Ontology *et al.* 2000), los cuales fueron identificados a través de las proteínas homologas de *Musa acuminata* Phang con ayuda de la base de datos de Agrigo (<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/>). Para analizar y visualizar los términos GO asignados del conjunto global de unigenes del transcriptoma de *Musa cv.* Manzano, se utilizó la herramienta WEGO (<http://wego.genomics.org.cn/>), la cual usa una prueba de chi-cuadrada de Pearson para el conjunto de GO ingresados y finalmente se seleccionaron aquéllos que fueron estadísticamente significativos $p < 0.05$. Concomitante a la búsqueda de los términos GO, se buscó los agrupamientos de ortólogos (KOG) en la base de datos del KASS-KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/kaas/>), usando el método del mejor acierto en el BLAST bidireccional. Obtenidos lo identificadores KOG se hizo la búsqueda de las vías metabólicas del conjunto de unigenes del transcriptoma, en la base de datos KEGG

(https://www.kegg.jp/kegg/tool/map_pathway2.html).

4.2.6.5. Análisis de expresión diferencial de genes implicados en el transcriptoma del embrión somático

Para el análisis de expresión diferencial se utilizó el programa RSEM ((Li y Dewey 2011), el cual se encarga de estimar los niveles de expresión de los genes a partir de las lecturas pareadas. Como primer paso, se realizó un mapeo de las lecturas pareadas (R1 y R2) de cada estadio maduración contra al transcriptoma obtenido. Esto se llevó a cabo con el programa Bowtie2 (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml>). Finalizado lo anterior, se estimó la abundancia relativa de los transcritos mapeados en cada estadio de maduración (<http://deweylab.biostat.wisc.edu/rsem/rsem-calculate-expression.html>). Obtenidos los niveles de abundancia, los datos fueron normalizados para de obtener las cuentas en términos de FPKM (fragmentos kb por millón de lecturas mapeadas), lo cual se utiliza como entrada para el análisis de expresión diferencial a través de DESeq (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq.html>). Para dicho proceso, se realizaron comparaciones entre los diferentes estadios de maduración (globular vs pera, pera vs C_{tem60}, C_{tem60} vs C_{tar90}, C_{tar90} vs C_{tar120}, etc). Para distinguir los genes expresados diferencialmente entre los estadios de maduración analizados, se seleccionaron aquéllos que tuvieran un logaritmo de fold change ($\log_2FC \geq 1$) y un valor de P-value ≤ 0.05 . Aquéllos que no cumplieron con estos parámetros fueron descartados. Con los datos así obtenidos se construyeron graficas de volcano-plot (gráfico de volcán), MA-plot (gráfico MA) y heatmaps (mapas de calor) con la paquetería de Trinity.

Los genes expresados diferencialmente que fueron seleccionados se categorizaron a través de la plataforma de Agrigo (<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/>) y se visualizaron en WEGO (<http://wego.genomics.org.cn/>). Por otro lado, se analizó el agrupamiento de genes expresados diferencialmente en cuatro estadios de maduración y fueron representados por medio de un diagrama de Edwards-Venn (<http://www.interactivenn.net/>).

4.2.6.6. Validación de la expresión génica diferencial durante la maduración del embrión somático

Para la validación del transcriptoma se seleccionaron genes que tuvieran una expresión diferencial en cada estadio de desarrollo. A partir del RNA extraído de cada condición de desarrollo, se realizó la síntesis de cADN de cadena sencilla usando el paquete

SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen™). El diseño de oligonucleótidos (Cuadro 4.1) se realizó a partir de la secuencia de los unigenes seleccionados, empleando para ello el portal del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) (Ye *et al.* 2012). La qPCR se llevó a cabo a partir de 100 ng de ADNc como templado y empleando el paquete Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific™. La reacción de PCR contenía 1X de la mezcla Maxima SYBR Green/ROX (2x), 0.5 μM de los cebadores, 100 ng de ADNc y agua ultrapura, en un volumen final de 10 μL. La amplificación se realizó en un equipo StepONE (Applied Biosystems™) siguiendo como programa de amplificación un primer paso incubando a 50 °C durante 2 minutos, seguido de un ciclo a 95 °C durante 10 minutos; para la activación de la enzima Maxima Hot Start Taq (polimerasa) y posteriormente 40 ciclos a 95 °C por 30 s, T_m (dependiendo de los cebadores) durante 60 s y 72 °C por 30 s cada uno para la desnaturalización del ADN, alineación de cebadores y amplificación, respectivamente. Para finalizar se realizó un ciclo a 72 °C por 10 minutos. Se realizaron tres réplicas biológicas con cuatro réplicas técnicas para cada gen por estadio de maduración. La cuantificación de la expresión relativa se llevó a cabo empleando el método 2^{-ΔΔct} (Livak y Schmittgen 2001) utilizando la actina como gen constitutivo y el estadio globular como control.

Cuadro 4.1.- Genes candidatos para la validación del transcriptoma de la maduración del embrión somático del cv. Manzano. TAR: triptofano aminotransferasa, LEC: leafy cotyledon 1, LEC: leafy cotyledon 2.

Unigen	Función	Secuencias	T _m (°C)
TRINITY_DN82573_c3_g1_i4	Galactinol sintasa 1	5'-CGAGATCGAGCCTGTCTACC-3' 5'-GCGTCCAGGTACACCATCTT-3'	62.5
TRINITY_DN95427_c1_g1_i6	Rafinosa sintasa 1	5'-AAGTTCGGGTGGTGTACCTG-3' 5'-GATTCATGCCTTCCTCATCC-3'	62.5
TRINITY_DN101673_c0_g1_i4	Estaquiosa sintasa	5'-ACTCGCTAGGCAAGTTCAGC-3' 5'-GGGAAGGAGGAGAACGTAGG-3'	62.5
TRINITY_DN83040_c0_g1_i1	AP2/B3	5'-ACCCACAATTTTGCTCTTGG-3' 5'-GTCTCCTTCCTGCGACACTC-3'	62.5
TRINITY_DN101838_c0_g2_i1	TAR2	5'-GCAAGTTCCTGGGGAGAAGA-3' 5'-CACCAGCCCCCTTCTAGTTTA-3'	57
TRINITY_DN91032_c0_g1_i1	LEC1	5'-CAAGCCGAAGTCCGAGAACT-3' 5'-AGCTACAGACCGATCGCATG-3'	57
TRINITY_DN91032_c0_g1_i7	LEC2	5'-CATGCGATCGGTCTGTAGCT-3' 5'-TGACGCTTCGGAACAATGGA-3'	62.5

Tub	5'-TGTTGCATCCTGGTACTGCT-3' 5'-GGCTTTCTTGCACTGGTACAC-3'	60
-----	---	----

4.3. Resultados

4.3.1 Extracción de ARN de los embriones somáticos

La extracción del ARN se realizó en embriones de los cuatro estadios de maduración cv provenientes del tratamiento MM2. El cociente de las absorbancias 260nm/A230nm A280nm de los ARN extraídos van está acorde con los parámetros establecidos de pureza (~2.0), fueron entre 1.8 y 2, indicando la mientras que la absorbancia 260/230nm (>2.0 - 2.2), es una medida secundaria de la pureza de los ácidos nucleicos en términos de; que el contenido de polisacáridos y polifenoles y proteínas (Tabla 4.2). concentración. Los contenidos de ARN fueron 229 y 1827.1 ng μL^{-1} , lo cual sugiere que el protocolo de extracción fue eficiente para nuestro modelo de estudio.

Cuadro 4.1.- Contenido y pureza (Cociente A260/280) del ARN extraído de cuatro estadios de maduración de embriones somáticos de plátano cv. Manzano.

No.	Muestra	Concentración (ng/ μL)	Relación	
			260/280	260/230
1	Globular_1	1827.1	2.0	2.3
2	Globular_2	1868.3	2.0	2.2
3	Pera_1	929.0	2.0	2.3
4	Pera_2	880.8	2.0	2.3
5	CTem_1	639.5	2.0	2.1
6	CTem_2	757.9	2.0	2.1
7	CTar ₉₀ _1	412.0	1.9	2.1
8	CTar ₉₀ _2	229.9	1.9	2.0

Una vez corroborada la pureza del ARN extraído, así como el contenido, se evaluó la integridad mediante un gel de agarosa al 1%.

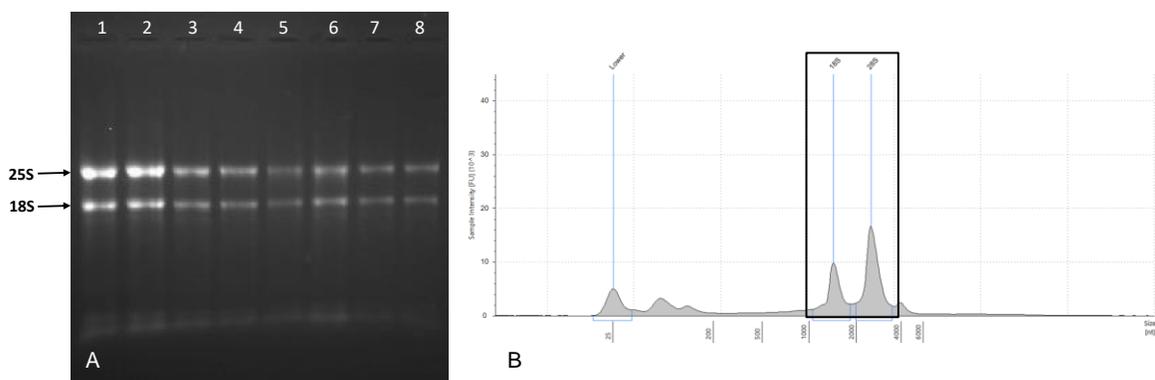


Figura 4.1.- A) Electroforesis en gel de agarosa de los extractos de ARN teñido con bromuro de etidio de los embriones globular (1, 2), tipo pera (3, 4), embrión CTem (5, 6), embrión CTar₉₀ (7, 8). B) Electroferograma del ARN de embriones tipo globular.

En la Figura 4.1 A, se observan las bandas correspondientes a los ARNr 25S y 18S, que se encuentran íntegras y sin rastros de ADN genómico o de degradación. De igual manera fue posible observar que la banda correspondiente al ARN 25S tuvo una mayor intensidad respecto a la banda 18S, indicativo de la buena calidad para la posterior secuenciación. Cabe señalar que el RNA fue separado en un gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes, lo que incrementó la definición de las bandas y se pudo observar con claridad la intensidad de éstas. Estos datos fueron corroborados a través de un bioanalizador 2100 (Agilent), el cual nos arroja como resultado un electroferograma (Figura 4.1 B), correlacionado la concentración de ARN con la fluorescencia detectada, siendo visibles los ARN ribosomales 18S y 25S en forma de picos (señaladas por un rectángulo). Concomitante al electroferograma, el equipo arroja un número de integridad (RIN: number integrity), el cual se considera un valor de integridad del ARN. Para secuenciación por RNAseq el valor de RIN debe tener valores entre 8-10. En este trabajo se obtuvieron valores de RIN superiores a 8 (datos proporcionados por la empresa de secuenciación).

4.3.2 Análisis del transcriptoma

4.3.2.1. Análisis de la calidad, filtrado y ensamblado de las secuencias.

Se generaron un total de 652,066,489 secuencias pareadas de al menos 100 pb (2x100 pb). Estas cubrieron el rango entre 32,610,803 y 48,385,688 de lecturas pareadas (Cuadro

4.2). Previo al ensamblado, las secuencias que no cumplieron los parámetros mínimos de calidad fueron depuradas.

Cuadro 4.2- Lecturas generadas por secuenciación del ARN obtenido de embriones somáticos de Musa en diferentes estados de desarrollo. La secuenciación se realizó en un equipo Hiseq 2000. *Valores de calidad $Q > 30$ en formato Phred.

Estadio	Lecturas crudas	Lecturas filtradas	Lecturas pareadas	Lecturas no pareadas	Lecturas descartadas
Glob1_1_1 (R1)	36,977,537	36,051,979	24,115,554	10,852,699	10,413
Glob1_1_2 (R2)	39,936,001	39,061,995		12,055,486	11,052
Glob2_2_1 (R1)	38,941,669	38,109,413	26,659,566	9,921,798	13,850
Glob2_2_2 (R2)	41,673,796	40,888,922		10,925,870	14,576
Pera1_1_1 (R1)	32,610,803	31,947,167	22,788,461	7,664,343	12,284
Pera1_1_2 (R2)	34,902,671	34,279,263		8,407,211	12,894
Pera2_2_1 (R1)	36,851,539	36,122,652	25,744,962	8,700,518	13,662
Pera2_2_2 (R2)	39,361,435	38,675,465		9,549,483	14,274
CTem1_1_1 (R1)	45,508,326	44,191,313	30,628,206	8,459,985	11,375
CTem1_1_2 (R2)	48,300,954	46,955,933		9,140,328	11,817
CTem2_2_1 (R1)	46,022,727	43,898,337	27,148,446	13,285,400	11,750
CTem2_2_2 (R2)	50,571,040	48,385,688		14,720,282	12,407
CTar90_1_1 (R1)	36,650,937	35,712,625	23,684,723	10,995,132	10,664
CTar90_1_2 (R2)	39,442,357	38,565,716		12,116,677	11,324
CTar90_2_1 (R1)	40,693,529	39,320,867	25,761,984	12,068,948	20,696
CTar90_2_2 (R2)	43,621,168	42,306,226		13,282,131	22,483

Posterior al filtrado se depuró un total el 2.7% de secuencias de baja calidad, obteniendo al final un total de 634,473,561 secuencias, con las cuales se prosiguió para el traslapado de las secuencias mediante el programa SeqPrep. Estas secuencias fueron usadas para converger los extremos pareados de cada biblioteca, así como para las réplicas. Esto generó un total de 206,531,902 de secuencias fusionadas, 172,146,291 secuencias no fusionadas y se descartaron un total de 215,521 de secuencias que no cumplieron con los parámetros aplicados. Una vez realizado lo anterior se prosiguió con el ensamblado.

El ensamblado se llevó a cabo mediante el paquete Trinity, que generó un total de 467,555 unigenes, con tamaño de entre 200 y 10,000 pb observando, un mayor número de los menores en comparación con los de mayor tamaño (Figura 4.2).

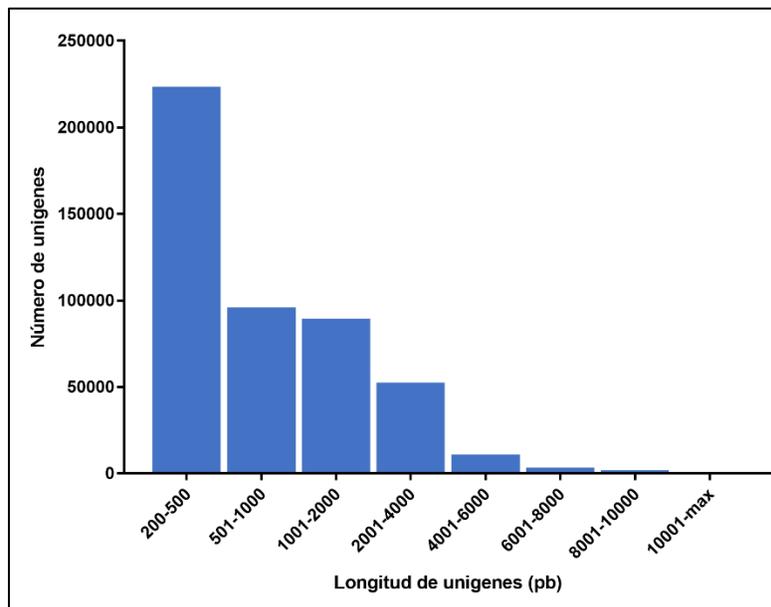


Figura 4.2.- Distribución de tamaño de unigenes expresado en embriones somáticos de *Musa* en diferentes estados de desarrollo. El ensamblaje se realizó mediante el paquete Trinity. El histograma muestra una distribución de tamaños oscilan entre 200 a 10,000 pb.

4.3.2.2. Anotación funcional y clasificación de ontología de genes (GO) de los unigenes.

De los 467,555 unigenes generados por Trinity, y filtrados a través de los programas Deconseq y Seqclean, se obtuvo un total de 465,643 unigenes. Con estos últimos se realizó la búsqueda de secuencias codificantes (cds), con la ayuda de un script de Python dando como resultado un total de 143,189 unigenes (305 del total), los cuales presentaron codones de inicio y de término. Estos resultados pueden deberse a que los unigenes del ensamblado, presentaron regiones no codificantes o codones de paro en la región intergénica (situadas entre los genes), por lo que al ser traducidas generaron secuencias proteicas incorrectas.

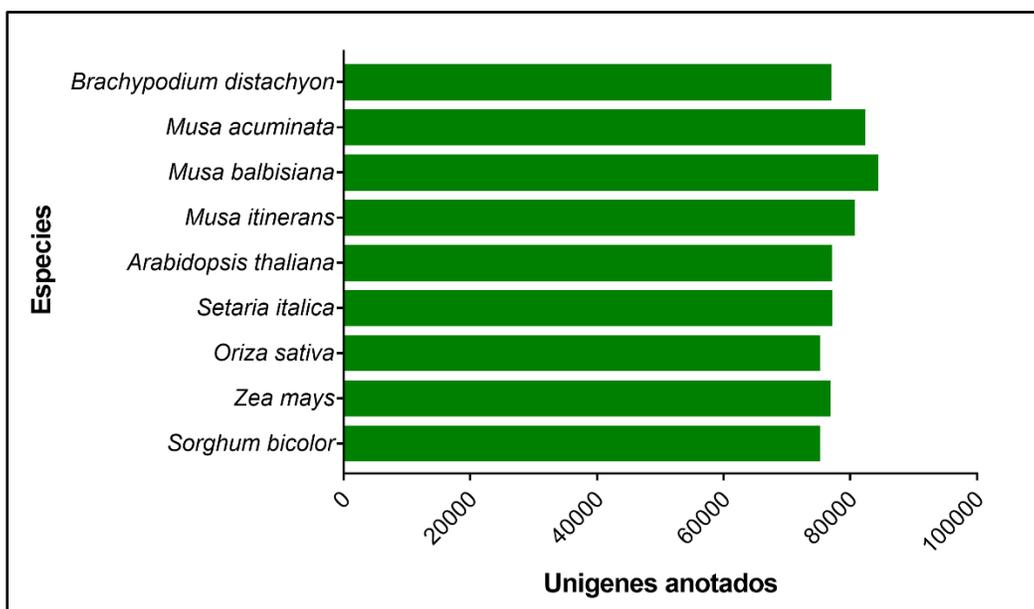


Figura 4.3.- Anotación funcional del transcriptoma de Manzano usando nueve genomas como referencia empleando el algoritmo de BLASTp.

Para la anotación funcional de los unigenes, se usaron nueve genomas de referencia y el algoritmo BLASTp (Figura 4.3). De los 143,189 cds representando los unigenes obtenidos, sólo 87,556 (61.14%) identificaron con alguna función de la especie de referencia (e-value de 10^{-5}). De los 87,556 unigenes anotados, 83,907 mostraron homología con genes de *Musa balbisiana*, 81,926 con *M. acuminata*, seguido de *M. itinerans* con 80,227. Estos resultados eran de esperarse debido a que el cv. Manzano contiene un genoma AAB. De igual manera, se anotó un número significativo de unigenes basados en los genomas de *Zea mays* (87.30%), *Setaria itálica* (87.60) y *Brachypodium distacyon* (87.48%). Por último, se encontró un menor número de unigenes anotados con el genoma de referencia de *Arabidopsis thaliana* (85.27%), lo cual puede deberse a la distancia filogénica entre las dos especies.

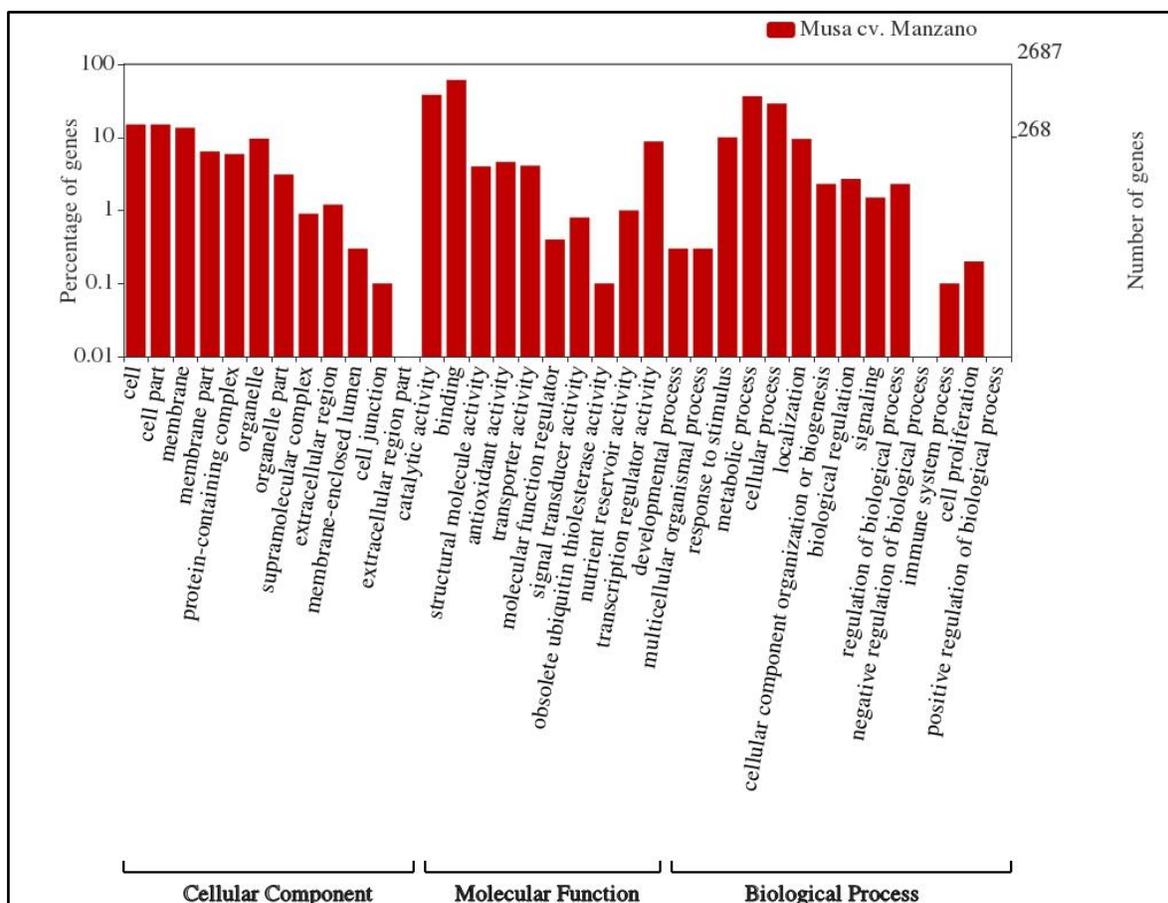


Figura 4.4.- Anotación funcional de los unigenes del transcriptoma de *Musa cv. Manzano* bajo las tres categorías de GO.

Para asignar los términos de ontología de genes (GO) y rutas representadas en el transcriptoma, se empleó el portal del Agrigo (<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/>) y los resultados fueron procesados y visualizados en el WEGO (<http://wego.genomics.org.cn/>)(Figura 4.4). Los términos GO se clasificaron en 36 grupos funcionales, distribuidos en tres categorías; componente celular, función molecular y proceso biológico. Dentro de la categoría de componente celular se encontraron con mayor representación las subcategorías de cell (célula), cell part (parte celular) y membrane (membrana). Para la categoría de función molecular se encontraron las subcategorías de unión y actividad catalítica como las más las representadas. Finalmente, en la categoría de proceso biológico se encontraron los procesos metabólicos, procesos celulares y respuesta a estímulos se encuentran más representadas en comparación con las otras subcategorías.

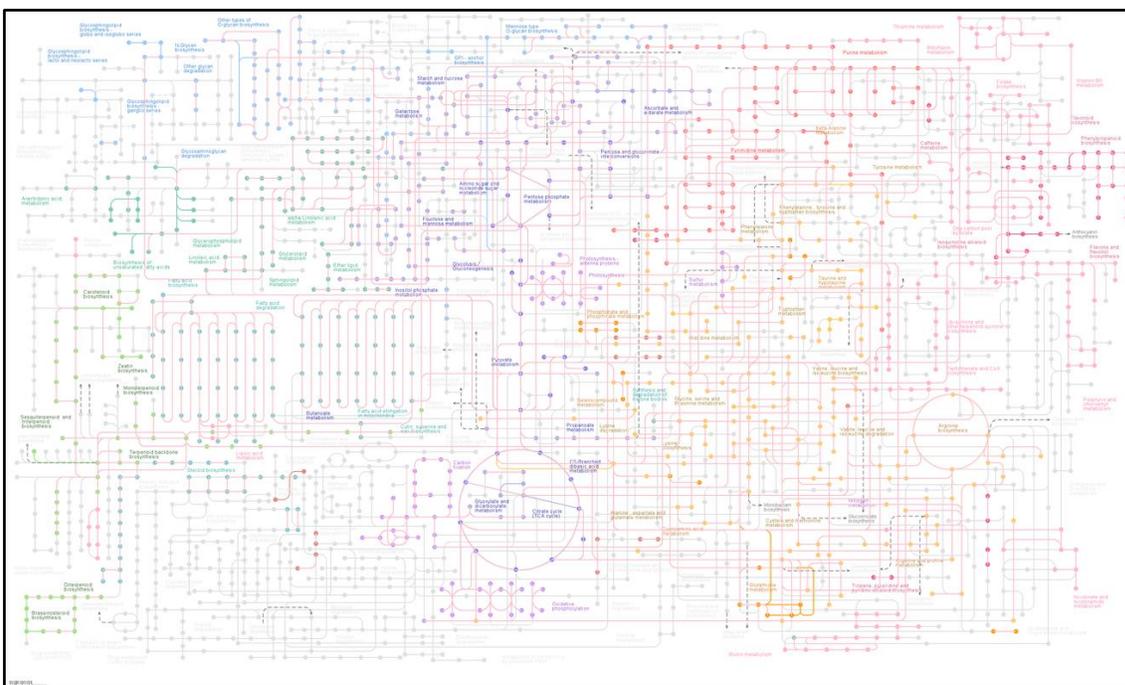


Fig 4.5.- Reconstrucción del mapa metabólico del transcriptoma de *Musa cv. Manzano* a través de la base de datos del KEGG.

Mediante la base de datos del KEGG se realizó la reconstrucción del mapa metabólico del transcriptoma ensamblado del *cv. Manzano* (Figura 4.5). Se obtuvo un total de 11,371 unigenes, anotados, y que se encuentran asociados a 2,472 vías metabólicas referenciadas a 763 términos KEGG (Tabla 1). Entre las vías más representada se encuentran la biosíntesis de metabolitos secundarios, con 1316 secuencias asociados a 363 identificadores (ids) KEGG, transducción de señales de hormonas con 438 secuencias distribuidos en 38 ids, metabolismo de carbohidratos con 347 secuencias asociadas a 92 ids, biosíntesis de aminoácidos con 318 secuencias relacionadas con 97 ids y metabolismo de almidón y azúcares con 212 secuencias asociadas a 30 ids.

4.3.2.3. Análisis de expresión diferencial en estadios de maduración del embrión somático de *Musa cv. Manzano*

El análisis de expresión diferencial se realizó con el mapeo de las lecturas pareadas hacia el transcriptoma obtenido previamente. Este mapeo se llevó a cabo usando las repeticiones biológicas de cada estadio de maduración, con el fin de conocer la abundancia relativa de los transcritos correspondientes a los genes de interés. El total de lecturas mapeadas fueron

65,536, con las posteriormente se generó la matriz con los perfiles de expresión de cada estadio. Los valores de abundancia fueron estimados con el programa RSEM, en el cual cada uno de los unigenes está relacionado con el número de lecturas asignadas en cada estadio de maduración, con su respectiva replica. Finalmente, los valores de expresión normalizados de fragmentos por kilobase por millón de lecturas mapeadas fueron calculados (FPKM)(Tabla2).

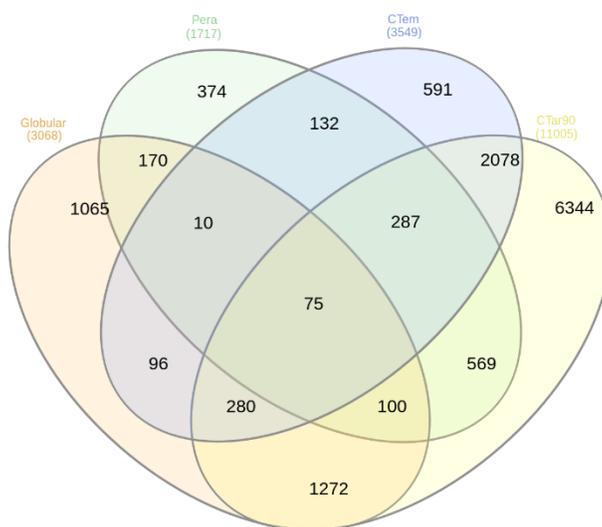


Figura 4.6.- Genes expresados presentes en cuatro estadios de desarrollo del embrión somático de *Musa* cv. Manzano.

Se determinó los genes expresados durante cuatro estadios de maduración (Figura 4.6), observando que algunos son expresados de modo estadio-especifico a lo largo del proceso de maduración. En el estadio globular se expresaron 1065 genes, seguido del estadio pera con 374, 591 en CTem y por último en el estadio CTar₉₀ se expresaron 6344. Estos resultados indican que existen genes con participaciones definidas en cada estadio de maduración, lo que probablemente permitirá comprender los procesos que se llevan a durante la diferenciación de cada estadio. Así mismo, se observaron los genes expresados de manera compartida entre los diferentes estadios de maduración, así, los estadios globular y pera se comparten 170 genes, entre los estadios pera y CTem ocurrieron 132

genes expresados de modo compartido y, entre el C_{Tem} y el C_{Tar₉₀} se compartieron 2078 genes.

De los resultados anteriores, y por medio del bioconductor DESeq, se determinaron los genes expresados diferencialmente en cada estadio de desarrollo. Para determinar esto, se hizo un filtrado con los parámetros del $\log_2\text{FoldChange} > 1$ y $P\text{-value} < 0.05$. Para visualizar estos genes se realizaron gráficas del tipo MA-plot, volcano-plot y así como un mapa de calor, cuya finalidad es representar gráficamente los genes expresados diferencialmente en función del $\log_2\text{FoldChange}$.

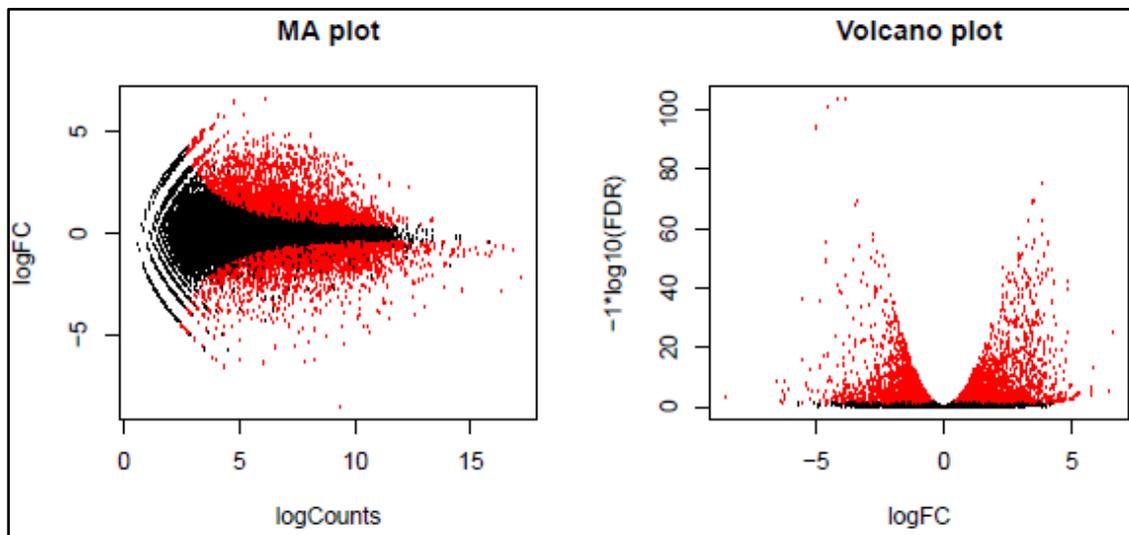


Figura 4.7.- MA plot y Volcano plot de genes expresados diferencialmente entre el estadio globular y pera. logFC (logaritmo del valor de cambio (fold change)), logCounts (logaritmo del número de cuentas o lecturas).

En la Figura 4.7 se observan genes expresados diferencialmente en los estadios globular y pera. Los puntos de color rojo representan los genes con una expresión diferencial significativa ($P < 0.05$) mientras que los de color negro corresponden a genes cuya expresión fue similar en ambos casos.

La Figura 4.8 representa un agrupamiento de los estadios de desarrollo de los embriones, acuerdo a los perfiles de expresión génica. Se observa que los estadios globular y pera se

agrupan en el mismo clado, debido a que son los primeros estadios de diferenciación (división celular y elongación celular). Por otra parte, los estadios CTerm y CTar también se agrupan en un mismo clado, diferente del anterior, ya que sus perfiles de expresión son similares en ambos estadios y en los cuales se ha observado que existe una acumulación de compuestos de reserva durante la maduración del embrión.

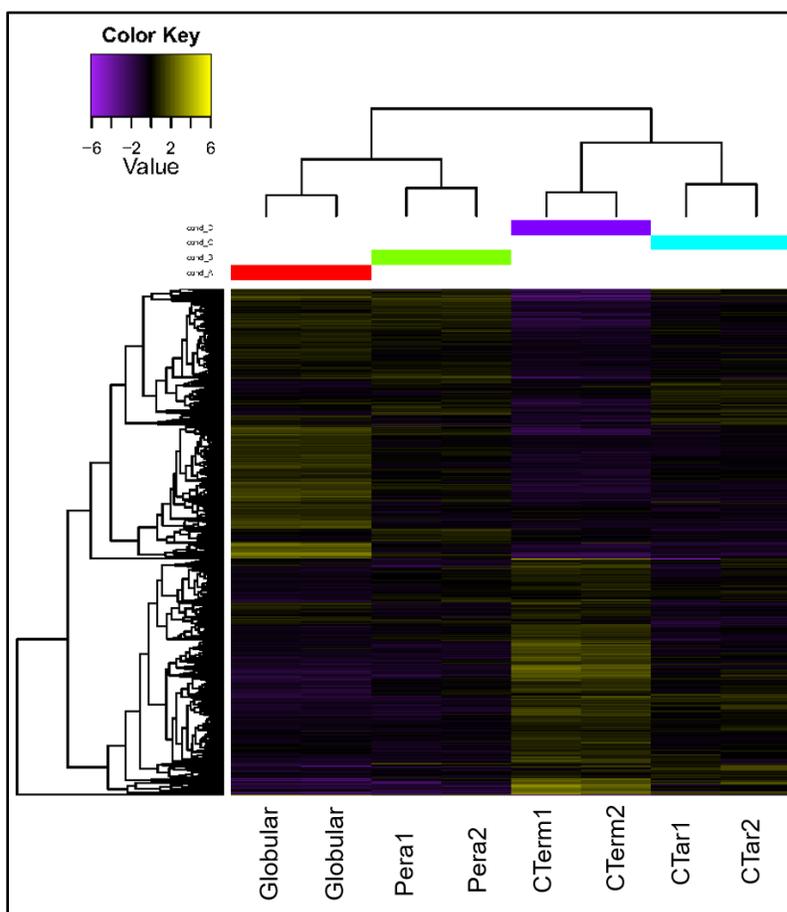


Figura 4.8.- Mapa de calor de los perfiles de expresión de cuatro estadios de maduración del embrión somático de *Musa* cv. Mazano. Los colores amarillo y morado representan valores elevados y bajos de expresión génica diferencial de los estadios CTerm (Coleoptilar temprano), CTerm2 (Coleoptilar tardío de 90 días), CTar1 y CTar2, respectivamente.

Posteriormente, con ayuda de la Bioconductor DESeq, se identificó el número de genes expresados diferencialmente en cada estadio de maduración. Los parámetros de corte fueron el logaritmo del valor de cambio fuera mayor a 1 ($\log_2\text{FoldChange} > 1$) y el valor de P ajustada (p_{adj}) fuera < 0.05 . Se identificaron un total de 1468 genes expresados diferencialmente entre el estadio globular y pera, mientras que para el estadio pera se identificaron 925 genes expresados diferencialmente, 2120 entre el estadio CTem y CTar, y por último se identificaron 5080 genes expresados diferencialmente entre el estadio CTar y globular (Tabla 3).

Cuadro 4.3.- Genes expresados diferencialmente en embriones somáticos de Musa cv. Manzano durante el proceso de maduración; 1: Globular, 2: Pera, 3: CTem, 4: CTar

Ids unigen	log2FoldChange (logaritmo del valor de cambio)	Padj (p ajustada)	Anotación funcional	
TRINITY_DN104557_c1_g3_i1	1.02621679	0.00940039	starch synthase 3, chloroplastic/amyloplastic	
TRINITY_DN92036_c3_g2_i6	1.180732464	0.01506799	Auxin response factor 9	1
TRINITY_DN59760_c0_g1_i2	4.543171087	0.00223205	Heat shock 70 kDa protein	
TRINITY_DN60527_c0_g1_i1	3.622812466	8.2663E-10	Dehydration-responsive element-binding protein 2C	
TRINITY_DN59533_c0_g2_i1	2.390669607	0.00150075	Sucrose synthase 1	
TRINITY_DN100059_c1_g1_i6	1.823799322	0.00133521	Galactinol-sucrose galactosyltransferase	2
TRINITY_DN74512_c0_g2_i3	2.524729506	0.00380513	Ser/Thr receptor-like kinase, putative, expressed	
TRINITY_DN100010_c0_g1_i4	8.706745431	2.3849E-05	Myb-related protein Myb4	
TRINITY_DN101673_c0_g1_i4	2.074287332	0.04984269	Stachyose synthase	
TRINITY_DN82573_c3_g1_i4	2.43226136	1.282298263	Galactinol synthase 1	
TRINITY_DN103425_c5_g1_i1	1.09759779	0.00119005	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 53	
TRINITY_DN83040_c0_g1_i1	2.903094527	0.00447173	AP2 domain containing protein, expressed	
TRINITY_DN95427_c1_g1_i6	1.875972173	0.00071296	Probable galactinol--sucrose galactosyltransferase 1	3
TRINITY_DN91389_c1_g1_i5	3.18346994	0.0331238	stress-induced protein, putative, expressed	
TRINITY_DN96858_c2_g1_i4	3.689367933	0.00023058	Naringenin,2-oxoglutarate 3-dioxygenase	
TRINITY_DN98807_c1_g1_i2	1.487577368	0.00391472	Starch synthase 2, chloroplastic/amyloplastic	
TRINITY_DN105353_c1_g1_i7	2.155360256	0.03556791	starch synthase 4, chloroplastic/amyloplastic	
TRINITY_DN82570_c1_g1_i1	4.930567054	1.9702E-41	Chalcone-flavonone isomerase	4
TRINITY_DN101838_c0_g2_i1	5.239249824	0.00072692	Tryptophan aminotransferase-related protein 2	
TRINITY_DN101673_c0_g1_i4	2.074287332	0.04984269	Stachyose synthase	

En el cuadro 4.3. se observan los genes expresados diferencialmente en los a lo largo de

los estadios de maduración. En el estadio globular se encuentra el factor de respuesta a auxinas 9, el cual está implicado en la regulación de la división celular. De igual manera se encuentra la rafinosa sintasa 1 (galactinol-sucrose galactosyltransferase 1), que participa en la síntesis de rafinosa y otros genes responsivos a deshidratación como proteínas de choque térmico, elementos responsivos a la deshidratación entres otros (Cuadro 4.3). En el estadio pera se encontró nuevamente la rafinosa sintasa 1 y la sacarosa sintasa 1, implicada en la hidrolisis de la sacarosa cuyos productos son fructosa y UDP-glucosa, que tienen un papel clave en el metabolismo de carbohidratos. En el estadio CTem, se encuentran genes interesantes, como una proteína con un dominio AP2 y otras proteínas inducidas por estrés, que se expresan en etapas avanzadas de la maduración de embriones. Por último, en el estadio CTar₉₀ se expresan genes implicados en la ruta de síntesis de almidón, como el almidón sintasa 1 y 4 (starch synthase 2 y 4). De igual manera, se encontró la chalcona sintasa (Chalcone-flavonone isomerase), que está implicada en la ruta de síntesis de flavonoides. Dentro de los genes expresados diferencialmente en el estadio CTar se encontró el triptófano aminotransferasa 2, que participa en la síntesis de ácido indolacético por la vía dependiente de triptófano.

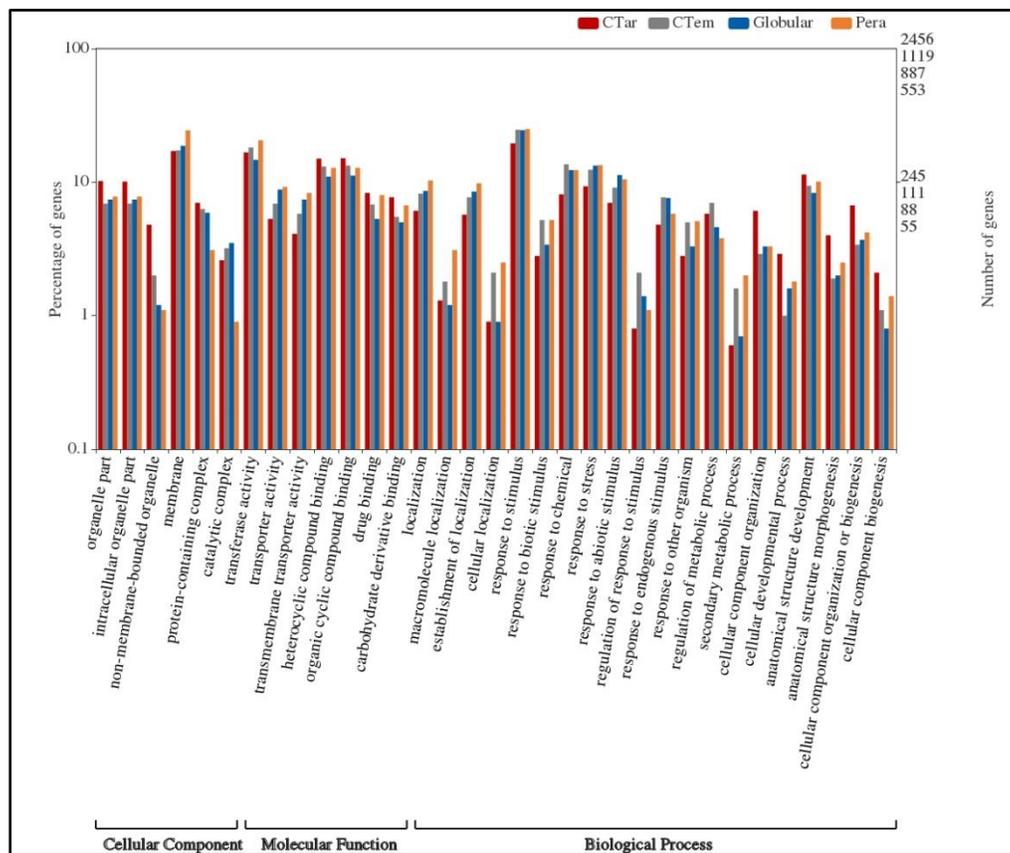


Figura 4.9.- Unigenes expresados diferencialmente asociados a las categorías del GO en 4 estadios de maduración del embrión somático. Prueba de chi-cuadrada con un p -value ≤ 0.05 . CTem (Coleoptilar temprano), CTar (Coleoptilar tardío de 90 días)

Se identificaron los términos GO de los unigenes expresados diferencialmente en los cuatro estadios de desarrollo del embrión somático (Tabla 4). Para ello, se empleó la herramienta WEGO, que hace una prueba de chi-cuadrada de Pearson para organizar las categorías más significativas (Figura 4.9). La categoría de proceso biológico es la más representada, en general. En el estadio globular los procesos más representados fueron las respuestas a químicos, a estrés, a estímulos abióticos y del desarrollo de la anatomía estructural. Para el estadio globular los términos más representados fueron respuesta a estrés, procesos de organización multicelular, de desarrollo y metabólicos. Para el estadio CTem se encontró que los términos con mayor representación fueron de respuestas al estrés, al déficit de agua, a estímulos ambientales y del metabolismo primario. Finalmente, para el estadio

CTar₉₀ los términos con mayor representatción fueron los involucrados en la regulación de procesos biológicos, en las respuestas a estímulos y al estrés y con participación en procesos metabólicos.

4.3.2.4. Validación de genes del transcriptoma por real-time PCR (qPCR)

Se seleccionaron siete genes para validar el transcriptoma, en función del proceso de maduración de los embriones somáticos. La validación del transcriptoma en la comparación de los niveles de transcritos por qPCR con respecto a lo obtenido por el análisis de expresión diferencial obtenido por el programa RSEM. Los genes seleccionados fueron los correspondientes a galactinol sintasa 1 (GS1), rafinosa sintasa 1 (RF1), estaquiosa sintasa (SS), Leafy cotyledon (LEC1), Leafy cotyledon (LEC2), triptófano aminotransferasa 2 (TAR2) y AP2/B3 (Figura 4.10). De los siete genes seleccionados, únicamente cinco mostraron niveles de expresión acorde a la abundancia encontrada en el transcriptoma. Estos fueron los correspondientes RF1, SS, LEC2, TAR2 y AP2/B3. De este modo, los niveles de expresión de los genes correspondientes a GS1 y LEC1 no coincidieron con la abundancia encontrada en el transcriptoma. Esto puede deberse a la diferencia en la sensibilidad entre RNA-seq y la técnica de tiempo real.

Durante el estadio CTem se observó una mayor expresión del gene rafinosa sintasa 1 respecto del control, representado por el embrión globular (Figura 4.10). El resultado obtenido del nivel de expresión de la rafinosa sintasa 1 y la acumulación de rafinosa en el estadio CTem obtenido previamente, nos confirma que durante la maduración del embrión se incrementa los niveles de ARNm del gen para la rafinosa sintasa 1 promoviendo una mayor acumulación de rafinosa.

Por su parte, la estaquiosa sintasa tuvo el máximo nivel de expresión, casi de 3 veces el control durante el estadio CTar₉₀. Los genes AP2/B3 y LEC2 tuvieron una expresión entre 1-1.5 mayor comparado con los controles, lo cual indica que ambos juegan un papel importante durante el desarrollo etapas tardías de maduración del embrión somático. Por último, se observó que el gen de TAR2 tuvo una expresión tres veces mayor en el estadio CTar₉₀ con respecto al estadio control (globular), TAR2 se relaciona con la biosíntesis de ácido indolacético (AIA). Esto sugiere que la acumulación endógena de AIA en el embrión pudiera ocurrir por la vía dependiente de triptófano, siendo el primer reporte en nuestra

especie de estudio.

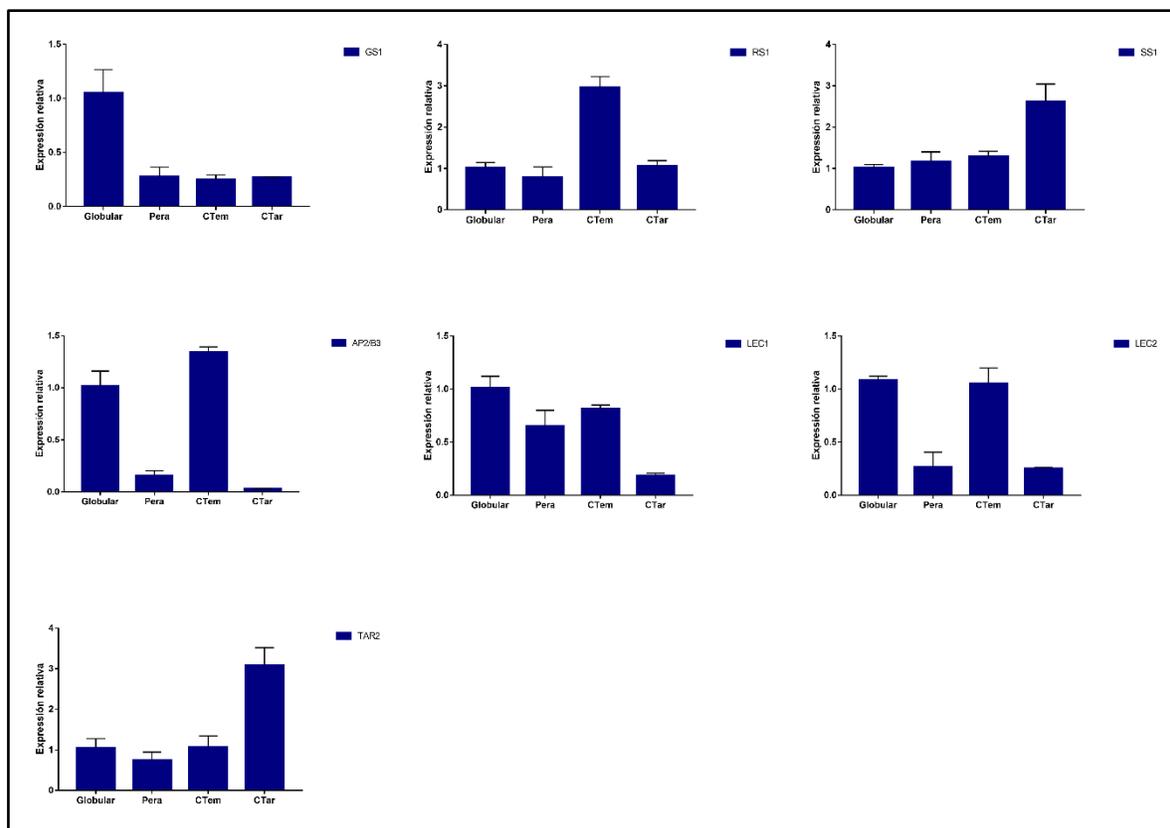


Figura 4.10.- Expresión relativa de genes candidatos validados por tiempo real (qPCR) del transcriptoma de cv. Manzano. Las barras representan el error estándar (n=3), GS1: galactinol sintasa 1, RF1: rafinosa sintasa 1, SS: estaquiosa sintasa, LEC1: leafy cotyledon 1, LEC2: leafy cotyledon 2, TAR: triptofano aminotransferasa 2. CTem: coleoptilar temprano, CTar: coleoptilar tardío (90 días). Las barras indican error estándar (n=3).

4.4 Discusión

Las técnicas de secuenciación masiva de ácidos nucleicos han promovido la identificación de genes de interés en especies de interés agrícola. Un transcriptoma representa el conjunto de transcritos expresados bajo una etapa o condición definida. Esto permite tener una noción acerca de los procesos moleculares por lo que pasa una célula (Wang *et al.*

2009). Si bien esta herramienta ya ha sido usada para entender los procesos moleculares, bioquímicos y fisiológicos durante la embriogénesis somática en diferentes plantas, los trabajos previos se han enfocado en las etapas de tempranas, como las correspondientes a la diferenciación celular (Cao *et al.* 2017), la generación de callo embriogénico (Xu *et al.* 2013), o bien, en análisis comparativos entre embriones somáticos y cigóticos (Jin *et al.* 2014). En este trabajo se analizaron los cambios transcripcionales implicados en cuatro estadios de maduración del embrión somático de *Musa* cv. Manzano, lo que representa el primer reporte de este tipo en esta especie. La herramienta RNA-seq permitió la secuenciación del ARN de embriones de los estadios globular, pera, CTem y CTar, con repeticiones biológicas. La secuenciación se llevó a cabo por la plataforma Hiseq 2000, que generó entre 32,610,803 y 50,571,040 lecturas crudas. El ensamblado *de novo* se realizó por el programa Trinity, dando como resultado un total de 467,555 unigenes.

De los unigenes detectados mediante la plataforma Trinity, únicamente 143,189 incluyeron codones de inicio y de paro. A partir de éstos se realizó la anotación, obteniéndose un total de 87,556 unigenes con presuntos marcos de lectura completos y que permitiera identificar al menos una posible función con alguna de las nueve especies de referencia. Los resultados obtenidos se asemejan a los observados en otros trabajos, en los que el promedio de CDS anotados fue entre el 40 al 60% (Shi *et al.* 2016; Ibarra-Laclette *et al.* 2015; Wu *et al.* 2015). Se identificaron un total de 9,593 genes expresados diferencialmente, siendo el estadio CTar₉₀ el cual hay un mayor número de genes expresados diferencialmente, seguido del estadio CTem, globular y por último el estadio pera.

En el estadio globular se observó la expresión del unigen starch synthase 3, involucrado en la síntesis de almidón (Miao *et al.* 2017; Zhang *et al.* 2008). Esto concuerda con lo observado a nivel morfológico (Figura 2.4), ya que los embriones globulares presentan una morfología blanca-opaca que sugiere la acumulación de almidón. De igual manera, se encontró la expresión de un gen relacionado a un factor de respuesta a auxina 9, que corresponde a un factor transcripcional que modula la expresión de genes responsivos a las auxinas (Li *et al.* 2016). En *Solanum lycopersicum* este gen se encuentra implicado en la regulación de la división celular del fruto, placenta, ovarios y células apicales (de Jong *et al.* 2015).

Durante el estadio pera se identificaron genes relacionados con rutas metabólicas de los oligosacáridos, incluyendo la galactinol sintasa 1 y rafinosa sintasa 1, favoreciendo la acumulación de los metabolitos rafinosa y estaquiosa durante el proceso de desarrollo del embrión cigótico (Baud *et al.* 2002), podrían estar asociados a procesos de desecación (Sengupta *et al.* 2015). La expresión de la rafinosa sintasa 1 concuerda con presencia la rafinosa durante el estadio pera (Figura. 3.6) que se incrementa significativamente en el estadio CTem. Esto se confirmó analizando la expresión relativa de este gen, durante el proceso de embriogénesis cuando se observó una expresión tres veces mayor, respecto al control que fue el estadio globular (Figura. 4.10).

Es interesante observar que se logró identificar el gen de estaquiosa sintasa durante el estadio CTem. La estaquiosa es un oligosacárido que puede sintetizarse durante eventos de estrés, ayudando a estabilizar las membranas (Lipavská *et al.* 2000). De igual manera, se pudo observar la mayor expresión de este gen durante el estadio CTar, en el que se observó una expresión de tres veces mayor, respecto a los controles (Figura. 4.10) y que se correlacionó con la acumulación de rafinosa en este estadio (Figura.3.6).

Los genes AP2/B3 y LEC2 son factores de transcripción homólogos que presentan un dominio B3. Están involucrados en modular la acumulación de compuestos de reservas y en eventos de la maduración en semillas (Roscoe *et al.* 2015; Feeney *et al.* 2013). Shivani y colaboradores analizaron la expresión de gen *LEC2* en etapas tempranas de la embriogénesis somática de enano gigante (AAA), observando una mayor expresión de *LEC2* en callo no embriogénico y una menor expresión en suspensiones celulares (Shivani *et al.* 2017). En este trabajo no se observó un incremento en la expresión de *LEC2* durante la maduración del embrión. Se ha observado que la ausencia de expresión de *LEC2* puede conllevar a un déficit en la acumulación de compuestos de reserva, lo que afectaría el mecanismo de tolerancia a la desecación (Stone *et al.* 2008).

En este trabajo se identificó el gen relacionado a triptófano aminotransferasa (TAR2) en el estadio CTar₉₀ en donde mostró una expresión tres veces mayor respecto al control (Figura. 4.10). TAR2 convierte el L-triptófano en ácido indol3-pirúvico (IPyA) como parte de la biosíntesis del ácido indol-3-acético (IAA) (Won *et al.* 2011). Las auxinas tienen un papel importante en el ciclo de vida de las plantas y se encuentran involucradas en los procesos de diferenciación celular, elongación, senescencia y abscisión de tejidos, al igual que en la

floración (Suzuki *et al.* 2015; Teale *et al.* 2006). En *Arabidopsis thaliana* se han identificado cuatro genes relacionados con TAA1; cual es homólogo a TAR1/TAR2, y que corresponden a triptófano aminotransferasas 1 a 4, todas relacionadas con el desarrollo de las plantas floración, la simetría del embrión y la formación de raíces laterales (Stepanova *et al.* 2008; Tao *et al.* 2008). Por lo anterior es de suma importancia la expresión de TAR2 durante la maduración del embrión somático. La expresión de TAR2 en el estadio CTar₉₀ sugiere la acumulación de AIA endógena, esta última se ha reportado que promueve la formación de los ejes polares (meristemo apical y meristemo radicular)(Berleth y Sachs 2001), favoreciendo el proceso de germinación, que en nuestro se logró alcanzar una tasa de germinación del 95%. La generación del transcriptoma del proceso desarrollo del embrión somático de cv. Manzano abre la posibilidad de posteriores estudios de expresión de genes y genómica comparativa.

BIBLIOGRAFIA

- Baud, S., J.-P. Boutin, M. Miquel, L. Lepiniec y C. Rochat (2002). An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40, 151-160.
- Berleth, T. y T. Sachs (2001). Plant morphogenesis: long-distance coordination and local patterning. *Current Opinion in Plant Biology*, 4, 57-62.
- Cao, A., Y. Zheng, Y. Yu, X. Wang, D. Shao, J. Sun y B. Cui (2017). Comparative Transcriptome Analysis of SE initial dedifferentiation in cotton of different SE capability. *Scientific reports*, 7, 8583.
- Chomczynski, P. y N. Sacchi Single step method of RNA isolation by guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. 1987. *Analyt Biochem*, 162, 156-162.
- D'Hont, A., F. Denoeud, J.-M. Aury, F.-C. Baurens, F. Carreel, O. Garsmeur, B. Noel, S. Bocs, G. Droc, M. Rouard, C. Da Silva, K. Jabbari, C. Cardi, J. Poulain, M. Souquet, K. Labadie, C. Jourda, J. Lengelle, M. Rodier-Goud, A. Alberti, M. Bernard, M. Correa, S. Ayyampalayam, M.R. McKain, J. Leebens-Mack, D. Burgess, M. Freeling, D. Mbeguie-A-Mbeguie, M. Chabannes, T. Wicker, O. Panaud, J. Barbosa, E. Hribova, P. Heslop-Harrison, R. Habas, R. Rivallan, P. Francois, C. Poiron, A. Kilian, D. Burthia, C. Jenny, F. Bakry, S. Brown, V. Guignon, G. Kema, M. Dita, C. Waalwijk, S. Joseph, A. Dievart, O. Jaillon, J. Leclercq, X. Argout, E. Lyons, A. Almeida, M. Jeridi, J. Dolezel, N. Roux, A.-M. Risterucci, J. Weissenbach, M. Ruiz, J.-C. Glaszmann, F. Quetier, N. Yahiaoui y P. Wincker (2012). The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. *Nature*, 488, 213-217.
- Davey, M.W., R. Gudimella, J.A. Harikrishna, L.W. Sin, N. Khalid y J. Keulemans (2013). "A draft *Musa balbisiana* genome sequence for molecular genetics in polyploid, inter- and intra-specific *Musa* hybrids". *BMC genomics*, 14, 683-683.
- de Jong, M., M. Wolters-Arts, B.C.J. Schimmel, C.L.M. Stultiens, P.F.M. de Groot, S.J. Powers, Y.M. Tikunov, A.G. Bovy, C. Mariani, W.H. Vriezen y I. Rieu (2015). *Solanum lycopersicum* AUXIN RESPONSE FACTOR 9 regulates cell division activity during early tomato fruit development. *Journal of Experimental Botany*, 66, 3405-3416.
- Feeney, M., L. Frigerio, Y. Cui y R. Menassa (2013). Following Vegetative to Embryonic Cellular Changes in Leaves of *Arabidopsis* Overexpressing Leafy cotyledon2. *Plant Physiology*, 162, 1881-1896.
- Garg, R. y M. Jain (2013). RNA-Seq for Transcriptome Analysis in Non-model Plants, *en: Legume Genomics* (Rose, Ray J., ed.), Humana Press pp. 43-58.
- Goff, S.A., D. Ricke, T.-H. Lan, G. Presting, R. Wang, M. Dunn, J. Glazebrook, A. Sessions,

-
- P. Oeller, H. Varma, D. Hadley, D. Hutchison, C. Martin, F. Katagiri, B.M. Lange, T. Moughamer, Y. Xia, P. Budworth, J. Zhong, T. Miguel, U. Paszkowski, S. Zhang, M. Colbert, W.-I. Sun, L. Chen, B. Cooper, S. Park, T.C. Wood, L. Mao, P. Quail, R. Wing, R. Dean, Y. Yu, A. Zharkikh, R. Shen, S. Sahasrabudhe, A. Thomas, R. Cannings, A. Gutin, D. Pruss, J. Reid, S. Tavtigian, J. Mitchell, G. Eldredge, T. Scholl, R.M. Miller, S. Bhatnagar, N. Adey, T. Rubano, N. Tusneem, R. Robinson, J. Feldhaus, T. Macalma, A. Oliphant y S. Briggs (2002). A Draft Sequence of the Rice Genome (*Oryza sativa* ssp. japonica). *Science*, 296, 92-100.
- Grabherr, M.G., B.J. Haas, M. Yassour, J.Z. Levin, D.A. Thompson, I. Amit, X. Adiconis, L. Fan, R. Raychowdhury, Q. Zeng, Z. Chen, E. Mauceli, N. Hacohen, A. Gnirke, N. Rhind, F. di Palma, B.W. Birren, C. Nusbaum, K. Lindblad-Toh, N. Friedman y A. Regev (2011). Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. *Nature biotechnology*, 29, 644-652.
- Ibarra-Laclette, E., A. Méndez-Bravo, C.A. Pérez-Torres, V.A. Albert, K. Mockaitis, A. Kilaru, R. López-Gómez, J.I. Cervantes-Luevano y L. Herrera-Estrella (2015). Deep sequencing of the Mexican avocado transcriptome, an ancient angiosperm with a high content of fatty acids. *BMC genomics*, 16, 599.
- Jin, F., L. Hu, D. Yuan, J. Xu, W. Gao, L. He, X. Yang y X. Zhang (2014). Comparative transcriptome analysis between somatic embryos (SEs) and zygotic embryos in cotton: evidence for stress response functions in SE development. *Plant Biotechnology Journal*, 12, 161-173.
- Li, B. y C.N. Dewey (2011). RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*, 12, 323.
- Li, S.-B., Z.-Z. Xie, C.-G. Hu y J.-Z. Zhang (2016). A Review of Auxin Response Factors (ARFs) in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 7, 47.
- Li, Z., Y. Chen, D. Mu, J. Yuan, Y. Shi, H. Zhang, J. Gan, N. Li, X. Hu, B. Liu, B. Yang y W. Fan (2011). Comparison of the two major classes of assembly algorithms: overlap–layout–consensus and de-bruijn-graph. *Briefings in Functional Genomics*.
- Lipavská, H., H. Svobodová, J. Albrechtová, L. Kumstýřová, M. Vágner y Z. Vondráková (2000). Carbohydrate status during somatic embryo maturation in Norway spruce. In *Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 36, 260-267.
- Livak, K.J. y T.D. Schmittgen (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25, 402-408.
- Miao, H., P. Sun, Q. Liu, C. Jia, J. Liu, W. Hu, Z. Jin y B. Xu (2017). Soluble starch synthase III-1 in amylopectin metabolism of banana fruit: characterization, expression, enzyme activity, and functional analyses. *Frontiers in Plant Science*, 8, 454.
- Paterson, A.H., J.E. Bowers, R. Bruggmann, I. Dubchak, J. Grimwood, H. Gundlach, G. Haberer, U. Hellsten, T. Mitros, A. Poliakov, J. Schmutz, M. Spannagl, H. Tang, X. Wang, T. Wicker, A.K. Bharti, J. Chapman, F.A. Feltus, U. Gowik, I.V. Grigoriev, E.

-
- Lyons, C.A. Maher, M. Martis, A. Narechania, R.P. Otilar, B.W. Penning, A.A. Salamov, Y. Wang, L. Zhang, N.C. Carpita, M. Freeling, A.R. Gingle, C.T. Hash, B. Keller, P. Klein, S. Kresovich, M.C. McCann, R. Ming, D.G. Peterson, R. Mehboobur, D. Ware, P. Westhoff, K.F.X. Mayer, J. Messing y D.S. Rokhsar (2009). The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses. *Nature*, 457, 551.
- Rodríguez-García, C., L. Peraza-Echeverría, I. Islas-Flores, B. Canto-Canché y R. Grijalva-Arango (2010). Isolation of retro-transcribed RNA from in vitro *Mycosphaerella fijiensis*-infected banana leaves. *Genetics and Molecular Research*, 9, 1460-1468.
- Roscoe, T.T., J. Guilleminot, J.-J. Bessoule, F. Berger y M. Devic (2015). Complementation of Seed Maturation Phenotypes by Ectopic Expression of ABSCISIC ACID INSENSITIVE3, FUSCA3 and LEAFY COTYLEDON2 in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, 56, 1215-1228.
- Schnable, P.S., D. Ware, R.S. Fulton, J.C. Stein, F. Wei, S. Pasternak, C. Liang, J. Zhang, L. Fulton, T.A. Graves, P. Minx, A.D. Reily, L. Courtney, S.S. Kruchowski, C. Tomlinson, C. Strong, K. Delehaunty, C. Fronick, B. Courtney, S.M. Rock, E. Belter, F. Du, K. Kim, R.M. Abbott, M. Cotton, A. Levy, P. Marchetto, K. Ochoa, S.M. Jackson, B. Gillam, W. Chen, L. Yan, J. Higginbotham, M. Cardenas, J. Waligorski, E. Applebaum, L. Phelps, J. Falcone, K. Kanchi, T. Thane, A. Scimone, N. Thane, J. Henke, T. Wang, J. Ruppert, N. Shah, K. Rotter, J. Hodges, E. Ingenthron, M. Cordes, S. Kohlberg, J. Sgro, B. Delgado, K. Mead, A. Chinwalla, S. Leonard, K. Crouse, K. Collura, D. Kudrna, J. Currie, R. He, A. Angelova, S. Rajasekar, T. Mueller, R. Lomeli, G. Scara, A. Ko, K. Delaney, M. Wissotski, G. Lopez, D. Campos, M. Braidotti, E. Ashley, W. Golser, H. Kim, S. Lee, J. Lin, Z. Dujmic, W. Kim, J. Talag, A. Zuccolo, C. Fan, A. Sebastian, M. Kramer, L. Spiegel, L. Nascimento, T. Zutavern, B. Miller, C. Ambroise, S. Muller, W. Spooner, A. Narechania, L. Ren, S. Wei, S. Kumari, B. Faga, M.J. Levy, L. McMahan, P. Van Buren, M.W. Vaughn, K. Ying, C.-T. Yeh, S.J. Emrich, Y. Jia, A. Kalyanaraman, A.-P. Hsia, W.B. Barbazuk, R.S. Baucom, T.P. Brutnell, N.C. Carpita, C. Chaparro, J.-M. Chia, J.-M. Deragon, J.C. Estill, Y. Fu, J.A. Jeddelloh, Y. Han, H. Lee, P. Li, D.R. Lisch, S. Liu, Z. Liu, D.H. Nagel, M.C. McCann, P. SanMiguel, A.M. Myers, D. Nettleton, J. Nguyen, B.W. Penning, L. Ponnala, K.L. Schneider, D.C. Schwartz, A. Sharma, C. Soderlund, N.M. Springer, Q. Sun, H. Wang, M. Waterman, R. Westerman, T.K. Wolfgruber, L. Yang, Y. Yu, L. Zhang, S. Zhou, Q. Zhu, J.L. Bennetzen, R.K. Dawe, J. Jiang, N. Jiang, G.G. Presting, S.R. Wessler, S. Aluru, R.A. Martienssen, S.W. Clifton, W.R. McCombie, R.A. Wing y R.K. Wilson (2009). The B73 Maize Genome: Complexity, Diversity, and Dynamics. *Science*, 326, 1112-1115.
- Sengupta, S., S. Mukherjee, P. Basak y A.L. Majumder (2015). Significance of galactinol and raffinose family oligosaccharide synthesis in plants. *Frontiers in Plant Science*, 6, 656.
- Shi, X., C. Zhang, Q. Liu, Z. Zhang, B. Zheng y M. Bao (2016). De novo comparative transcriptome analysis provides new insights into sucrose induced somatic embryogenesis in camphor tree (*Cinnamomum camphora* L.). *BMC genomics*, 17, 26.
-

-
- Shivani, P. Awasthi, V. Sharma, N. Kaur, N. Kaur, P. Pandey y S. Tiwari (2017). Genome-wide analysis of transcription factors during somatic embryogenesis in banana (*Musa* spp.) cv. Grand Naine. PLoS ONE, 12, e0182242.
- Stone, S.L., S.A. Braybrook, S.L. Paula, L.W. Kwong, J. Meuser, J. Pelletier, T.-F. Hsieh, R.L. Fischer, R.B. Goldberg y J.J. Harada (2008). *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON2 induces maturation traits and auxin activity: Implications for somatic embryogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105, 3151-3156.
- Suzuki, M., C. Yamazaki, M. Mitsui, Y. Kakei, Y. Mitani, A. Nakamura, T. Ishii, K. Soeno y Y. Shimada (2015). Transcriptional feedback regulation of YUCCA genes in response to auxin levels in *Arabidopsis*. Plant Cell Reports, 34, 1343-1352.
- Teale, W.D., I.A. Paponov y K. Palme (2006). Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 7, 847.
- The Arabidopsis Genome, I. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. Nature, 408, 796.
- The Gene Ontology, C., M. Ashburner, C.A. Ball, J.A. Blake, D. Botstein, H. Butler, J.M. Cherry, A.P. Davis, K. Dolinski, S.S. Dwight, J.T. Eppig, M.A. Harris, D.P. Hill, L. Issel-Tarver, A. Kasarskis, S. Lewis, J.C. Matese, J.E. Richardson, M. Ringwald, G.M. Rubin y G. Sherlock (2000). Gene Ontology: tool for the unification of biology. Nature Genetics, 25, 25-29.
- Vogel, J.P., D.F. Garvin, T.C. Mockler, J. Schmutz, D. Rokhsar, M.W. Bevan, K. Barry, S. Lucas, M. Harmon-Smith, K. Lail, H. Tice, J. Schmutz, J. Grimwood, N. McKenzie, M.W. Bevan, N. Huo, Y.Q. Gu, G.R. Lazo, O.D. Anderson, J.P. Vogel, F.M. You, M.-C. Luo, J. Dvorak, J. Wright, M. Febrer, M.W. Bevan, D. Idziak, R. Hasterok, D.F. Garvin, E. Lindquist, M. Wang, S.E. Fox, H.D. Priest, S.A. Filichkin, S.A. Givan, D.W. Bryant, J.H. Chang, T.C. Mockler, H. Wu, W. Wu, A.-P. Hsia, P.S. Schnable, A. Kalyanaraman, B. Barbazuk, T.P. Michael, S.P. Hazen, J.N. Bragg, D. Laudencia-Chingcuanco, J.P. Vogel, D.F. Garvin, Y. Weng, N. McKenzie, M.W. Bevan, G. Haberer, M. Spannagl, K. Mayer, T. Rattei, T. Mitros, D. Rokhsar, S.-J. Lee, J.K.C. Rose, L.A. Mueller, T.L. York, T. Wicker, J.P. Buchmann, J. Tanskanen, A.H. Schulman, H. Gundlach, J. Wright, M. Bevan, A. Costa de Oliveira, L. da C. Maia, W. Belknap, Y.Q. Gu, N. Jiang, J. Lai, L. Zhu, J. Ma, C. Sun, E. Pritham, J. Salse, F. Murat, M. Abrouk, G. Haberer, M. Spannagl, K. Mayer, R. Bruggmann, J. Messing, F.M. You, M.-C. Luo, J. Dvorak, N. Fahlgren, S.E. Fox, C.M. Sullivan, T.C. Mockler, J.C. Carrington, E.J. Chapman, G.D. May, J. Zhai, M. Ganssmann, S. Guna Ranjan Gurazada, M. German, B.C. Meyers, P.J. Green, J.N. Bragg, L. Tyler, J. Wu, Y.Q. Gu, G.R. Lazo, D. Laudencia-Chingcuanco, J. Thomson, J.P. Vogel, S.P. Hazen, S. Chen, H.V. Scheller, J. Harholt, P. Ulvskov, S.E. Fox, S.A. Filichkin, N. Fahlgren, J.A. Kimbrel, J.H. Chang, C.M. Sullivan, E.J. Chapman, J.C. Carrington, T.C. Mockler, L.E. Bartley, P. Cao, K.-H. Jung, M.K. Sharma, M. Vega-Sanchez, P. Ronald, C.D. Dardick, S. De Bodt, W. Verelst, D. Inzé, M. Heese, A. Schnittger, X. Yang, U.C. Kalluri, G.A. Tuskan, Z. Hua, R.D. Vierstra, D.F. Garvin, Y. Cui, S. Ouyang, Q. Sun, Z. Liu, A. Yilmaz, E. Grotewold, R. Sibout, K. Hematy, G. Mouille,

-
- H. Höfte, T. Michael, J. Pelloux, D. O'Connor, J. Schnable, S. Rowe, F. Harmon, C.L. Cass, J.C. Sedbrook, M.E. Byrne, S. Walsh, J. Higgins, M. Bevan, P. Li, T. Brutnell, T. Unver, H. Budak, H. Belcram, M. Charles, B. Chalhoub y I. Baxter (2010). Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature*, 463, 763.
- Wang, Z., M. Gerstein y M. Snyder (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*, 10, 57-63.
- Won, C., X. Shen, K. Mashiguchi, Z. Zheng, X. Dai, Y. Cheng, H. Kasahara, Y. Kamiya, J. Chory y Y. Zhao (2011). Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASES and YUCCAs in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 18518-18523.
- Wu, G., L. Zhang, Y. Yin, J. Wu, L. Yu, Y. Zhou y M. Li (2015). Sequencing, de novo assembly and comparative analysis of *Raphanus sativus* transcriptome. *Frontiers in Plant Science*, 6.
- Wu, W., Y.-L. Yang, W.-M. He, M. Rouard, W.-M. Li, M. Xu, N. Roux y X.-J. Ge (2016). Whole genome sequencing of a banana wild relative *Musa itinerans* provides insights into lineage-specific diversification of the *Musa* genus. *Scientific reports*, 6, 31586.
- Xu, Z., C. Zhang, X. Zhang, C. Liu, Z. Wu, Z. Yang, K. Zhou, X. Yang y F. Li (2013). Transcriptome Profiling Reveals Auxin and Cytokinin Regulating Somatic Embryogenesis in Different Sister Lines of Cotton Cultivar CCR124. *Journal of Integrative Plant Biology*, 55, 631-642.
- Yang, X., X. Zhang, D. Yuan, F. Jin, Y. Zhang y J. Xu (2012). Transcript profiling reveals complex auxin signalling pathway and transcription regulation involved in dedifferentiation and redifferentiation during somatic embryogenesis in cotton. *BMC Plant Biology*, 12, 110.
- Ye, J., G. Coulouris, I. Zaretskaya, I. Cutcutache, S. Rozen y T.L. Madden (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13, 134-134.
- Zhang, G., X. Liu, Z. Quan, S. Cheng, X. Xu, S. Pan, M. Xie, P. Zeng, Z. Yue, W. Wang, Y. Tao, C. Bian, C. Han, Q. Xia, X. Peng, R. Cao, X. Yang, D. Zhan, J. Hu, Y. Zhang, H. Li, H. Li, N. Li, J. Wang, C. Wang, R. Wang, T. Guo, Y. Cai, C. Liu, H. Xiang, Q. Shi, P. Huang, Q. Chen, Y. Li, J. Wang, Z. Zhao y J. Wang (2012). Genome sequence of foxtail millet (*Setaria italica*) provides insights into grass evolution and biofuel potential. *Nature biotechnology*, 30, 549.
- Zhang, X., N. Szydlowski, D. Delvallé, C. D'Hulst, M.G. James y A.M. Myers (2008). Overlapping functions of the starch synthases SSII and SSIII in amylopectin biosynthesis in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology*, 8, 96-96.
-

CAPITULO V

5.1 CONCLUSIONES

En el presente trabajo se definió un protocolo eficiente de regeneración *in vitro* vía embriogénesis somática indirecta de plátano AAB cv. Manzano (subgrupo Silk). Bajo dicho sistema los embriones somáticos en estadio coleoptilar de 90 días de desarrollo-maduración, en un medio con 0.3% de gelificante y carente de reguladores de crecimiento exógenos, alcanzan tasas de germinación superiores al 92%, y un 100 % de sobrevivencia de las plántulas en invernadero. El potencial de multiplicación masiva del sistema de embriogénesis aquí reportado es 1.2×10^6 ES para 50 mL de suspensión embriogénica por matraz.

Se observó que el aumento de gelificante 0.3% tiene un efecto favorable en el proceso de maduración y favoreciendo la acumulación de compuestos de reserva, como sacarosa, almidón, proteínas y ABA, siendo visible en la morfología de los embriones somáticos.

En el tratamiento MM2 se acumuló una mayor concentración de carbohidratos en comparación con el tratamiento MM1. Estos resultados sugieren que el aumento de gelificante promueve una pérdida gradual de agua promoviendo el mecanismo de tolerancia a la desecación lo cual conlleva a la síntesis y acumulación de compuestos como la rafinosa y estaquiosa.

Con el análisis de perfiles de carbohidratos fue posible identificar la acumulación de kestosa en el tratamiento MM2, la cual posiblemente juegue un papel en la regulación osmótica durante la maduración del embrión, siendo el primer reporte de la presencia de este carbohidrato durante la regeneración *in vitro*.

Este trabajo es el primer reporte ómico en la especie de *Musa*, en el cual se generó un transcriptoma del proceso de maduración del embrión somático del cv. Manzano, siendo posible realizar la anotación funcional de 87,556 unigenes, y de los cuales se identificaron un total de 9,593 genes expresados diferencialmente.

Se validaron 5 genes candidatos expresados en diferentes estadios de maduración, los cuales están implicados en el metabolismo de carbohidratos, aquellos que actúan como

factores de transcripción y relacionados a síntesis de auxinas.

Este es el primer trabajo en el que se identifica TAR2, el cual está involucrado en la síntesis de auxinas, teniendo un papel clave en la maduración del embrión somático y abriendo ventanas a nuevas investigaciones acerca de la acumulación endógena de auxinas en *Musa*.

5.2. Perspectivas

Secuenciar el tratamiento 0.2% para comparar genes expresados diferencialmente versus al tratamiento 0.3%, para analizar los patrones de expresión y conocer genes claves para la maduración del embrión.

Seleccionar genes candidatos del transcriptoma implicados en procesos de interés, con la finalidad de identificar rutas metabólicas de interés para posteriormente caracterizar su función a nivel de proteína.

Realizar un análisis de ortólogos entre el transcriptoma del cv. Manzano con respecto a los genomas secuenciados hasta el momento de *Musa*, con la finalidad de identificar genes que únicamente se expresen durante la maduración del embrión somático.

Realizar análisis proteómicos y metabolómicos, con el fin de complementar y validar lo analizado en este trabajo, lo cual daría una perspectiva más amplia acerca de los procesos implicados en la maduración del embrión somático de *Musa*.