



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**El Papel de los Oligosacáridos en el Desarrollo del
Embrión Somático de *Musa spp.***

Tesis que presenta

Maharshi Ledezma Rodríguez

En opción al título de

MAESTRO 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 de Maharshi Ledezma Rodríguez, titulado “El papel de los oligosacáridos en el desarrollo del embrión somático de *Musa spp*” fue desarrollado en 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 de Plantas, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dra. Clelia De la Peña Seaman

Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 03 de mayo de 2019

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, 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 de Yucatán, 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: _____

Q.F.B. Maharshi Ledezma Rodríguez

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y forma parte del proyecto titulado “El papel de los oligosacáridos en el desarrollo del embrión somático de *Musa spp*” en el que participe bajo la dirección de la Dra. Rosa María Escobedo Gracia Medrano.

AGRADECIMIENTOS

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

Agradezco al CONACyT por la beca otorgada (No. 619063) a lo largo de esta etapa.

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 y de igual manera por darme su apoyo incondicional en todos los sentidos a lo largo de estos años, en los cuales tuvo mucha paciencia y confianza en mí.

A mi comité tutorial conformado por la Dra. Rosa María Escobedo Gracia Medrano, Dra. María de Lourdes Miranda Ham y el Dr. Carlos Iván Cruz Cárdenas por todos los consejos brindados en cada uno de mis exámenes tutoriales para la correcta realización de mi trabajo de investigación.

Al comité evaluador para la obtención del grado prescindido por la Dra. Rosa María Escobedo Gracia Medrano, Dra. María de Lourdes Miranda Ham, Dr. Carlos Iván Cruz Cárdenas, Dr. Felipe Vázquez Flota y Dr. Víctor Manuel Aguilar Hernández, por la revisión y las observaciones hechas a la tesis.

Al M. en C. José Roberto Ku Cauich por su apoyo técnico durante todo el proceso de embriogénesis somática, así como por los consejos y su amistad en estos años.

Al Dr. Adrián José Enríquez Valencia por su ayuda y paciencia durante todo mi trabajo experimental y de análisis, así como por la amistad proporcionada en estos años, haciendo más amena mi estancia en el laboratorio.

A la técnica M. en C. Lucila Aurelia Sánchez Cach por el apoyo técnico al inicio de mi investigación, así como por la amistad brindada durante estos años.

A mis compañeros con los cuales coincidí en el laboratorio 22, así como a los amigos de la UBBMP y otras áreas de CICY con los cuales conviví durante estos años.

DEDICATORIAS

A mis padres en los cuales siempre he tenido su cariño y sus consejos, y a pesar de no siempre estar de acuerdo conmigo y mis decisiones, me apoyan, porque saben que son importantes para mí.

A mi hermana, la cual siempre me alentó para seguir adelante en esta travesía.

A mis abuelos, tíos, tías, primos y demás familiares los cuales siempre creyeron en mí y me alentaron a iniciar esta etapa.

A mis amigos de Tepatlán de Morelos, Jalisco, los cuales, a pesar de la distancia siempre estuvieron ahí, alentándome para seguir adelante y cumplir este sueño.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	4
ANTECEDENTES.....	4
1. MUSÁCEAS	4
1.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL GÉNERO <i>MUSA</i>	5
1.2. MORFOLOGÍA DE LA PLANTA DE PLÁTANO.....	5
1.3. PRODUCCIÓN DE BANANO A NIVEL MUNDIAL Y NACIONAL	7
1.4. PRINCIPALES ENFERMEDADES DE LAS PLANTAS DE PLÁTANO.....	8
1.5. TÉCNICAS BIOTECNOLÓGICAS PARA LA PROPAGACIÓN DEL PLÁTANO	9
1.5.1. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA	9
1.6. MOLÉCULAS DE RESERVA DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO	10
1.6.1. CARBOHIDRATOS	10
1.6.2. PROTEÍNAS	12
1.6.3. LÍPIDOS	12
1.6.4. OLIGOSÁCARIDOS DE LA FAMILIA DE LA RAFINOSA (RFO´s)	12
1.7. ESTRUCTURA QUÍMICA Y BIOSÍNTESIS	13
1.8. REGULACIÓN DEL GEN DE LA GALACTINOL SINTASA.....	15
1.8.1. REGULACIÓN POR FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE CHOQUE TÉRMICO	16
1.8.2. REGULACIÓN MEDIADA POR PROTEÍNAS WRKY.....	17

1.8.3. REGULACIÓN POR RETENCIÓN DE INTRÓN	17
1.9. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS RFO´s.....	18
JUSTIFICACIÓN	19
HIPÓTESIS.....	20
OBJETIVO GENERAL	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	21
DISEÑO EXPERIMENTAL	23
BIBLIOGRAFÍA.....	24
CAPÍTULO II	31
OPTIMIZACION DEL PROTOCOLO DE MADURACIÓN DEL EMBRION SOMÁTICO DE PLÁTANO MACHO CV. “CURRARÉ ENANO”	31
2.1 INTRODUCCIÓN	31
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	32
2.2.1 MATERIAL VEGETAL.....	32
2.3 METODOLOGÍA.....	32
2.3.1 PROLIFERACIÓN DEL CALLO EMBRIOGÉNICO	32
2.3.2 INDUCCIÓN DE LA SUSPENSIÓN CELULAR EMBRIOGÉNICA	33
2.3.3 SUBCULTIVO Y MANTENIMIENTO DE LA SUSPENSIÓN CELULAR EMBRIOGÉNICA	33
2.3.4 MEDIO DE MADURACIÓN DE LOS EMBRIONES SOMÁTICOS.....	34

2.3.5 GERMINACIÓN DE LOS EMBRIONES SOMÁTICOS	34
2.3.6 ANÁLISIS DE DATOS.....	35
2.4 RESULTADOS	35
2.4.1 INDUCCIÓN DE LA SUSPENSIÓN CELULAR EMBRIOGÉNICA A PARTIR DE CALLO EMBRIOGENICO DE PLÁTANO MACHO CV. “CURRARÉ ENANO”	35
2.4.2 DESARROLLO DE EMBRIONES SOMÁTICOS EN MEDIO DE MADURACIÓN...	36
2.4.3 GERMINACIÓN	38
2.5 DISCUSIÓN.....	40
BIBLIOGRAFÍA.....	42
CAPÍTULO III	45
CAMBIOS FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS EN EL EMBRIÓN SOMÁTICO DE PLÁTANO MACHO CV. “CURRARÉ ENANO” DURANTE SU DESARROLLO/MADURACIÓN.	45
3.1 INTRODUCCIÓN	45
3.2 MATERIALES Y METODOS	46
3.2.1 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE AGUA Y PORCENTAJE DE PESO SECO EN LOS EMBRIONES SOMÁTICOS DE PLÁTANO MACHO CV. “CURRARÉ ENANO”.	46
3.2.2 EXTRACCIÓN DE CARBOHIDRATOS TOTALES.....	46
3.2.3 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS SOLUBLES POR HPLC-RID	47
3.2.4 ESTÁNDARES Y CURVAS DE CALIBRACIÓN	47
3.2.5 PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN	48

3.2.6 ANALISIS ESTADÍSTICO	48
3.3 RESULTADOS	48
3.3.1 PORCENTAJE DE PESO SECO Y CONTENIDO DE AGUA DURANTE EL DESARROLLO-MADURACIÓN DE LOS EMBRIONES SOMÁTICOS	48
3.3.2 TIEMPOS DE RETENCIÓN Y PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN	51
3.3.3 CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS SOLUBLES TOTALES.....	52
3.4 DISCUSIÓN.....	54
BIBLIOGRAFIA.....	58
CAPÍTULO IV.....	60
EXPRESIÓN DEL GEN GALACTINOL SINTASA EN CUATRO ESTADIOS DE DESARROLLO EMBRIONARIO DE PLÁTANO MACHO CV. “CURRARÉ ENANO”	60
4.1 INTRODUCCIÓN	60
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS	61
4.2.1 EXTRACCIÓN DE ARN.....	61
4.2.2 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ARN TOTAL.....	61
4.2.3 DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DEL ARN TOTAL EN GEL DE AGAROSA .	62
4.2.4 PREPARACIÓN DEL ARN ANTES DE LA RT-PCR.....	62
4.2.5 SÍNTESIS DE LA PRIMERA HEBRA DE ADNc.....	63
4.3 DISEÑO DE CEBADORES PARA LAS ENZIMAS GALACTINOL SINTASA	63
4.4 PCR TIEMPO REAL	64
4.5 RESULTADOS	65

4.5.1 EXTRACCIÓN DE ARN.....	65
4.5.2 VALIDACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE LA GALACTINOL SINTASA 1 (GOLS1) EN EMBRIONES SOMÁTICOS DE PLÁTANO MACHO, MEDIANTE PCR PUNTO FINAL.....	67
4.5.3 EXPRESIÓN RELATIVA DEL GEN DE LA GALACTINOL SINTASA 1 (GOLS1) DURANTE LA MADURACIÓN DEL EMBRIÓN SOMÁTICO MEDIANTE PCR TIEMPO	68
4.6 DISCUSIÓN.....	69
BIBLIOGRAFÍA.....	71
CAPÍTULO V.....	74
5.1 CONCLUSIONES.....	74
5.2 PERSPECTIVAS.....	74

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1. Centro de origen y distribución geográfica de la sección <i>Musa</i> (De Langhe <i>et al.</i> , 2009).....	4
Figura 1.2 Morfología de la planta de plátano	6
Figura 1.3 Estadios de desarrollo del embrión somático de plátano macho cv. “Curraré enano”. 1) Estadio globular. 2) Tipo pera. 3) Coleoptilar temprano. 4) Coleoptilar tardío. 10	
Figura 1.4 Eventos fisiológicos y bioquímicos durante el desarrollo del embrión cigótico en <i>Arabidopsis thaliana</i>	11
Figura 1.5 Ruta bioquímica para la síntesis de RFO's (Gangola <i>et al.</i> , 2016).....	14
Figura 1.6 Vía de señalización dependiente e independiente de ácido abscísico (ABA) involucradas en la tolerancia al estrés por desecación durante el desarrollo embrionario 15	
Figura 1.7 Representación de la regulación de las isoformas del gen galactinol sintasa (<i>GolS1</i> y <i>GolS2</i>) en <i>Oryza sativa</i>	18
Figura 1.7. - Estrategia experimental.....	22
Figura 2.1 Callo embriogénico de plátano macho cultivar “Curraré enano” (90 días de cultivo)	32
Figura 2.2 Embriones somáticos de plátano macho en dos medios de maduración. A) Embriones somáticos de 90 días en MM1. B) Embriones somáticos de 90 días MM2. ...	35
Figura 2.3 Suspensiones celulares embriogénicas de plátano macho cv. “Curraré enano”. A) Suspensión celular embriogénica inicial con agregados heterogéneos. B) Suspensión celular embriogénica filtrada.	36
Figura 2.4 Embriones somáticos de plátano macho (30 días) en dos medios de maduración. A) Embriones somáticos en MM1. B) Embriones somáticos en MM2.....	37
Figura 2.5 Embriones somáticos de plátano macho (45 días) en dos medios de maduración.	

A) Embriones somáticos en MM1. B) Embriones somáticos en MM2..... 37

Figura 2.6 Embriones somáticos de plátano macho en dos medios de maduración. A) Embriones somáticos de 60 días en MM1. B) Embriones somáticos de 90 días MM2. ... 38

Figura 2.7 Germinación de embriones somáticos en estadio coleoptilar tardío de plátano macho cv. Curraré enano en medio de germinación, A) a los 35 días, B) 60 días, C) 90 días. 39

Figura 2.8 Porcentaje de germinación de embriones somáticos en estadio coleoptilar tardío 39

Figura 3.1 Contenido de agua en los embriones somáticos en los estadios, globular, tipo pera, coleoptilar temprano y coleoptilar tardío, desarrollados en el medio de maduración 1 (MM1) y el medio de maduración 2 (MM2)..... 49

Figura 3.2 Peso seco de embriones en los estadios globular (30 días), tipo pera (45 días), coleoptilar temprano (60 días) y coleoptilar tardío (90 días)..... 50

Figura 4.1 ARN en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio..... 66

Figura 4.4 Nivel de expresión relativa del gen *GoIS1* en los cuatro estadios del embrión somático de plátano macho cv. “Curraré enano” 69

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1 Principales estados productores de banano en México (SIAP 2018)..... 8

Cuadro 3.1 Tiempos de retención de los estándares de carbohidratos..... 50

Cuadro 3.2 Contenido de carbohidratos ($\mu\text{g}\cdot\text{gr}^{-1}$ PS) solubles en embriones somáticos (ES) de plátano macho, *Musa spp.*, AAB, cv. “Curraré enano”, sometidos a dos tratamientos de maduración durante 90 días..... 51

Cuadro 4.1 Cebadores diseñados para la identificación de los genes que codifican a la enzima *GoIS1* y *GoIS2* en plátano macho cultivar “Curraré enano” 62

Cuadro 4.2 Concentración y pureza del ARN extraído en estadio de maduración..... 63

Cuadro 4.3 Concentración de la primera hebra de ADNc sintetizada..... 64

ANEXOS

Anexo No. 1 Composición de los medios de cultivo utilizados para el establecimiento y desarrollo de los embriones somáticos de plátano macho cv. "Currare enano"..... 72

Anexo No. 2 Curvas estándar para *myo*-inositol, galactinol, rafinosa, estaquiosa, glucosa, galactosa, sacarosa y fructosa..... 73

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ABA	Ácido abscísico
ABRE	Elementos de respuesta a ácido abscísico
AFLP	Polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados
ARN	Ácido ribonucleico
CBF	Factor de unión de repetición C
DRE	Elementos de respuesta a deshidratación
DREB	Proteínas de unión a DRE
DTT	Ditio treitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ERO's	Especies reactivas de oxígeno
ES	Embriogénesis somática
EC	Embrión cigótico
GalIS	Galactinol sintasa
GT8	Familia 8 Galactosiltransferasas
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HSP	Proteínas de choque térmico
LEA	Embriogénesis tardía abundante

MgCl₂	Cloruro de magnesio
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PVC	Paquete de volumen celular
RFO's	Oligosacáridos de la familia de la rafinosa
RafS	Rafinosa sintasa
RID	Detector de índice de refracción
Rpm	Revoluciones por minuto
SCE	Suspensión celular embriogénica
StaS	Estaquiosa sintasa
VerS	Verbascosa sintasa

RESUMEN

Debido a la naturaleza partenocárpica de los cultivares de plátano comestibles su reproducción se ha visto limitada, por lo que se ha requerido del desarrollo de estrategias biotecnológicas para su propagación. Una de las estrategias es el uso de la embriogénesis somática (ES), ya que esta técnica permite de forma *in vitro* la generación de un gran número de plantas, sin embargo, una de sus principales limitantes es la generación de embriones con una alta capacidad de germinación. En previos trabajos se ha demostrado que la inducción de un estrés hídrico en los embriones favorece su maduración, esto se ha relacionado a la acumulación de carbohidratos solubles, las cuales actúan como moléculas osmoprotectoras, generando tolerancia a la desecación y entre las que se encuentran los oligosacáridos de la familia de la rafinosa (RFO's). En este trabajo se describe el desarrollo de un protocolo de embriogénesis somática indirecta de plátano macho cv. "Curaré enano", donde el desarrollo-maduración de los ES se llevó a cabo en un medio de maduración con potenciales hídricos diferentes, generado por el uso de dos concentraciones de gelificante Gelrite (MM1 0.2% y MM2 0.3% p/v). Utilizando dicho modelo, investigamos el cómo se modula la pérdida de agua, la ganancia de biomasa y la acumulación de reservas de carbohidratos solubles durante el desarrollo-maduración del embrión. La cromatografía líquida de alta resolución acoplado a un detector de índice de refracción (HPLC-RID) demostró la presencia de los RFO's, rafinosa en los estadios tipo pera (TPera), coleoptilar temprano (CTem) y coleoptilar tardío (CTar), así como de estaquiosa en el estadio coleoptilar tardío en el MM2 y observando únicamente a la rafinosa en el estadio (CTar) del MM1. Los análisis realizados por PCR tiempo real (RT-PCR) confirmaron la expresión del gen galactinol sintasa 1 (*GoS1*), el cual está relacionado con la ruta de biosíntesis de los RFO's (rafinosa y estaquiosa). Nuestros datos sugieren que una disminución en el potencial hídrico del medio, por un aumento en la concentración de gelificante induce la expresión del gen *GoS1*, el cual está relacionado en la biosíntesis de moléculas osmoprotectoras (RFO's), las cuales influyen en el desarrollo y maduración del embrión somático. Los resultados obtenidos en el trabajo de investigación proporcionan un panorama acerca de los mecanismos implicados en la maduración del embrión somático y con lo cual se pueden generar nuevas estrategias en sistemas de mejoramiento genético en *Musa*.

ABSTRACT

Due to the parthenocarpic nature of edible plantain cultivars, their reproduction has been limited, which has required the development of biotechnological strategies for their propagation. One approach is the use of somatic embryogenesis (SE), as this technique allows the generation of a large number of *in vitro* plants; however, one of its main limitations is the generation of embryos with a high capacity of germination. In previous studies, it has been shown that the induction of water stress in embryos favors its maturation, this has been related to the accumulation of soluble carbohydrates, which act as osmoprotective molecules, generating tolerance to desiccation and among which are the oligosaccharides of the raffinose family (ROF's). In this paper, the development of an indirect somatic embryogenesis protocol of male banana cv. "Curraré enano" where the development-maturation of the ES was carried out in a maturing medium with different water potentials, generated by the use of two Gelrite gelling concentrations (MM1 0.2% and MM2 0.3% w/v). Using this model, we investigated how, water loss the biomass gain and the accumulation of soluble carbohydrate reserves is modulated, during the development-maturation of the embryo. High resolution liquid chromatography coupled to a refractive index detector (HPLC-RID) demonstrated the presence of RFO's, raffinose in the pear like (TPear), early coleoptilar (CTem) and late coleoptilar (CTar) stages, as well as stachyose in the late coleoptilar stage in MM2, and observing only raffinose in stage (CTar) in MM1. The analysis carried out by real-time PCR (RT-PCR) confirmed the expression of the galactinol synthase 1 (*Go/S1*) gene, which is related to the biosynthesis pathway of RFO's (raffinose and stachyose). Our data suggest that a decrease in the water potential of the medium, due to an increase in the concentration of gelling, induces the expression of the *Go/S1* gene, which is related to the biosynthesis of osmoprotective molecules (RFO's), which influence the development and maturation of the somatic embryo. The results obtained in the research work provide an overview of the mechanisms involved in the maturation of the somatic embryo and with which new strategies can be generated in systems of genetic improvement in *Musa*.

INTRODUCCIÓN

Los bananos, llamados plátanos en América Latina, son plantas monocotiledóneas de la familia *Musaceae* que incluye los géneros *Ensete* y *Musa*. Además, podría comprender un tercer género, *Musella*, cuyo reconocimiento es todavía incierto (Dash y Rai, 2016). Los bananos actuales, domesticados por el hombre, son originarios de las regiones tropicales y subtropicales del sureste de Asia que abarca la India, Myanmar, Tailandia, Filipinas y el Pacífico Occidental, conformado por Malasia e Indonesia. Dichas regiones son consideradas centros de diversidad por la aparición de diversas especies de bananos endémicos silvestres (Christelová *et al.*, 2017). Desde su centro de origen, *Musa spp* fue introducido en los principios de la agricultura al continente africano y posteriormente, transportado por los exploradores europeos a las Américas y el resto el mundo (De Jesús *et al.*, 2013).

Los bananos son uno de los principales cultivos frutales a nivel mundial y se sitúa al lado de otros cultivos de gran importancia alimentaria, como son el arroz, trigo y maíz (Perrier *et al.*, 2011). Su producción mundial anual ha alcanzado los 126 millones de toneladas, mientras en México es de 2, 150,520 millones de toneladas (FAO; 2014), constituyendo un alimento básico y nutritivo para millones de personas a nivel mundial (Christelová *et al.*, 2017).

La sección *Musa*, contiene entre otras a dos especies silvestres llamadas *Musa acuminata* Colla (Genoma A) y *Musa balbisiana* Colla (Genoma B), las cuales dieron origen a híbridos partenocárpicos diploides, triploides y tetraploides con diferentes combinaciones de los genomas A y B, como son AA, BB, AB, AAA, AAB, ABB, y más recientemente a híbridos AABB, AAAB y ABBB, generados por programas de mejoramiento genético (Dash y Rai, 2016). Los bananos, en general, se clasifican por su consumo en fresco como postres o por su consumo después de la cocción. Los del tipo postre se comen crudos cuando maduran y presentan mayormente el genotipo AAA, mientras que los bananos de cocción son hervidos, fritos, asados o tostados antes de su consumo y son los de composición genómica AAB y ABB (Nayar, 2010).

La reproducción de los cultivares comerciales se encuentra limitada por la naturaleza casi estéril y partenocárpica de la planta del banano, lo cual ha requerido del desarrollo de estrategias biotecnológicas alternativas para su propagación. Además de la organogénesis directa, una de las estrategias con mayor potencial de multiplicación para plátano es el uso de la embriogénesis somática, ya que permite la generación de un gran número de plantas, sin embargo, una limitante de los protocolos reportados es la baja frecuencia de formación de callo embriogénico durante la inducción y la subsecuente formación de embriones somáticos (Uma *et al.*, 2012). Además, a menudo se observan bajas tasas de germinación y conversión a plantas (Grapin *et al.*, 1996). La embriogénesis somática ha sido usada como modelo para entender los eventos fisiológicos, bioquímicos y moleculares que ocurren durante el desarrollo de los embriones en vegetales, conocimiento que puede apoyar a optimizar los sistemas de propagación *in vitro* (Jafari *et al.*, 2015; Enriquez-Valencia *et al.*, 2019).

Uno de los principales eventos fisiológicos y bioquímicos que se llevan a cabo es la síntesis de osmoprotectores, moléculas orgánicas no tóxicas que protegen a las células contra cambios osmóticos durante la respuesta temprana a condiciones de estrés. Entre estos compuestos se encuentran los oligosacáridos de la familia de la rafinosa (RFO's) (Pluskota *et al.*, 2015), así como proteínas protectoras como, las proteínas abundantes durante embriogénesis tardía (LEA) y las proteínas de choque térmico (HSP's) (González *et al.*, 2016).

Los RFO's constituyen un grupo de carbohidratos solubles, no reductores, cuya biosíntesis inicia con la formación de galactinol (O- α -D-galactopiranosil-(1-1)-L-*myo* inositol) y uridina-5-difosfato (UDP) por medio de la enzima galactinol sintasa (*GoS*), una glicosiltransferasa de la familia GT8 que cataliza la transferencia de galactosa desde UDP-galactosa a *myo*-inositol (Blochl *et al.*, 2005). El primer miembro de la familia, la rafinosa y los subsecuentes oligosacáridos (estaquiosa, verbascosa y ajugosa) se sintetizan a partir de la sacarosa por la adición de una molécula de galactosa donada por el galactinol (Kito *et al.*, 2018). Los RFO's están involucrados en diversas funciones celulares, tales como almacenamiento y transporte de carbono, transductor de señales, además de proteger al embrión durante la desecación que ocurre en la maduración de las semillas, prolonga la longevidad de la semilla, produce detoxificación de especies reactivas de oxígeno (ERO's) e induce tolerancia tanto a estrés biótico como abiótico (Sengupta *et al.*, 2015).

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar el papel de los RFO's durante el desarrollo y maduración del embrión somático de *Musa acuminata* x *Musa balbisiana*, cv "Curraré enano". Los resultados de desarrollar cuatro objetivos específicos se describen en los capítulos, II, III y IV.

El capítulo II cubre la información referente a la optimización del protocolo de maduración del embrión somático (objetivo específico 1). En dicho capítulo se presentan los resultados del porcentaje de germinación de los embriones somáticos maduros formados a partir de suspensiones embriogénicas, de las cuales los embriones se desarrollaron bajo dos tratamientos de maduración (MM1 y MM2), que difieren en la concentración de gelificante del medio de cultivo y potencial hídrico.

En el capítulo III la evaluación en el cambio de peso seco y contenido de agua de los ES desarrollados bajo dos tratamientos de maduración, así como la determinación de los niveles de sacarosa, glucosa, fructuosa, *myo*-inositol, galactosa y galactinol, y los oligosacáridos rafinosa y estaquiosa en cada estadio de desarrollo de los ES. Por último, en el capítulo IV, la evaluación de los perfiles de expresión del gen que codifica a la enzima *GoIS1* en cada estadio de desarrollo de los ES.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1. MUSÁCEAS

La familia de las *Musáceas* Juss comprende dos géneros conocidos: *Musa* L., con cerca de 65 especies y *Ensete* Horan con 8. Se podría incluir un tercer género, *Musella* (Fr.) C.Y. Wu ex H.W.L., pero su registro es todavía incierto. Las especies pertenecientes a esta familia se encuentran en las regiones tropicales y subtropicales, siendo originarias del sureste asiático (Gutiérrez y Burgos, 2012).

Las plantas de banano tienen su centro de origen en la región comprendida desde la India hasta la Polinesia, mientras que la selva tropical de Malasia e Indonesia ha sido considerada como el centro de diversidad por la aparición de diversas especies endémicas de banano silvestre (Figura 1.1) (Dash y Rai, 2016).

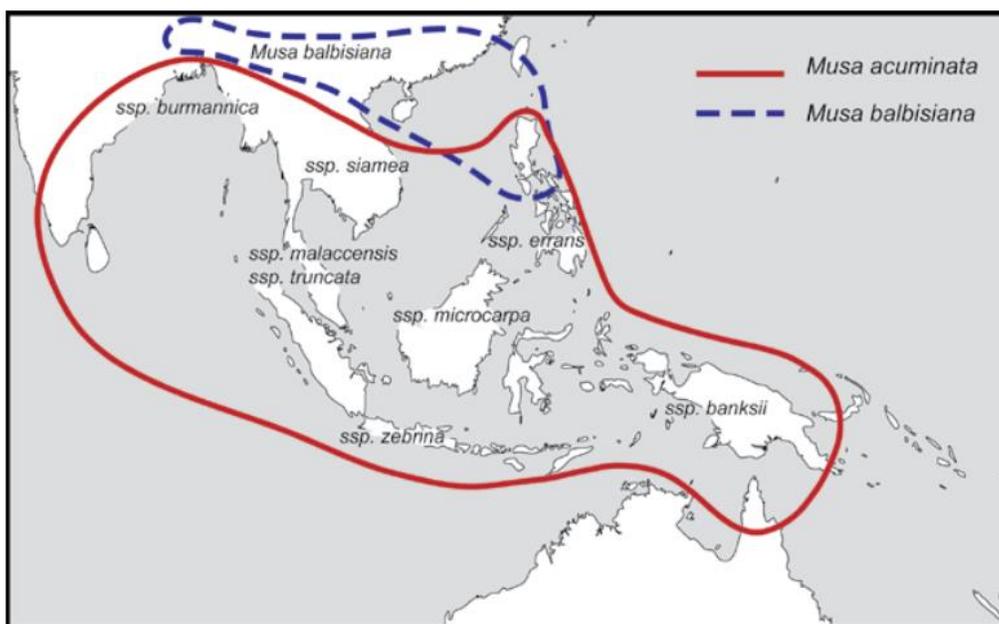


Figura 1.1. Centro de origen y distribución geográfica de la sección *Musa* (De Langhe *et al.*, 2009).

Los bananos son plantas monocotiledóneas, pertenecientes al género *Musa*. Estudios filogenéticos recientes subdividen a las especies del género *Musa* en dos secciones: *Musa*

y *Callimusa*, con números cromosómicos $x=11$ y $x=7/9/10$ respectivamente. Esta subdivisión en secciones se sustenta en estudios con marcadores moleculares tipo AFLP's (Wong *et al.*, 2002) y filogenéticos que utilizan secuenciación de ADN nuclear (Christelova *et al.*, 2017) y cloroplástico (Lamare *et al.*, 2017; Häkkinen, 2013).

La mayoría de los cultivares de bananos, denominados plátanos en América Latina son selecciones hechas por los agricultores a partir de dos especies silvestres: *Musa acuminata* Colla (Genoma A) y *Musa balbisiana* Colla (Genoma B), las cuales fueron cultivadas, multiplicadas y posteriormente, distribuidas por medio de propagación vegetativa (Heslop-Harrison y Schwarzacher, 2007). La propagación vegetativa dio origen a plantas de banano con diferentes combinaciones entre los genomas A y B, como son: AA, AB, AAA, AAB, ABB. La estructura heterocigótica de estos híbridos provocada por re-arreglos cromosómicos, así como la generación de gametos $2n$, donde la gametogénesis ha sido modificada por fallas en la división meiótica, fue el paso crucial en el desarrollo de la partenocarpia de los bananos comestibles, así como la esterilidad gamética de las semillas, principalmente en variedades triploides (Perrier *et al.*, 2011).

1.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL GÉNERO *MUSA*

La clasificación taxonómica del género *Musa* es la siguiente (Häkkinen, 2013).

Reino: Vegetal

Clase: Angiospermae

Subclase: Monocotyledonae

Orden: Zingiberales

Familia: Musáceae

Género: *Musa*

Secciones: *Musa* y *Callimusa*

1.2. MORFOLOGÍA DE LA PLANTA DE PLÁTANO

El banano es una planta herbácea, perenne de gran tamaño, (Figura 1.2). Su pseudotallo emerge directamente del corno o tallo subterráneo, el cual es de alrededor de 30 cm de largo y soporta al tallo aéreo que lleva la inflorescencia. El pseudotallo alcanza una altura

de 2 a 8 m en variedades cultivadas y de 10 a 12 m en algunas especies silvestres (Karamura y Karamura, 1995).

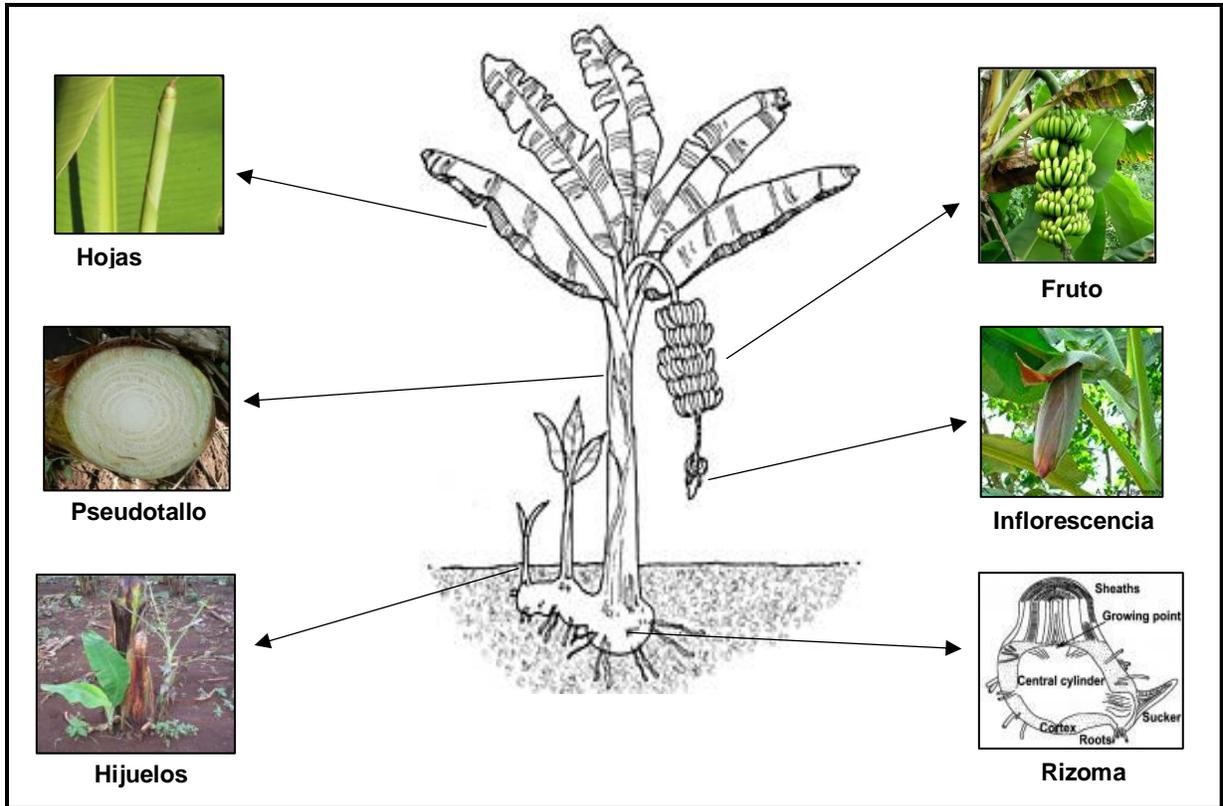


Figura 1.2 Morfología de la planta de plátano.

El sistema radical de las plantas de banano propagadas vegetativamente es carnoso, adventicio y carece de una raíz principal. El sistema radical se encarga de absorber y conducir el agua, además de transferir los nutrimentos del suelo hacia la planta. Las raíces primarias emergen de la superficie externa del cilindro central del rizoma, las cuales presentan un diámetro de 5-8 mm y son de color blanco cuando jóvenes, tornándose grises y marrones hasta que mueren (Robinson y Galán, 2012). La planta de banano también posee grandes hojas aéreas, las cuales varían de tamaño dependiendo de la especie y las condiciones de crecimiento y van desde los 0.62 m² a los 2.80 m² (Figura 1.2) (Karamura y Karamura, 1995). Cada hoja emerge desde el centro del pseudotallo como un cilindro enrollado, por lo que es llamada también hoja cigarro. El extremo distal se contrae para formar primero el peciolo y posteriormente, la nervadura central. Las hojas en estado

maduro, que se denominan hojas maduras, constan de vaina, pecíolo, nervadura central y limbo.

La inflorescencia es una estructura que contiene las flores que se convertirán en frutos y está apoyada en el tallo floral o tallo verdadero. Ésta es una espiga que consiste de un pedúnculo corpulento, en el cual se disponen las flores en racimo nodales. Cada nódulo está sostenido por una bráctea que protege a las flores jóvenes. Los nódulos basales (proximales) portan flores femeninas, normalmente en un número de 5 a 18 y los nódulos superiores (distales) portan las flores masculinas, las cuales permanecen encerradas en una estructura cónica conocida como bellota (Robinson y Galán, 2012). Los bananos son vegetativamente partenocárpicos, ya que desarrollan una gran cantidad de pulpa comestible sin polinización. Existen tres lóculos en la cavidad del ovario de los bananos, desarrollándose la mayor cantidad de pulpa a partir del borde exterior del lóculo.

1.3. PRODUCCIÓN DE BANANO A NIVEL MUNDIAL Y NACIONAL

Hay más de mil variedades de bananos producidos y consumidos a nivel mundial, pero el más comercializado destacan el plátano Enano Gigante y Valery del grupo Cavendish, del cual se producen cerca de 50 millones de toneladas al año a nivel mundial, lo que representa cerca del 47% de la producción mundial.

Los bananos son producidos principalmente en Asia, Latino América y África. El mayor productor es la India produciendo alrededor de 30 millones de toneladas al año, seguido de China con 11 millones, Filipinas con 9 millones, y Ecuador y Brasil, ambos con 6 millones de toneladas (FAO, 2017).

México ocupa el duodécimo lugar en producción de banano comestible a nivel mundial con 2, 386,195 millones de toneladas (SIAP, 2018). Los principales estados productores son Chiapas, Tabasco, Veracruz, Colima y Jalisco. Yucatán, ocupa el decimotercer lugar en producción (Cuadro 1.1) Entre las variedades de este frutal que se cultivan en México, destacan el plátano Enano Gigante y Valery (AAA, subgrupo Cavendish), el plátano tabasco también llamado Roatán (AAA, subgrupo Gross Michel), el plátano macho y dominico (AAB, subgrupo Plantain), el plátano manzano (AAB, subgrupo Silk), además del plátano morado y el plátano pera, siendo el plátano Enano Gigante, el más importante con una superficie

cultivada de 28 mil hectáreas, seguido del plátano macho con 18 mil hectáreas (SIAP, 2018).

Cuadro 1.1 Principales estados productores de banano en México (SIAP 2018).

Orden	Entidad federativa	Toneladas
1	Chiapas	696,298
2	Tabasco	630,097
3	Veracruz	281,513
4	Colima	206,693
5	Jalisco	183,904
6	Michoacán	160,674
7	Guerrero	78,265
8	Oaxaca	68,423
9	Puebla	37,086
10	Nayarit	30,379
11	Quintana Roo	9,600
12	Campeche	1,409
13	Yucatán	1,213
	Total	2,385,554

1.4. PRINCIPALES ENFERMEDADES DE LAS PLANTAS DE PLÁTANO

Últimamente, la producción de banano se ha visto limitada por el ataque de enfermedades fúngicas como es el caso de la enfermedad de Panamá, causada por (*Fusarium oxysporum*), la Sigatoka negra cuyo origen es la infección por (*Pseudocercospora fijiensis* sinónimo: *Mycosphaerella fijiensis*) o la sigatoka amarilla (*Pseudocercospora musae* sinónimo: *Mycosphaerella musicola*) (Dash y Rai, 2016) y las bacterianas, como la enfermedad del Moko, causada por *Pseudomonas solanacearum* (Raut y Ranade, 2004).

La generación de nuevas variedades resistentes a estas enfermedades mediante técnicas clásicas de mejoramiento ha sido difícil y requiere mucho tiempo, debido a la poliploidia, la esterilidad y el periodo de generación prolongado de la mayoría de los cultivares comestibles, es por ello, que técnicas de cultivo *in vitro*, como la embriogénesis somática fueron desarrolladas para lograr la propagación masiva de cultivares de banano y plátano libres de enfermedades (Meenakshi *et al.*, 2011).

1.5. TÉCNICAS BIOTECNOLÓGICAS PARA LA PROPAGACIÓN DEL PLÁTANO

Los bananos son tradicionalmente propagados de manera vegetativa, utilizando cormos, brotes o hijos, principalmente los hijos de espada como material inicial. El material vegetativo, sin embargo, puede albergar patógenos, tales como hongos, nematodos, virus e insectos, los cuales se pueden transmitir a las nuevas plantaciones de banano. Por ello, se ha optado por crear material de siembra libre de éstos a través del cultivo de tejidos *in vitro* (Kaçar y Faber, 2012).

La regeneración *in vitro* puede derivar de tejido meristemático vía organogénesis directa (meristemo apical, puntas de brotes, explantes florales y frutos inmaduros), así como de una suspensión de células embriónicas vía embriogénesis somática indirecta (Khalid y Chin Tan, 2016).

1.5.1. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

La embriogénesis somática (ES) es un proceso donde las células somáticas son programadas hacia un destino embriónico, resultando en un embrión que se parece, tanto fisiológica como morfológicamente, a un embrión cigótico (EC). Este proceso es factible debido a que las plantas poseen totipotencialidad celular; por lo tanto, un embrión somático puede regenerar una planta completa (Sowmya *et al.*, 2016). El desarrollo del embrión somático implica una división celular activa que contribuye a la formación de un embrión de forma globular, no diferenciado y con una protodermis definida, seguida de la diferenciación celular y la ampliación del embrión (Figura 1.3). Durante la maduración, la cual es la fase final del desarrollo embrionario, hay una expansión del embrión y una acumulación de sustancias de reserva, como son proteínas y carbohidratos en el embrión antes de su germinación. En general, en esta etapa, la adquisición de tolerancia a la desecación es frecuente (Escobedo *et al.*, 2016).



Figura 1.3 Estadios de desarrollo del embrión somático de plátano macho cv. "Curraré enano". **1)** Estadio globular. **2)** Tipo pera. **3)** Coleoptilar temprano. **4)** Coleoptilar tardío.

La embriogénesis somática en Musáceas fue descrita inicialmente por Krikorian y Cronauer, (1984), quienes produjeron suspensiones celulares embriogénicas (SCE) a partir de ápices. Aunque observaron que sus puntos de brotación estaban poco desarrollados, el examen morfológico mostró que estos grupos de células eran competentes. Poco después, los embriones somáticos fueron inducidos a partir de flores masculinas inmaduras (Escalant *et al.*, 1994; Ma, 1991) y meristemas en proliferación denominados escalpos (Strosse *et al.*, 2003). Hoy en día, las flores masculinas inmaduras son el material de inducción más utilizado (Khalid y Chin Tan, 2016); y en el caso de clones de plátano macho que carecen de bellota con flores masculinas se utilizan las flores femeninas inmaduras (Escobedo *et al.*, 2018; Grapin *et al.*, 1996).

1.6. MOLÉCULAS DE RESERVA DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO

1.6.1. CARBOHIDRATOS

Durante la fase de maduración del embrión cigótico, su crecimiento se detiene, la mitosis es menos intensa, hay una pérdida de agua y los principales componentes de reserva, como son proteínas, lípidos y carbohidratos, comienzan a acumularse (Leprince *et al.*, 2017) (Figura 1.4). Los componentes de reserva en el embrión están destinados a nutrir al embrión durante su desarrollo, a inducir tolerancia a la desecación y garantizar su germinación (Businge *et al.*, 2013).

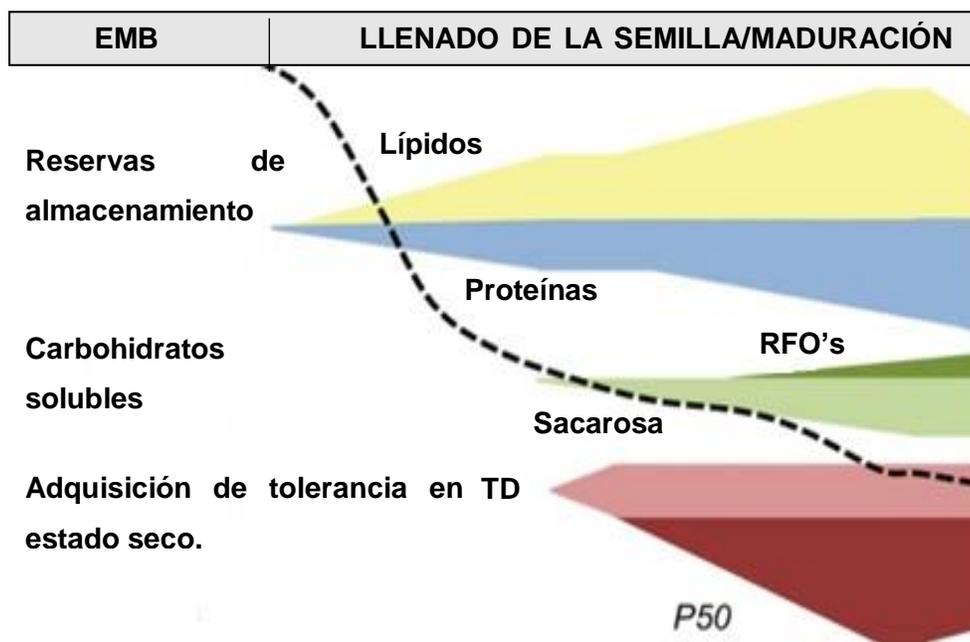


Figura 1.4 Eventos fisiológicos y bioquímicos durante el desarrollo del embrión cigótico en *Arabidopsis thaliana*. La línea punteada indica la pérdida de agua durante el desarrollo embriogénico. TD, tolerancia a la desecación; EMB, embriogénesis; P50, vida media; RFO's, oligosacáridos de la familia de la rafinosa (Leprince *et al.*, 2017).

El análisis del transcriptoma y proteoma de varias especies vegetales sugiere que existe un gran número de genes que participan en el metabolismo de carbohidratos y los cuales son altamente expresados tanto en la embriogénesis cigótica, como en la embriogénesis somática (Navarro *et al.*, 2017).

Entre los carbohidratos sintetizados durante el desarrollo del embrión cigótico, se encuentra la sacarosa. La mayoría de las semillas, durante su fase de maduración y pérdida de agua, contienen altas concentraciones de sacarosa, (Madeiros y Augusto., 2001). Al mismo tiempo que la sacarosa, se ha encontrado un contenido importante de oligosacáridos, particularmente los pertenecientes a la familia de la rafinosa (RFO's): rafinosa, estaquiosa y verbascosa, los cuales se forman por la adición secuencial de unidades de galactosa a la sacarosa por el donador de galactosa, el galactinol. Tanto la sacarosa como los RFO's participan en el mantenimiento de la integridad de las membranas celulares durante la deshidratación, así como en el mantenimiento de la estructura tridimensional de las

proteínas, con base en su capacidad de formar un estado vítreo, estado sólido altamente viscoso que retrasa la difusión molecular y ralentiza las reacciones de deterioro celular (Gurisinghe y Bradford., 2001).

1.6.2. PROTEÍNAS

Durante el desarrollo del embrión, éste pasa primero por una fase de división celular y morfogénesis, seguido por una fase de maduración. Esta fase incluye la acumulación de moléculas de reserva, en las que se encuentran los aminoácidos y las proteínas (Angelovici *et al.*, 2010). Durante la embriogénesis, los aminoácidos actúan como componentes básicos para la síntesis de proteínas. Un incremento en su concentración, genera la síntesis de proteínas abundantes en la embriogénesis tardía (LEA), proteínas de choque térmico y proteínas de reserva que actúan protegiendo al embrión de la deshidratación y funcionan como fuente primaria de nitrógeno (Bartos *et al.*, 2018).

Entre las principales proteínas de reserva se encuentra la albumina, las globulinas, las prolaminas y las glutelinas, las cuales fueron clasificadas basados en su solubilidad en una serie de disolventes (Tan Wilson y Wilson, 2012). Dependiendo de la familia de plantas a las que pertenecen las semillas generalmente una de ellas predomina, por ejemplo, la globulina predomina como proteína de reserva en semillas de arroz y avena, mientras que las prolaminas se encuentran en mayor concentración en semillas de maíz, trigo y cebada (Laudencia y Vensel, 2008).

1.6.3. LÍPIDOS

Los lípidos de reserva durante la fase de desarrollo y maduración embrionaria son mayormente representados como triacilgliceroles (TAGs). Los lípidos se acumulan como cuerpos lipídicos en el citosol, y están localizados principalmente en el endospermo y los cotiledones (Grigová *et al.*, 2007).

1.6.4. OLIGOSÁCARIDOS DE LA FAMILIA DE LA RAFINOSA (RFO´s)

Durante el desarrollo del embrión cigótico, la exposición a un evento de estrés por desecación, desencadena una serie de procesos biológicos que inducen cascadas de señalización para activar genes de respuesta a estas condiciones. Adicionalmente, se

presentan interacciones entre productos génicos que originan un importante cambio en la fisiología de la planta, influyendo tanto en su crecimiento como en su desarrollo (González *et al.*, 2016). Uno de los principales mecanismos utilizados por las plantas para contrarrestar el deterioro causado por el estrés por desecación, es la acumulación de solutos compatibles, como son aminoácidos, aminos y varios azúcares solubles, como por ejemplo los oligosacáridos de la familia de la rafinosa (RFO's) (Dos Santos *et al.*, 2015).

Los RFO's constituyen un grupo de carbohidratos solubles, no reductores, utilizados para transportar y almacenar carbono en las plantas. El almacenamiento de carbohidratos y su transporte son fenómenos importantes en las plantas para sostener su crecimiento y desarrollo. De igual manera, los RFO's se acumulan en las semillas, principalmente durante su llenado y continúan hasta su maduración (Leprince *et al.*, 2017; Peterbauer y Richter, 2001). En el proceso de desarrollo-maduración del embrión cigótico, los RFO's participan en la inducción de la tolerancia a la desecación, en la destoxificación de especies reactivas de oxígeno, así como confiriendo longevidad en la semilla (Gangola *et al.*, 2014).

La galactinol sintasa (*GoS*), es la enzima encargada de la biosíntesis de galactinol. Esta molécula es clave en la ruta de biosíntesis de los RFO's. A su vez, las enzimas rafinosa sintasa (*RafS*), estaquiosa sintasa (*StaS*) y verbascosa sintasa (*VerS*) están implicadas en la biosíntesis de rafinosa, estaquiosa y verbascosa respectivamente (Li *et al.*, 2017). Todas las enzimas están localizadas en el citosol (Sprenger y Keller, 2000). La rafinosa, el primer miembro de la familia, se encuentra en mayor concentración en semillas monocotiledóneas, mientras que la estaquiosa y verbascosa en semillas dicotiledóneas (Peterbauer y Richter, 2001).

1.7. ESTRUCTURA QUÍMICA Y BIOSÍNTESIS

Los RFO's consisten en cadenas lineales de residuos de galactosa unidos a la sacarosa, mediante enlaces glicosídicos α (1 \rightarrow 6). Su biosíntesis comienza por la transferencia de galactosa desde una molécula donadora a un aceptor que puede ser sacarosa, rafinosa o sus homólogos superiores. Tres tipos de donadores de galactosa están implicados en su biosíntesis: UDP-galactosa, galactinol y los propios oligosacáridos pertenecientes a los RFO's (Peterbauer y Richter, 2001).

La biosíntesis de los RFO's involucra al inicio la actividad de la *GoIS*, la cual pertenece a la familia GT8 glicosil transferasa y que transfiere un residuo de galactosa al *myo*-inositol a partir de la UDP-galactosa (galactosa uridil-difosfato) para producir galactinol (α -D-galactosa-1-L-*myo*-inositol-O- α -galactopiranosiltransferasa) (Fan *et al.*, 2017). El trisacárido rafinosa y los subsecuentes RFO's (estaquiosa, verbascosa) (Figura 1.5) se sintetizan a partir de la sacarosa por la adición de unidades de galactosa donadas por el galactinol (Gangola *et al.*, 2016).

Aparte de su papel como molécula donadora de la galactosa para la síntesis de RFO's, no se le ha asignado otra función al galactinol en plantas. De este modo, la síntesis del galactinol es el cuello de botella para que se dé la ruta de biosíntesis de los RFO's. La enzima *RafS* trasfiere una unidad de galactosa desde el galactinol a la sacarosa y sintetiza la rafinosa, de igual manera la enzima *StaS* usa al galactinol como donador de una unidad de galactosa, que se une a la molécula de rafinosa para producir el tetrasacárido estaquiosa. Ambas reacciones son reversibles (Sengupta *et al.*, 2015).

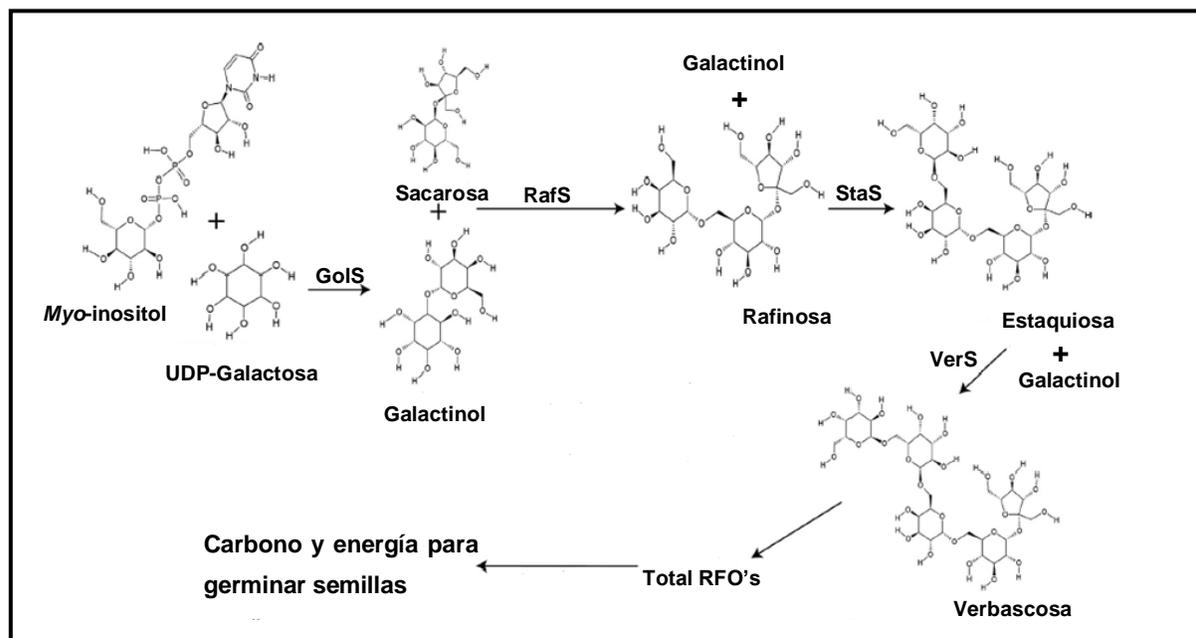


Figura 1.5 Ruta bioquímica para la síntesis de RFO's (Gangola *et al.*, 2016).

1.8. REGULACIÓN DEL GEN DE LA GALACTINOL SINTASA

La pérdida de agua durante el desarrollo embrionario induce la expresión de genes regulatorios ya sea a través de una vía dependiente de ácido abscísico (ABA) o una independiente de ABA (Figura 1.6), los cuales participan en la tolerancia al estrés por desecación (Chinnusamy *et al.*, 2004). Los productos génicos expresados actúan principalmente en la acumulación de moléculas osmoprotectoras, como son aminoácidos, aminas, carbohidratos como la sacarosa, trehalosa y los oligosacáridos de la familia de la rafinosa (RFO's), especialmente rafinosa y estaquiosa. Los RFO's se acumulan durante el desarrollo de la semilla y su biosíntesis inicia a partir de la actividad de la enzima galactinol sintasa (*GoS*), jugando un papel clave en su regulación (Finkelstein *et al.*, 2002).

Galactinol sintasa (*GoS*) es un gen con un gran número de isoformas en varias especies y cuya función específica no ha sido demostrada, pero la expresión diferencial de las isoformas ha sido relacionada a condiciones de estrés y desarrollo en las plantas. En *Arabidopsis thaliana* se han identificados siete isoformas del gen *GoS* siendo únicamente tres inducidas por estrés. En las regiones promotoras de los genes inducidos por desecación *AtGoS1*, *AtGoS2*, así como por frío *AtGoS3*, fueron identificados los elementos de actuación en *cis* ABRE (elementos de respuesta a ABA) y DRE/CTR (elementos de respuesta a deshidratación) (Taji *et al.*, 2002), indicando una regulación tanto dependiente como independiente de ABA.

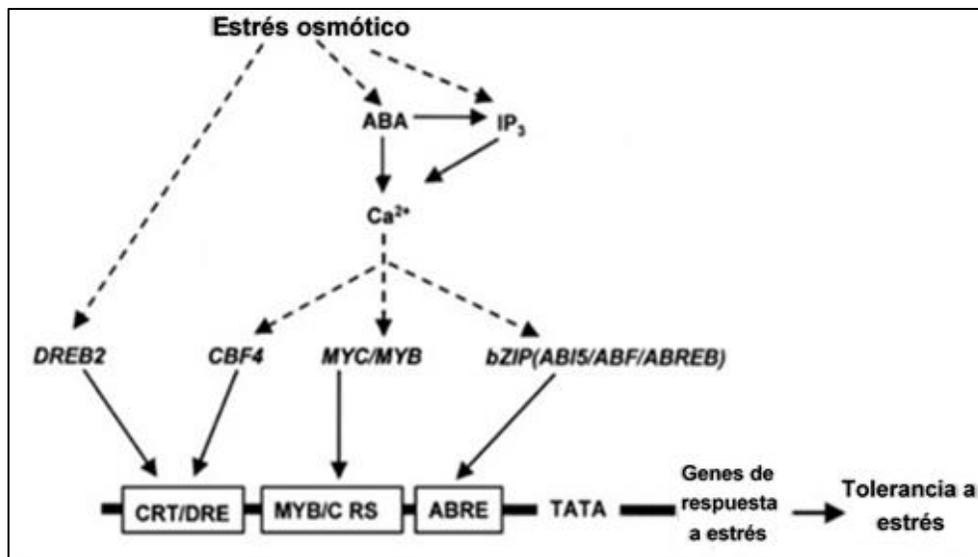


Figura 1.6 Vía de señalización dependiente e independiente de ácido abscísico (ABA)

involucradas en la tolerancia al estrés por desecación durante el desarrollo embrionario (Chinnusamy *et al.*, 2004). ABA, ácido abscísico; IP3, inositol trifosfato; Ca²⁺, calcio; DRE, elemento de respuesta a deshidratación; DREB2, elemento de unión a DRE, CBF, factor de unión a repetición C; CRT, repetición en C; ABRE, elemento de respuesta a ácido abscísico; bZIP, región básica de cierre de leucina; ABI, insensible a ácido abscísico; ABF, factor de unión al elemento de ácido abscísico; ABREB, elementos de unión a ABRE.

A su vez, factores de transcripción de unión a los elementos de activación en *cis* DRE/CTR así como ABRE se aislaron y se denominaron como DREB1/CBF, DREB2/CBF (proteínas de unión a DRE / factor de unión de repetición C) y ABREB (proteínas de unión ha ABRE). El factor de transcripción DREB1/CFB tiene un papel muy importante en la regulación de la expresión de genes de respuesta a estrés por desecación, donde en *Arabidopsis* se demostró su unión a los elementos actuación en *cis* DRE/CTR (Seki *et al.*, 2003; Taji *et al.*, 2002).

1.8.1. REGULACIÓN POR FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE CHOQUE TÉRMICO

Otro grupo de proteínas de las cuales se tiene evidencia que actúan bajo condiciones de estrés son las proteínas de choque térmico (HSP's, por las siglas en inglés Heat Shock Proteins). Las HSP son moléculas chaperonas cuya función es contrarrestar el efecto de desnaturalización de las proteínas causado por el choque térmico y de esta forma, mantener la integridad celular (Bush y Schöffl, 2005). La expresión de las HSP's es regulada a nivel transcripcional por la activación de factores de transcripción de choque térmico (HSF), los cuales reconocen elementos específicos en *cis* (HSE's) en la región promotora de los genes correspondientes (HS). En *Arabidopsis thaliana* se identificó que el gen *AtGolS1* es regulado por ciertas HSF bajo condiciones de estrés por calor. En la región promotora se encontraron secuencias de elementos *cis* de choque térmico que corresponden a los sitios de unión de HSF, observando un incremento en las concentraciones tanto de rafinosa como de estaquiosa después de someter el tejido foliar a un estrés por calor (Panikulangara *et al.*, 2014).

1.8.2. REGULACIÓN MEDIADA POR PROTEÍNAS WRKY

Los genes WRKY codifican a un gran número de factores de transcripción (TF) definidos por un dominio de 60 aminoácidos, los cuales contienen la secuencia de aminoácidos WRKY en la región amino terminal y un motivo dedo de zinc en el carboxilo terminal (Rushton *et al.*, 2010). Bajo condiciones de estrés, los factores de transcripción WRKY se unen a los elementos en *cis* en la región promotora del gen *GoS* induciendo su expresión. Zhi Wang y colaboradores (2009) demostraron en *Boea hygrometrica* que son necesarios al menos dos elementos en *cis* W-box para interactuar con el factor de transcripción WRKY en la región promotora de *BhGoS1* y de esta forma activar su expresión.

1.8.3. REGULACIÓN POR RETENCIÓN DE INTRÓN

En el tejido foliar de *Oryza sativa* se ha identificado que dos isoformas del gen *GoS* (*GoS1* y *GoS2*) son regulados por un mecanismo conocido como retención de intrón. La presencia de intrones en el gen *GoS* se asocia a un tipo de regulación post-transcripcional. Los intrones conservados, generan un pre-ARNm debido a la presencia de codones de terminación prematuros en su secuencia, formando proteínas no funcionales (Figura 1.7 a). No obstante, cuando el tejido foliar de *Oryza sativa* es sometido a condiciones de estrés por desecación o salinidad, se ha observado un aumento en el número de transcritos maduros de *OsGoS1* y *OsGoS2* generando proteínas funcionales (Figura 1.7 b) y con ello un aumento en la síntesis del galactinol, molécula clave para la biosíntesis de los RFO's, las cuales participan en la tolerancia al estrés en el tejido foliar (Mukherjee *et al.*, 2019).

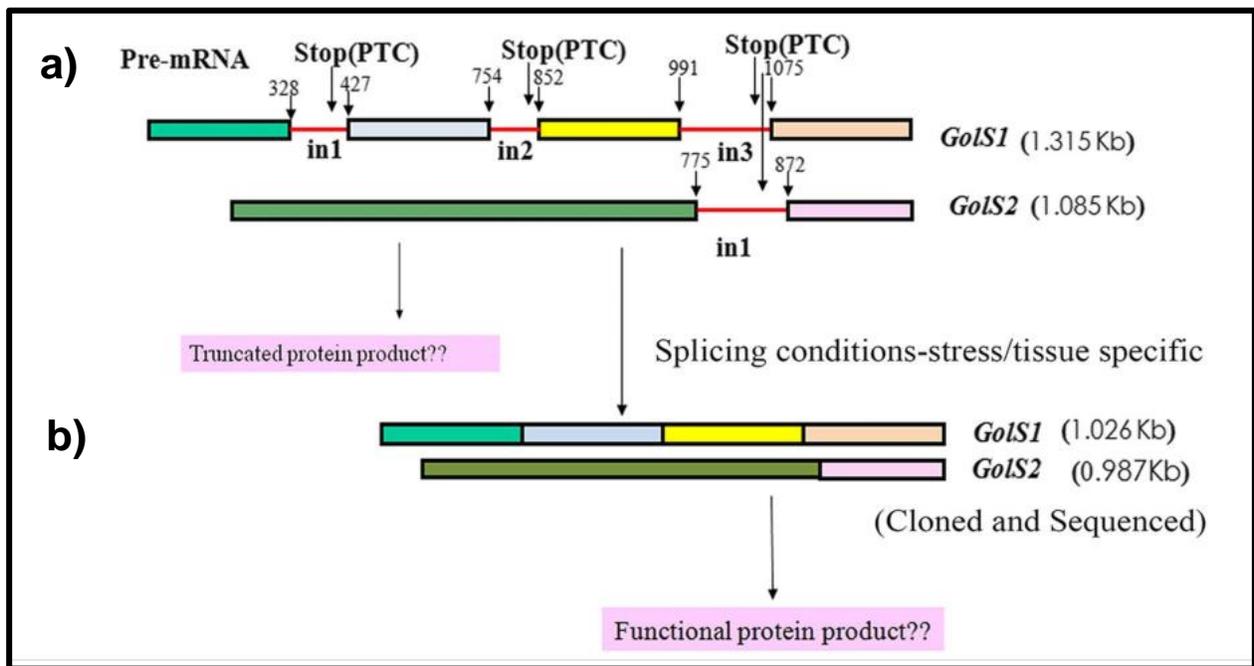


Figura 1.7 Representación de la regulación de las isoformas del gen galactinol sintasa (*GolS1* y *GolS2*) en *Oryza sativa*. **a)** Regulación por retención de intrón. **b)** Generación de ARNm bajo condiciones de estrés (Mukherjee *et al.*, 2019).

1.9. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS RFO's

Todas las plantas sintetizan alguna molécula perteneciente a los RFO's, en algún punto de su crecimiento y desarrollo. Estos compuestos se acumulan principalmente en las semillas, protegiendo al embrión de la desecación asociada a la maduración. También se acumulan en menor cantidad en las hojas. La acumulación de RFO's se inicia durante el desarrollo tardío de las semillas, con su llenado, siendo depositados en el endospermo, el embrión y la cubierta de la semilla (Peterbauer y Richter, 2001).

Existen diferentes maneras de contrarrestar el efecto causado por la desecación en las semillas, siendo un ejemplo de ellos la vitrificación (creación de una solución líquida con la viscosidad de un sólido) del citoplasma. Los RFO's junto con las proteínas abundantes de embriogénesis tardía (LEA) y las proteínas de choque térmico (HSP's) participan en la generación de este estado vítreo, preservando la estructura biológica de la célula (Pukacka *et al.*, 2009). Los grupos hidroxilo de los RFO's son capaces de reemplazar las moléculas de

agua en los sitios hidrófilos de las macromoléculas y membranas, y, por lo tanto, ofrecen un entorno similar a una solución acuosa diluida (Sun y Leopold, 1997).

De igual manera, estudios *in vitro* confirman que los RFO's se insertan en la bicapa lipídica de la membrana celular, estabilizándola cuando las condiciones de estrés prevalecen. Su gran longitud oligomérica puede servir para proteger a los liposomas de la deshidratación dada su interacción con la membrana y actuar contra los radicales libres presentes (Sengupta *et al.*, 2015).

1.10 RESUMEN DE LOS ANTECEDENTES

De lo anterior podemos recapitular que la regeneración de plantas de forma *in vitro*, por medio del empleo de la embriogénesis somática indirecta (ESI) ofrece ciertas ventajas, como es, la producción de un gran número de plantas. Aunado a esto, y como se ha observado en diferentes especies de plantas tanto mono como dicotiledóneas, la acumulación de moléculas de reserva como son los oligosacáridos de la familia de la rafinosa (RFO's) en los embriones somáticos (ES) favorece su correcta maduración y posterior germinación, ya que existe evidencia de que los RFO's actúan como moléculas osmoprotectoras durante la maduración de los ES. Por ello, en este trabajo se propone establecer un protocolo eficiente de generación de plantas de plátano macho cv. "Curraré enano" de forma *in vitro* por medio del empleo de la ESI, y en el cual, se induzca la acumulación de los RFO's en los ES, ya que esto representa una excelente alternativa para la generación de embriones somáticos idóneos para la producción de plantas de calidad.

JUSTIFICACIÓN

Se ha determinado tanto en especies mono como dicotiledóneas que los oligosacáridos de la familia de la rafinosa (RFO's) participan en diversas funciones celulares, como es la protección a la desecación del embrión cigótico durante su fase de maduración. Esto sugiere la participación del gen que codifica a la enzima galactinol sintasa (*GoS*), la cual sintetiza al galactinol, molécula que participa al inicio de la biosíntesis de los RFO's. En *Musa spp* no existen evidencias sobre la actuación de los RFO's en el proceso de desecación del embrión, es por ellos que se propone determinar si los RFO's están presentes durante la embriogénesis somática (ES), así como determinar el nivel de expresión del gen *GoS1* durante la ES.

HIPÓTESIS

Si el desarrollo y la maduración del embrión somático de *Musa spp.*, cv. "Curraré enano" se lleva a cabo bajo condiciones que conlleven a una lenta desecación, generado por el incremento en la concentración de gelificante en el medio de maduración, entonces es posible que se dé un aumento en la acumulación de moléculas de reserva como son los oligosacáridos de la familia de la rafinosa (RFO's) y con ello una expresión diferencial de la enzima galactinol sintasa (*Go/S*), molécula clave para su biosíntesis.

OBJETIVO GENERAL

Analizar el papel de los oligosacáridos de la familia RFO's y la expresión diferencial de la *Go/S1* durante el desarrollo y maduración de los embriones somáticos de plátano macho, *Musa spp.*, (subgrupo Plantain, tipo Falso Cuerno), cv. "Curraré enano", en medio semisólidos con dos concentraciones de gelificante, 0.2 y 0.3% (p/v).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer un protocolo de maduración de embriones somáticos de plátano macho con altos porcentajes de germinación.
2. Evaluar el cambio en peso seco y contenido de agua de los ES desarrollado bajo dos tratamientos de maduración.
3. Determinar los niveles de acumulación de sacarosa, glucosa, fructuosa, *myo*-inositol, galactosa y galactinol, así como de los oligosacáridos rafinosa y estaquiosa en cada estadio de desarrollo de los ES.
4. Evaluar los perfiles de expresión del gen que codifica a la enzima *Go/S1* en cada estadio de desarrollo de los ES.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para lograr los objetivos planteados, la estrategia experimental (Figura 1.7) consistió en cultivar suspensiones embriogénicas finas de plátano macho cv. "Curraré enano" en medios semisólidos con dos concentraciones de gelificante, 0.2 y 0.3% (p/v), para maduración del embrión somático. Estos dos medios generaron diferentes condiciones de potencial hídrico en el medio. Se analizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) el contenido de carbohidratos solubles y RFO's, así como parámetros de crecimiento y acumulación de biomasa, como el peso fresco, peso seco y contenido de agua en los estadios globular, tipo pera, coleoptilar temprano y coleoptilar tardío del ES en desarrollo. Asimismo, se analizaron los niveles de expresión del gen que codifica para la enzima Galactinol Sintasa (*GoIS1*). Se realizaron tres experimentos independientes para verificar la reproducibilidad de los resultados.

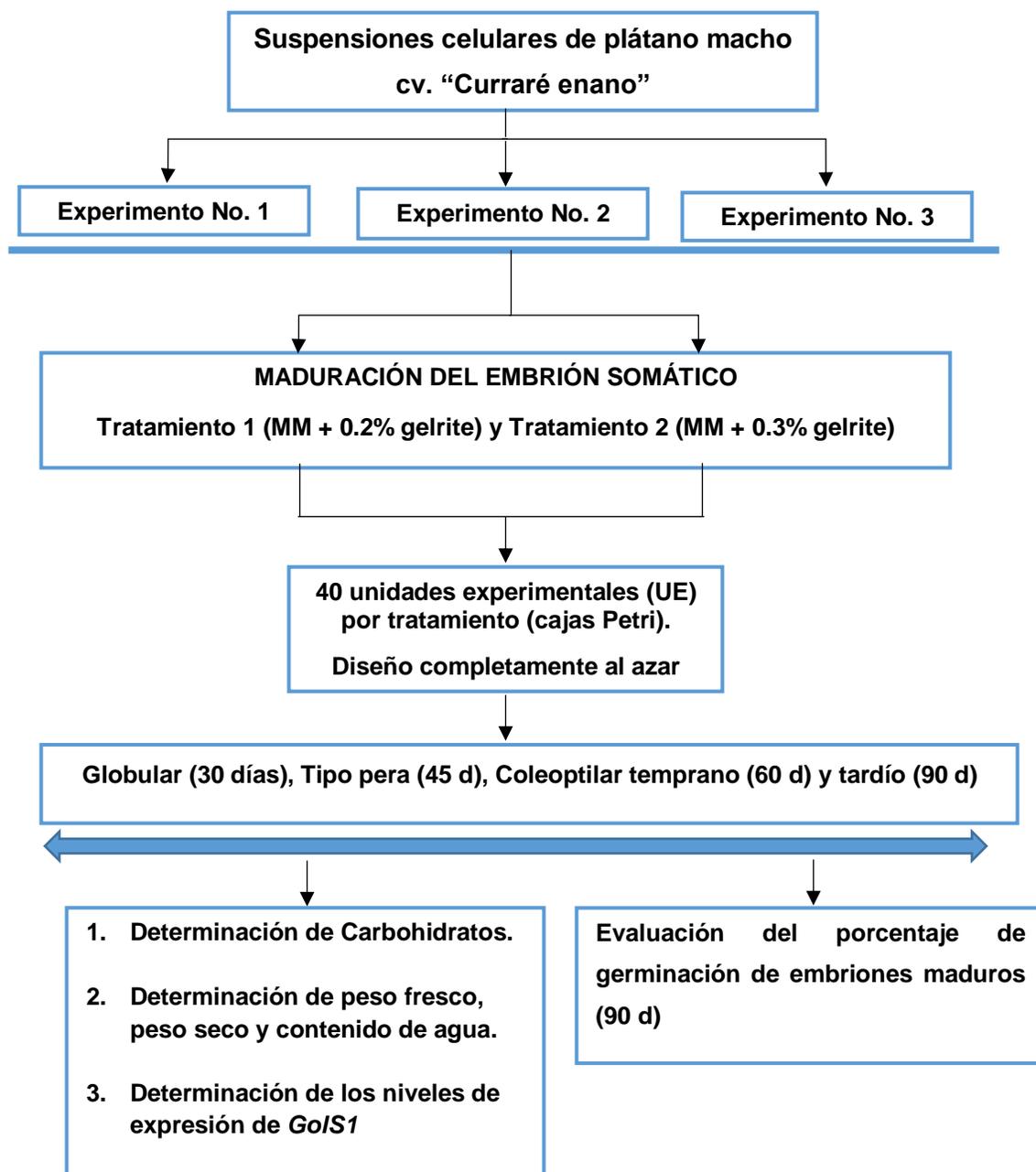


Figura 1.7. - Estrategia experimental.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Para el desarrollo del trabajo experimental se utilizaron embriones somáticos (ES), mismos que lograron su desarrollo en dos condiciones de medio de maduración. Para iniciar la maduración de los ES se empleó suspensiones celulares embriogénicas (SCE) finas, las cuales se obtuvieron después de una doble filtración, a través de mallas de 0.630, 0.254 mm sucesivas. La suspensión se ajustó a una 3% de paquete de volumen celular (PCV). Después de dos semanas, se tomaron alícuotas de 350 μ L de la suspensión fina, que contenía células pro-embriogénicas y embriones en estadio globular, y esparció sobre los medios de maduración con las dos concentraciones de Gelrite (0.2 y 0.3% p/v). Esto con la finalidad de determinar la influencia de los dos medios de maduración, con potenciales hídricos diferentes (0.27 y 0.28 MPa), en la maduración de los ES.

Pasados los 30, 45, 60 y 90 días se colectaron tres replicas independientes con 100 mg de ES de cada medio de maduración, se congelaron en nitrógeno líquido y almacenaron a -80°C hasta su uso. Las muestras biológicas se procesaron para realizar las determinaciones de perfil de carbohidratos, peso fresco, peso seco, contenido de agua, y el análisis del nivel de transcritos. El diseño completamente al azar constó de tres unidades experimentales, cada medio de maduración con 40 cajas Petri equivalentes cada una a una unidad experimental (UE) como se describe en el cuadro 1.2.

Cuadro 1.2 Muestras colectadas para el desarrollo del diseño experimental.

Experimento 1		Experimento 2		Experimento 3	
3 réplicas		3 réplicas		3 réplicas	
4 estadios	4 estadios	4 estadios	4 estadios	4 estadios	4 estadios
ARN	Carbohidratos	ARN	Carbohidratos	ARN	Carbohidratos
100 mg	10 mg	100 mg	10 mg	100 mg	10 mg
Total de muestra		Total de muestra		Total de muestra	
1200 mg	120 mg	1200 mg	120 mg	1200 mg	120 mg

BIBLIOGRAFÍA

- Angelovici, R., G. Galili, A. R. Fernie y A. Fait (2010). Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. *Trends in Plant Science*, 15 (4), 211-218.
- Bartos, P. M. C., H. T. Gomes, L. I. V. do Amaral, J. B. Teixeira y J. E. Scherwinski-Pereira (2018). Biochemical events during somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. *3 Biotech*, 8 (4), 209.
- Blochl, A., G. Grenier-de 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 (4), 1075-1082.
- Busch, W., M. Wunderlich y F. Schöffl (2005). Identification of novel heat shock factor-dependent genes and biochemical pathways in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 4 (1), 1-14.
- Businge, E., J. Bygdell, G. Wingsle, T. Moritz y U. Egertsdotter (2013). The effect of carbohydrates and osmoticum on storage reserve accumulation a germination of Norway spruce somatic embryos. *Physiologia Plantarum*, 149 (2), 273-285.
- Christelová, P., E. De-Langhe, E. Hribová, J. Cizková, J. Sardos, M. Husáková, I. Van den Houwe, A. Sutanto, A. Kay, R. Swennen, N. Roux, y J. Dolezel (2017). Molecular and cytological characterization of the global *Musa* germplasm collection provides insights into the treasure of banana diversity. *Biodiversity and Conservation*, 26 (4), 801-824.
- Chinnusamy, V., K. Schumaker y J. K. Zhu (2004). Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *Journal of experimental botany*, 55 (395) 225-236.
- De Langhe, C., L. Vrydaghs, P. De Maret, X. Perrier y T. Denham (2009). Why bananas matter: an introduction to the history of banana domestication. *Ethnobotany Research and Applications*, 7, 165-177.

-
- De Jesus, O. N., S. D. O Silva, E. P. Amorim, C. F. Ferreira, J. M. S. de Campos, Silva, G. de Gaspari Silva y A. Figueira (2013). Genetic diversity and population structure of *Musa* accessions in ex-situ conservation. *BMC Plant Biology*, 13 (1), 41.
- Dash, P. K. y R. Rai (2016). "Translating the "Banana Genome" to Delineate Stress Resistance, Dwarfing, Parthenocarpy and Mechanisms of Fruit Ripening. *Frontiers in Plant Science*, 7 (1543).
- 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 (4), 181-186.
- Escobedo-Gracia Medrano, 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. In *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications*. pp. 381-400: Springer.
- Escobedo-Gracia Medrano, R. M., C. I. Cruz-Cárdenas, L. A. Sánchez-Cach, J. R. Ku-Cauich y W. A. González-Kantún (2018). *In Vitro* Proliferation of Female Buds for Induction of Somatic Embryogenesis from False Horn Plantain (AAB, cv. Curraré). In *Plant Cell Culture Protocols*. (ed). Humana Press, New York, NY. pp. 215-226.
- Fan, Y., M. Yu, M. Liu, R. Zhang, W. Sun, M. Qian, y K. Zhang (2017). Genome-Wide Identification, Evolutionary and Expression Analyses of the GALACTINOL SYNTHASE Gene Family in Rapeseed and Tobacco. *International journal of molecular sciences*, 18 (12), 1540-1555.
- Finkelstein, R. R., S. S. Gampala y C. D. Rock (2002). Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *The Plant Cell*, 14, 15-45.
- Gangola, M., S. Jaiswal, Y. P. Khedikar, y R. N. Chibbar (2014). A reliable and rapid method for soluble sugars and RFO analysis in chickpea using HPAEC–PAD and its comparison with HPLC–RI. *Food chemistry*, 154, 127-133.
- González-Morales, S., I. Chávez-Montesa, A. Ricardo, C. Hayano-Kanashiroa, G. Alejo-Jacuinde, T. Rico-Cambron, S. De Folter, y L. Herrera (2016). Regulatory network

-
- analysis reveals novel regulators of seed desiccation tolerance in *Arabidopsis thaliana*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 113 (35), 232-241.
- Grapin, A., J. Schwendiman y C. Teisson (1996). Somatic embryogenesis in plantain banana. In Vitro Plant 32 (2), 66-71.
- Grigová, M., M. Kubeš, N. Drážná, T. Řezanka, y H. Lipavská (2007). Storage lipid dynamics in somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*): histochemical and quantitative analyses. Tree physiology, 27 (11), 1533-1540.
- Gurusinghe, S., y K. J. Bradford (2001). Galactosyl-sucrose oligosaccharides and potential longevity of primed seeds. Seed Science Research, 11 (2), 121-134.
- Gutiérrez, B., y M. Burgos-Hernández (2012). Musaceae. Instituto de Ecología de Veracruz: Flora de Veracruz.
- Häkkinen, Markku. (2013). Reappraisal of selectional taxonomy in *Musa* (*Musaceae*). International Association for Plant Taxonomy, 62 (4), 809-813.
- Heslop-Harrison, J., S. y T. Schwarzacher (2007). Domestication, Genomics and the Future for Banana. Annals of Botany, 5 (1), 1073-1084.
- Jafari, N., R. Yasmin, B. Chin, y N. Khalid (2015). Morphohistological and molecular profiles during the developmental stages of somatic embryogenesis of *Musa acuminata* cv. 'Berangan' (AAA). Acta Phisyologiae Plantarum, 37 (3), 1-12.
- Khalid, N., y B. C. Tan (2016). A to Z on Banana Micropropagation and Field Practices. In M. Anis & N. Ahmad (Eds.), Plant Tissue Culture: Propagation, Conservation and Crop Improvement. (ed). Springer, Singapore. pp.101-118.
- Kaçar, Y, A., y B. Faber (2012). Micropropagation of Banana. In Plant Cell Culture Protocols. (ed). Springer. pp.143-151.
- Kamura, E. y D. Kamura. (1995). Chapitre 7. Banana morphology-part II: the aerial shoot. Bananas and Plantains (ed.). Chapman and Hall, Chatham.

-
- Kito, K., K. Yamane, T. Yamamori, H. Matsuhira, Y. Tanaka, y T. Takabe (2018). Isolation, functional characterization and stress responses of raffinose synthase genes in sugar beet. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 27 (1), 36-45.
- Krikorian, A. y S. Cronauer (1984). Aseptic Culture Techniques for Banana and Plantain Improvement. *Economic Botany*, 38 (3), 322-331.
- Lamare, A., A. Mahmoudi, y S. Rama (2017). Phylogenetic implications of the internal transcribed spacers of nrDNA and chloroplast DNA fragments of *Musa* in deciphering the ambiguities related to the sectional classification of the genus. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 64 (6), 1241-1251.
- Laudencia-Chingcuanco, D. L., y W. H. Vensel (2008). Globulins are the main seed storage proteins in *Brachypodium distachyon*. *Theoretical and Applied Genetics*, 117 (4), 555.
- Leprince, O., A. Pellizzaro, S. Berriri, y J. Buitink (2017). Late seed maturation: drying without dying. *Journal of experimental botany*, 68 (4), 827-841.
- Li, T., Y. Zhang, D. Wang, Y. Liu, L. M. Dirk, J. Goodman y T. Zhao (2017). Regulation of Seed Vigor by Manipulation of Raffinose Family Oligosaccharides in Maize and *Arabidopsis thaliana*. *Molecular plant*, 10 (12), 1540-1555.
- Ma, S. (1991). Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension culture of banana. Paper presented at the Proceedings of the symposia of tissue culture horticulture crops, National Taiwan University.
- Meenakshi, S., B. N. Shinde y P. Suprasanna (2011). Somatic embryogenesis from immature male flowers and molecular analysis of regenerated plants in banana 'Lal Kela' (AAA). *J Fruit Ornam Plant Res*, 19, 15-30.
- Mukherjee, S., Sengupta, S., Mukherjee, A., Basak, P., y Majumder, A. L. (2019). Abiotic stress regulates expression of galactinol synthase genes post-transcriptionally through intron retention in rice. *Planta*, 249:891-912.
- Navarro, B., P. Elbl, A. De souza, V. Jardim, L. De Oliveira, A. Macedo, A. Dos Santos, M. Buckeridge, y S. Floh (2017). Carbohydrate-mediated responses during zygotic and early somatic

-
- embryogenesis in the endangered conifer, *Araucaria augustifolia*. *PLoS One*, 12 (7), 1-20.
- Nayar, N., M. (2010). The Bananas: Botany, Origin, Dispersal. *Horticultural Reviews*, 36, 117-164.
- Nunes, O., S. Oliveira E. Perito, C. Fortes, J. Salabert, G. De Gaspari, y A. Figueira (2013). Genetic diversity and population structure of *Musa* accessions in ex situ conservation. *BMC Plant Biology*, 13, 1-22.
- Panikulangara, T. J., G. Eggers-Schumacher, M. Wunderlich, H. Stransky, y F. Schöffl (2004). Galactinol synthase1. A novel heat shock factor target gene responsible for heat-induced synthesis of raffinose family oligosaccharides in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 136 (2), 3148-3158.
- Perrier, X., E. De Langhe, M. Donohue, C. Lentfer, L. Vrydaghs, F. Bakry y T. Denham (2011). Multidisciplinary perspectives on banana (*Musa* spp.) domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 (28), 11311–11318.
- Peterbauer, T., y A. Richter (2001). Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. *Seed Science Research*, 11 (3), 185-197.
- Pluskota, E., S. J. Wioletta, R. L. Obendorf, R. J. Gorecki y L. B. Lahuta (2015). Osmotic stress induces genes, enzymes and accumulation of galactinol, raffinose and stachyose in seedlings of pea (*Pisum sativum* L.). *Acta Physiologiae Plantarum* 37 (8), 156.
- Pukacka, S., E. Ratajczak y E. Kalemba (2009). Non-reducing sugar levels in beech (*Fagus sylvatica*) seeds as related to withstanding desiccation and storage. *Journal of plant physiology*, 166 (13), 1381-1390.
- Raut, S. P., y S. Ranade (2004). Diseases of banana and their management. In *Diseases of Fruits and Vegetables: Volume II.* (ed). Springer. pp. 37-52.

-
- Robinson, J. C., y V. Galán Saúco (2012). Plátanos y bananas. (ed). Paraninfo.
- Rushton, P. J., I. E. Somssich, P. Ringler, y Q. J. Shen (2010). WRKY transcription factors. *Trends in plant science*, 15 (5), 247-258.
- Santos, T., B. R. Barbosa de Lima, G. T. Nagashima, C. Petkowicz, V. Carpentieri-Pípolo, L. F. Pereira, D. L. Domingues, y L. G. Vieira (2015). Galactinol synthase transcriptional profile in two genotypes of *Coffea canephora* with contrasting tolerance to drought. *Genetics and Molecular Biology*, 38 (2), 182-190.
- Sengupta, S., S. Mukherje, P. Basak y L. Majumder (2015). Significance of galactinol and raffinose family oligosaccharide synthesis in plants. *Frontiers in Plant Science*, 6 (656), 1-11.
- Seki, M., A. Kamei, K. Yamaguchi-Shinozaki y K. Shinozaki (2003). Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection. *Current Opinion in Biotechnology*, 14 (2), 194-199
- Shinozaki, K., y K. Yamaguchi-Shinozaki (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of experimental botany*, 58 (2), 221-227.
- Strosse, H., R. Domergue, B. Panis, J-V. Escalant y F. Côte (2003). Banana and plantain embryogenic cell suspensions. INIBAP technical guidelines 8.
- Sprenger N. y F. Keller (2000). Allocation of raffinose family oligosaccharides to transport and storage pools in *Ajuga reptans*: the role of two distinct galactinol synthases. *The Plant Journal*, 21 (3), 249-258.
- Sun, Q. y A. C. Leopold (1997). Cytoplasmic Vitrification and Survival of Anhydrobiotic Organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 117(3), 327-333.
- Sowmya, H., T. Usharani y S. Mohandas (2016). Somatic Embryogenesis as a Tool in Genetic Transformation. In S. Mohandas & K. V. Ravishankar (Eds.), *Banana: Genomics and Transgenic Approaches for Genetic Improvement*. (ed). Springer Singapore. pp. 141-155.

-
- Tan-Wilson, A. L., y K. A. Wilson (2012). Mobilization of seed protein reserves. *Physiologia Plantarum*, 145 (1), 140-153.
- Taji, T., C. Ohsumi, S. Iuchi, M. Seki, M. Kasuga, M. Kobayashi y K. Shinozaki (2002). Important roles of drought-and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 29 (4), 417-426.
- Uma, S., S. Lakshmi, M. Saraswathi, A. Akbar y M. Mustaffa (2012). Plant regeneration through somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos of *Musa acuminata* ssp. *burmannica*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 48 (5), 539-545.
- Wang, Z., Y. Zhu, L. Wang, X. Liu, Y. Liu, J. Phillips y X. Deng (2009). A WRKY transcription factor participates in dehydration tolerance in *Boea hygrometrica* by binding to the W-box elements of the galactinol synthase (BhGolS1) promoter. *Planta*, 230 (6), 1155.
- Wong, C., R. Kiew, G. Argent, S. Ohn, L. Sing Kong y G. Yik Yuen (2002). Assessment of the Validity of the Sections in *Musa* (Musaceae) using AFLP. *Annals of Botany*, 90 (2), 231–238.

CAPÍTULO II

OPTIMIZACION DEL PROTOCOLO DE MADURACIÓN DEL EMBRION SOMÁTICO DE PLÁTANO MACHO CV. “CURRARÉ ENANO”

2.1 INTRODUCCIÓN

El mejoramiento genético tradicional del plátano (*Musa spp.*) está limitado debido a la poliploidia y la partenocarpia vegetativa que presenta. La propagación vegetativa convencional a través del uso de brotes axilares que emergen del rizoma (hijuelos de espada) no siempre puede satisfacer la demanda de genotipos élite para el cultivo de este frutal (Escobedo Gracia-Medrano *et al.*, 2016). Debido a esto, es preciso desarrollar protocolos eficientes para la multiplicación masiva *in vitro* de plantas de plátano de buena calidad (Khalid y Tan, 2016). La propagación *in vitro* de plátano está establecida y se han desarrollado protocolos tanto de organogénesis directa como de embriogénesis somática indirecta (ESI). Esta última, se ha convertido en una importante herramienta para la generación de plantas de calidad, debido a la alta proliferación y a la reducida inestabilidad genética (Ghag y Ganapathi 2017; Sowmya y Mohandas, 2016). Además, es una vía eficiente para la generación de plantas libres de patógenos, y para impulsar el mejoramiento biotecnológico por mutagénesis dirigida y transformación genética, así como la conservación de los recursos filogenéticos.

En plátano, uno de los principales problemas del cultivo *in vitro* mediante la embriogénesis somática es la generación de embriones con una alta capacidad de germinación. Protocolos desarrollados para el cultivar Enano gigante, entre otros, han demostrado poseer una baja tasa de germinación, la cual que va del 3 al 35%, dependiente del tamaño de los embriones transferidos en el medio, así como de la combinación de reguladores de crecimiento utilizados (Youssef *et al.*, 2010; Côte *et al.*, 1996).

En este capítulo se describe la optimización del protocolo de maduración del embrión somático (ES) de plátano macho cv. “Curraré enano” (Chifle) siguiendo el protocolo reportado por Escobedo Gracia-Medrano *et al.* (2018), para lo cual, partiendo de suspensiones celulares embriogénicas se probó el efecto de utilizar dos medios de maduración, tratamiento 1 (0.2% p/v) y 2 (0.3% p/v) de gelificante Gelrite, con diferente

potencial hídrico (0.27 y 0.28 MPa) respectivamente, para el desarrollo de los ES, ambos medios sin reguladores de crecimiento. A su vez, se evaluó la tasa de germinación de los embriones maduros para definir el mejor tratamiento (objetivo específico 1).

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 MATERIAL VEGETAL

Se utilizaron callos embriogénicos de plátano macho cultivar Curraré enano. El callo embriogénico fue generado en el laboratorio 22 de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del CICY, siguiendo el protocolo reportado por Escobedo Gracia-Medrano *et al.* (2018).

2.3 METODOLOGÍA

2.3.1 PROLIFERACIÓN DEL CALLO EMBRIOGÉNICO

El callo embriogénico de plátano macho, proveniente de medio MA, se proliferó en medio MA1 (Anexo 1). Para ello, se dosificaron 25 mL de medio MA1 en frascos de vidrio con capacidad de 100 mL, mismos que fueron esterilizados a 120°C por 20 min. Los frascos con el callo embriogénico (Figura 2.1) se mantuvieron en obscuridad a 24°C + 2°C, y el medio se renovó mensualmente.



Figura 2.1 Callo embriogénico de plátano macho cv "Curraré enano" (90 días de cultivo).

2.3.2 INDUCCIÓN DE LA SUSPENSIÓN CELULAR EMBRIOGÉNICA

La iniciación de una suspensión celular embriogénica (SCE) de buena calidad depende en gran medida de la calidad de los callos embriogénicos. Se seleccionaron porciones de tejidos que presentaban callos embriogénicos, friable y con una gran cantidad de pro-embriones translúcidos (Figura 2.1). Se pesaron 1.5 g del callo embriogénico y se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 250 mL, que contenía 45 mL de medio líquido M2 (Anexo 1) (Cote *et al.*, 1996) para iniciar la suspensión.

2.3.3 SUBCULTIVO Y MANTENIMIENTO DE LA SUSPENSIÓN CELULAR EMBRIOGÉNICA

Las suspensiones presentaban células heterogéneas, principalmente pro-embriones, agregados celulares y pequeños nódulos amarillentos (Grapin *et al.*, 2000). Durante el primer mes, los nódulos fueron eliminados durante los sub-cultivos semanales. Para cada sub-cultivo semanal, se conservó el 3% (v/v) del paquete de volumen celular (PVC), así como un tercio (15 mL) del medio antiguo pre-acondicionado y se adicionó 30 mL de medio M2 nuevo. Los matraces con la suspensión celular se mantuvieron en agitación a 90 rpm, en obscuridad a $24 \pm 2^\circ\text{C}$.

Después de tres meses de iniciada la SCE, ésta presentaba agregados de células embriogénicas proliferantes, pro-embriones y embriones globulares resultantes de la diferenciación de las células embriogénicas (Grapin *et al.*, 1996). Los agregados celulares y embriones globulares grandes fueron removidos cuando se encontraron en grandes cantidades dentro de la suspensión celular. La SCE se tamizó a través de una malla de 0.254 mm y con ayuda de un embudo colocado en la boca de un tubo Falcon Corning® de 50 mL estéril. Los pro-embriones y embriones globulares iguales o menores a 0.254 mm se dejaron sedimentar durante 20 min y después fueron re-suspendidos en medio M2 utilizando 15 mL del medio antiguo y 30 mL de medio nuevo, en un matraz Erlenmeyer de 250 mL. Los matraces se pusieron en un orbitador a 90 rpm, en obscuridad a una temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$.

Las suspensiones se mantuvieron entre dos y tres semanas en el medio M2 hasta conseguir que el PVC fuera el 3% del volumen total para posteriormente iniciar el proceso de maduración.

2.3.4 MEDIO DE MADURACIÓN DE LOS EMBRIONES SOMÁTICOS

El desarrollo del ES se llevó a cabo en un medio de maduración MM (Anexo 1), en este caso se probaron dos concentraciones diferentes de gelificante Gelrite (GelzanMR, Sigma-Aldrich): Medio de maduración 1 (MM1 + 2 g/L) y medio de maduración 2 (MM2 + 3 g/L), para determinar la influencia de un potencial hídrico diferente (0.27 y 0.28 MPa), en la maduración de los ES.

Una vez estériles, se vertieron 25 mL de medio MM en cajas Petri (100 x 15 mm). Se colocaron sobre las placas 350 μ L de la suspensión filtrada (M2), misma que constituida por numerosos pro-embriones y embriones globulares. La suspensión fue lavada previamente (tres veces) con medio M2 sin reguladores de crecimiento y los embriones se re-suspendieron en 50 mL de este mismo medio. Las cajas Petri fueron selladas e incubadas en obscuridad a $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 90 días, tiempo suficiente para el desarrollo de los ES en sus cuatro estadios. Después de 30, 45, 60 y 90 días se colectaron embriones en estadio globular, tipo pera, coleoptilar temprano y coleoptilar tardío, respectivamente. La colecta de cada uno de los estadios embrionarios en el medio de maduración fue realizada utilizando el estereoscopio Stemi DV4 bajo campana de flujo laminar. La colecta se realizó para la posterior extracción de carbohidratos y ARN.

2.3.5 GERMINACIÓN DE LOS EMBRIONES SOMÁTICOS

La viabilidad de los embriones en estadio coleoptilar tardío para formar una plántula se determinó en un medio de germinación (Anexo 1). Se seleccionaron embriones bien diferenciados, con una coloración blanco-opaca y con la presencia de la hendidura cotiledonaria del medio de maduración (MM) tanto del tratamiento 1 (MM1), como del tratamiento 2 (MM2) (Figura 2.2). En frascos con 25 mL de medio de germinación, se colocaron cinco embriones por frasco para un total de 20 frascos por tratamiento. Los frascos fueron mantenidos en oscuridad durante ocho días a una temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y posteriormente transferidos a un cuarto de cultivo con fotoperiodo (16 h). El porcentaje de germinación de embriones somáticos en estadio coleoptilar tardío (90 días) se determinó cuando se observaron claramente la emergencia de las primeras dos hojas verdes y dos o tres raíces y la formación de plántulas pequeñas de aproximadamente dos o tres semanas después del cultivo en medios de germinación bajo fotoperiodo.

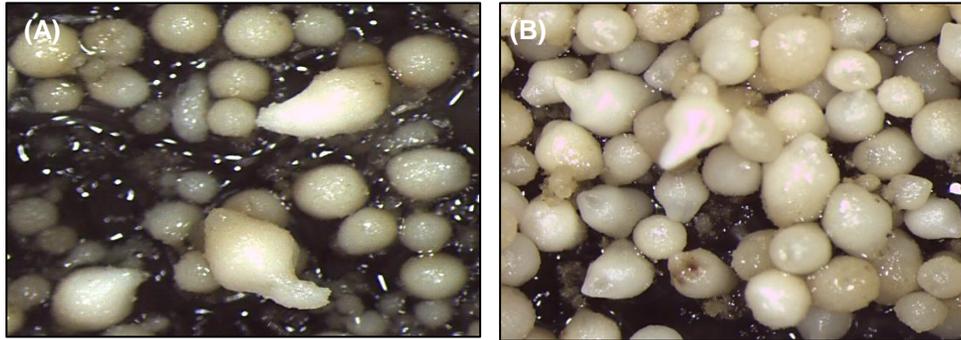


Figura 2.2 Embriones somáticos de plátano macho en dos medios de maduración. A) Embriones somáticos de 90 días en MM1. B) Embriones somáticos de 90 días MM2.

2.3.6 ANÁLISIS DE DATOS

Todos los experimentos se repitieron 3 veces independientemente. Cada experimento consistió de 20 unidades experimentales (UE) con 5 embriones por UE por tratamiento. El diseño experimental fue completamente al azar. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía ($p < 0.05$), seguido de la comparación múltiple de medias mediante la prueba de significancia de Tukey a un nivel de probabilidad del 5%, para lo cual se utilizó el programa Minitab® Statistical Software V 18.0 (Minitab Inc.).

2.4 RESULTADOS

2.4.1 INDUCCIÓN DE LA SUSPENSIÓN CELULAR EMBRIOGÉNICA A PARTIR DE CALLO EMBRIOGÉNICO DE PLÁTANO MACHO CV. “CURRARÉ ENANO”

Después de tres meses del mantenimiento y proliferación del callo embriogénico, se obtuvo la masa necesaria para la inducción de las suspensiones celulares embriogénicas (SCE). A las tres semanas de haber inducido las SCE, se observó la presencia de un sedimento en forma de arenilla en el fondo del matraz (Figura 2.3 A). Esto es indicativo de la presencia de agregados celulares, células heterogéneas, principalmente pro-embriones y embriones globulares en división celular activa, lo cual conlleva a un aumento en el paquete del volumen celular (PVC). Cuando el PVC incrementó su densidad al doble, se procedió a

filtrar la suspensión, obteniéndose un tipo de suspensión denominada suspensión hija (Figura 2.3 B), conformada por pequeños agregados celulares, pro-embriones y embriones somáticos en estadio globular. Esta última fue la ideal para inducir el desarrollo/maduración de los embriones.

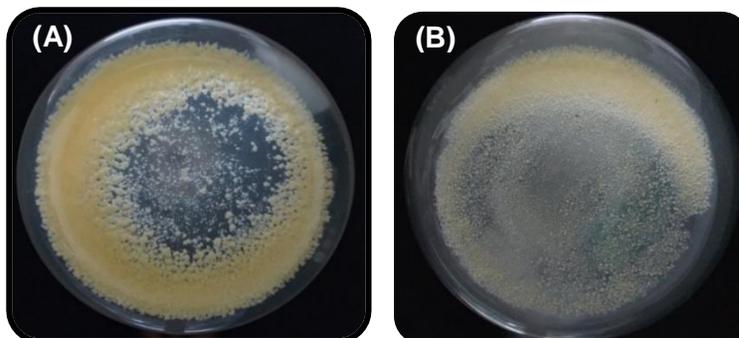


Figura 2.3 Suspensiones celulares embriogénicas de plátano macho cv. “Curraré enano”. **A)** Suspensión celular embriogénica inicial con agregados heterogéneos. **B)** Suspensión celular embriogénica filtrada.

2.4.2 DESARROLLO DE EMBRIONES SOMÁTICOS EN MEDIO DE MADURACIÓN

A partir del día 30 de la transferencia de las suspensiones finas con pro-embriones y embriones globulares al medio de maduración (MM), se determinó un incremento de la masa embriogénica, así como del tamaño de los embriones (Figura 2.4).

En el medio de maduración 1 (MM1), se registró un gran número de embriones inmaduros en estadio globular (Figura 2.4 A), a diferencia del medio de maduración 2 (MM2) donde se observaron embriones en estadio globular, pero también se comenzó a percibir la presencia de embriones en estadio tipo pera (flechas rojas figura 2.4 B). Lo anterior sugiere que el medio MM2 promovió la maduración de los embriones somáticos en un menor tiempo.

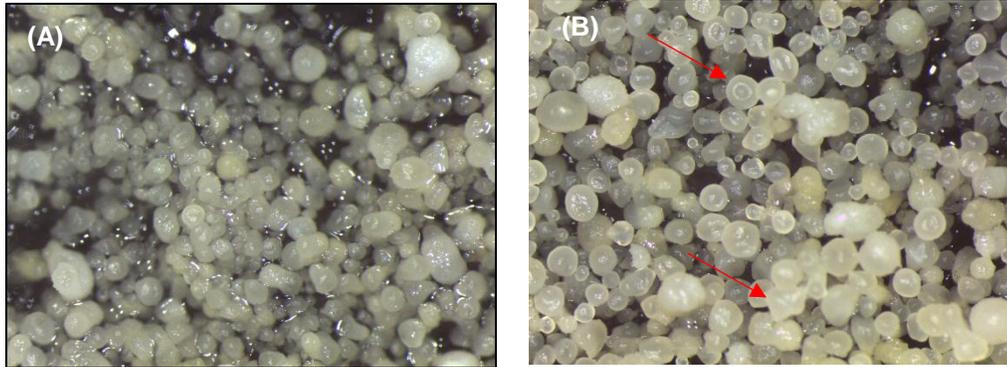


Figura 2.4 Embriones somáticos de plátano macho (30 días) en dos medios de maduración. A) Embriones somáticos en MM1. B) Embriones somáticos en MM2.

En el día 45, se empiezan a discernir un mayor número de embriones en estadio tipo pera en ambos tratamientos (Figuras 2.5 A y B), con la diferencia de que en el medio MM1 hay indicios en los embriones, tanto globulares como tipo pera, de una coloración café, indicativa de un cierto grado de fenolización (Figura 2.5 A), posiblemente debido al exceso de agua en el medio.

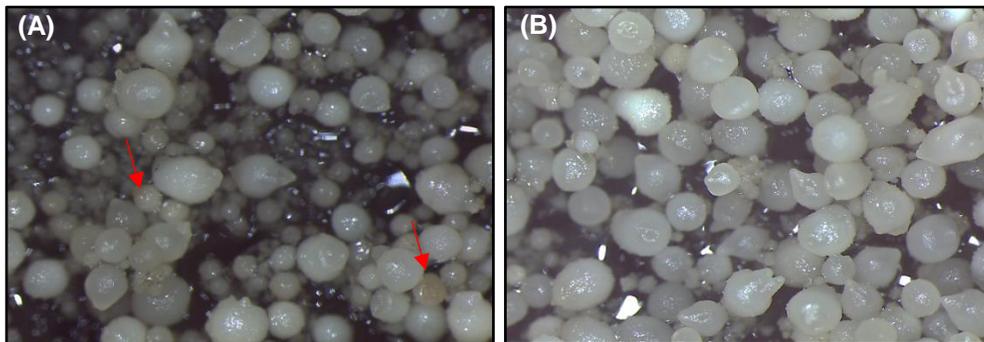


Figura 2.5 Embriones somáticos de plátano macho (45 días) en dos medios de maduración. A) Embriones somáticos en MM1. B) Embriones somáticos en MM2.

Transcurridos 60 días en el medio de maduración, se observó una mayor cantidad de embriones en estadio coleoptilar temprano (CT_{60}), mientras que para los 90, la mayoría de los embriones se estaban en el estadio coleoptilar tardío (CT_{90}). En la figura 2.6 A, se distinguen los embriones en el MM1 a los 60 días, en este caso los embriones presentaron una tonalidad blanca/café relacionada con cierta fenolización; sin embargo, la mayoría aun muestran una apariencia vítrea y aún mantienen una forma globular y tipo pera, algunos

pocos ya presentan morfología de CT₆₀ con la hendidura cotiledonaria. Por otra parte, en la figura 2.6 B, se pueden registrar que los embriones en su mayoría presentaban una tonalidad blanca/opaca, indicativa de la acumulación de almidón y pérdida de agua. Era evidente la presencia de la hendidura y en algunos de ellos, la emergencia de la plúmula.

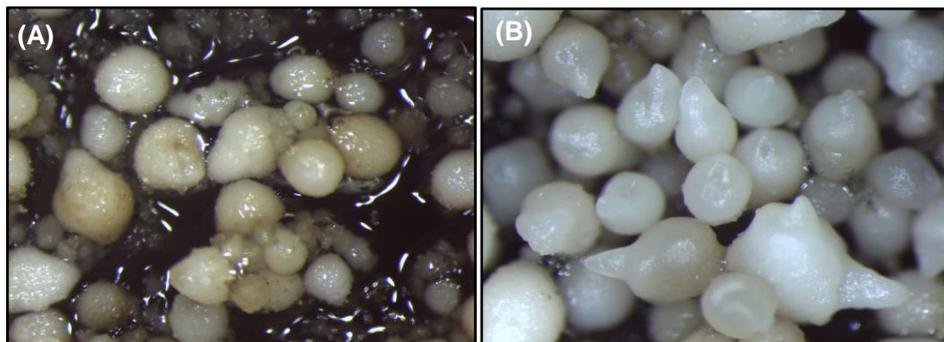


Figura 2.6 Embriones somáticos de plátano macho en dos medios de maduración. A) Embriones somáticos de 60 días en MM1. B) Embriones somáticos de 90 días MM2.

La eficiencia del cultivo *in vitro* vía embriogénesis somática de plátano macho para ambos tratamientos de maduración se evaluó cuantificando el número total de embriones que alcanzaron el estadio coleoptilar de maduración bajo ambos tratamientos MM1 y MM2. El número promedio de embriones a partir de 1 mL de suspensión celular fue de $2,879 \pm 292$ (CV= 12%) para MM1, lo que hace un total de 1.4×10^5 ES por matraz con 50 mL de suspensión. En tanto que para MM2 este número fue de $7,672 \pm 538$ (CV= 7%) para un total de 3.8×10^5 ES por matraz de 50 mL. Bajo el tratamiento MM2 se logró obtener 2.7 más embriones coleoptilares maduros que el tratamiento MM1.

2.4.3 GERMINACIÓN

Después de la quinta semana de ser transferidos los embriones coleoptilares tardíos (CT₉₀) al medio de germinación, se evidenció la presencia de la radícula y la plúmula (Figura 2.7 A). Después de los 60 días, las plántulas tenían más de cuatro raíces y de una a tres hojas verdes (Figura 2.7 B). A los 90 días, las plántulas con más de cuatro hojas estaban listas para individualizarse para transferirse a aclimatación.

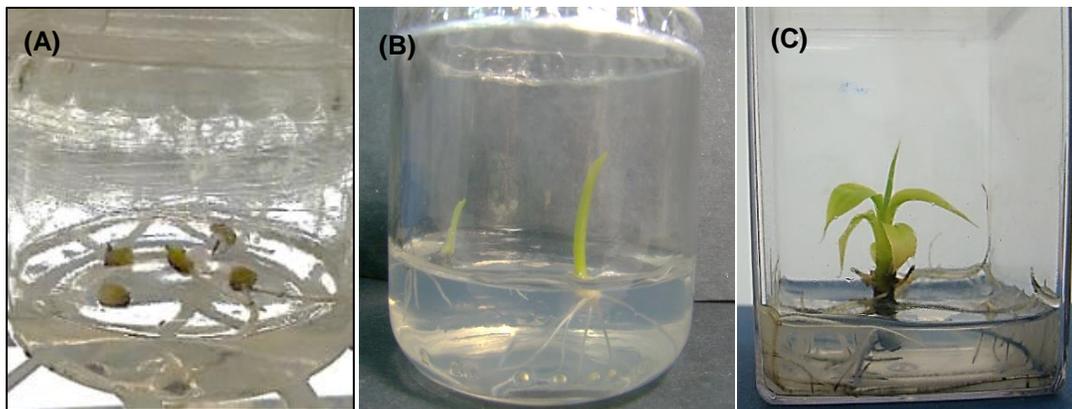


Figura 2.7 Germinación de embriones somáticos en estadio coleoptilar tardío de plátano macho cv. Curraré enano en medio de germinación, A) a los 35 días, B) 60 días, C) 90 días

Cuando se analizó el efecto del potencial hídrico de ambos tratamientos (0.27 MPa) y (0.28 MPa), en la maduración de los ES en estadio coleoptilar tardío CT_{90} sobre la tasa de germinación, se encontró una diferencia muy significativa en el porcentaje de germinación de los embriones provenientes de los dos diferentes tratamientos (Figura 2.8). Gran número de los embriones del tratamiento MM1 se necrosaron en el medio de germinación, observándose un 15% (± 4.07) de germinación, mientras que los embriones del tratamiento MM2, alcanzaron un valor del 84.0% (± 2.8), siendo en este sentido el medio MM2 con 3 g/L^{-1} de Gelrite y un potencial hídrico de 0.28 MPa el mejor tratamiento de maduración.

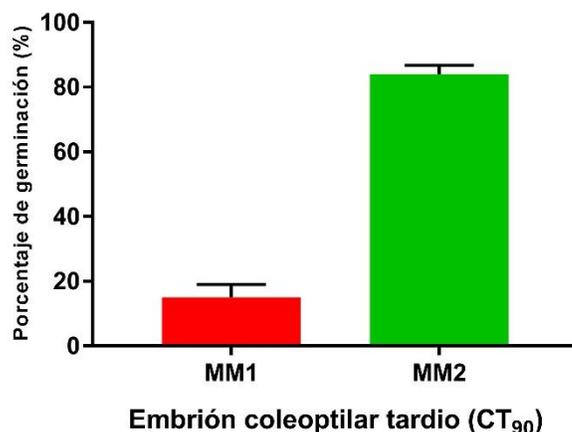


Figura 2.8 Porcentaje de germinación de embriones somáticos en estadio coleoptilar tardío CT_{90} de plátano macho cv. “Curraré enano” provenientes de los tratamientos en medio de maduración MM1 (2 g/L^{-1} gelrite) y MM2 (3 g/L^{-1} gelrite). Las barras indican

error estándar.

2.5 DISCUSIÓN

La embriogénesis somática (ES) en bananos y plátanos a través de la inducción de suspensiones celulares embriogénicas (SCE) ha sido descrita en variedades cultivadas diploides y triploides y es considerada como uno de los mejores sistemas para la generación a gran escala de genotipos de interés (Kumaravel, 2017). En nuestro trabajo, las suspensiones celulares embriogénicas tipo II, como las reportadas por Domergue y colaboradores (2000), se generaron a partir de callo embriogénico de plátano macho cv. “Curraré enano” formado de yemas en proliferación de flores femeninas inmaduras. Dichas suspensiones embriogénicas constituidas en su mayoría por agregados celulares embriogénicos resultaron ser excelentes para el desarrollo/maduración de embriones somáticos individuales.

En el género *Picea* se ha demostrado que la inducción de estrés hídrico en los embriones somáticos promueve su maduración (Shoji *et al.*, 2006; Attree *et al.*, 1991), siendo una situación poco probada en *Musa* spp. En el presente trabajo se demostró, el incremento del potencial hídrico en el medio de maduración por el aumento en la concentración del gelificante (de 2 g/L⁻¹ a 3 g/L⁻¹), así como la ausencia de reguladores de crecimiento en el medio, a diferencia de lo reportado por Côte *et al.*, (1996), tienen un papel muy importante tanto en el desarrollo embrionario, como en la tasa de germinación del embrión y su conversión a plántula en plátano macho cv. “Curraré enano” (Figura 2.9). Nuestros resultados apoyan las recientes evidencias reportadas por Enríquez y colaboradores (2018) en un cultivar diferente de plátano, el cultivar Manzano (AAB) del subgrupo Silk, en donde de igual manera, la disminución de la disponibilidad de agua en el medio por el aumento en la concentración de gelificante y la ausencia de reguladores de crecimiento, favorecieron el desarrollo embrionario y su maduración, alcanzando tasas de germinación del 95%.

En el transcurso de 90 días en el medio de maduración, se generaron embriones somáticos (ES) en estadio globular, tipo pera, coleoptilar temprano y coleoptilar tardío, los cuales fueron identificados por sus características morfológicas descritas para especies monocotiledóneas. Además, los embriones en estadio coleoptilar tardío presentaron una tasa de germinación del 84.0%. Estos resultados demuestran que la tasa de germinación de embriones de plátano macho cv. Curraré enano (AAB) fue más alto que los reportados

para otros cultivares con el mismo grupo genómico (AAB), como son los cultivares Rasthali (66%), Nendran (60-80%) y Rajeli (40%) en los cuales si fue común en uso de reguladores de crecimiento (Lekshmi *et al.*, 2017; Kulkarni, y Bapat, 2013; Srinivas *et al.*, 2006). Además, nuestros datos apoyan la observación que durante la maduración y la germinación de los embriones somáticos no se requiere de la presencia de fitoreguladores en los medios, para alcanzar altas tasas de germinación y conversión a planta de plátano (Enríquez *et al.*, 2018; Escobedo Gracia-Medrano *et al.*, 2018) lo cual puede ser un beneficio tanto económico como genético, ya que se disminuye la probabilidad de la variación somaclonal.

En resumen, este es uno de los primeros trabajos donde se logran obtener tasas de germinación por arriba del 80% en plátano macho cv. "Curraré enano", debido al favorable desarrollo y maduración de los ES en el medio de maduración. De dichos resultados se puede concluir que la disminución en la disponibilidad del agua de los ES en el medio de maduración por el aumento en la concentración de gelificante en el medio, propició el estrés hídrico necesario para su maduración, ya que como se mencionó anteriormente, este tipo de estrés favorece la acumulación de moléculas de reserva y osmoprotectoras como son las proteínas, lípidos y carbohidratos, principalmente la sacarosa y los RFO's, siendo estos últimos los relacionados con la tolerancia a la desecación en el embrión. Por este motivo, es necesario analizar el contenido de carbohidratos en los ES, para poder determinar si existe una correlación entre la acumulación de los RFO's y su maduración.

BIBLIOGRAFÍA

- Attree, S. M., D. Moore, V. K. Sawhney y L. C. Fowke (1991). Enhanced maturation and desiccation tolerance of white spruce [*Picea glauca* (Moench) Voss] somatic embryos: effects of a non-plasmolysing water stress and abscisic acid. *Annals of Botany*, 68 (6), 519-525.
- 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 (2), 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 (8), 748-754.
- Enriquez-Valencia, A. J., F. A. Vázquez-Flota, J. R. Ku-Cauich y R. M. Escobedo Gracia-Medrano (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*, doi.org/10.1007/s11240-018-1514-6
- Escobedo-Gracia-Medrano, R. M., Enríquez-Valencia, A. J., Youssef, M., López-Gómez, P., Cruz-Cárdenas, C. I., & Ku-Cauich, J. R. (2016). Somatic Embryogenesis in Banana, *Musa* ssp. *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications*. (ed). Springer. pp. 381-400.
- Escobedo-Gracia-Medrano, R. M., C. I. Cruz-Cárdenas, L. A. Sánchez-Cach, J. R. Ku-Cauich y W. A. González-Kantún (2018). In Vitro Proliferation of Female Buds for Induction of Somatic Embryogenesis from False Horn Plantain (AAB, cv. Curraré) *Plant Cell Culture Protocols*. (ed). Humana Press, New York, NY. pp. 215-226.
- Ghag, S. B. y T. R. Ganapathi (2017). Genetically modified bananas: To mitigate food security concerns. *Scientia Horticulturae*, 214, 91-98.

-
- Grapin, A., J. Ortíz, T. Lescot, N. Ferrière y F. Côte (2000). Recovery and regeneration of embryogenic cultures from female flowers of False Horn Plantain. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 61 (3), 237-244.
- Grapin, A., J. Schwendiman y C. Teisson (1996). Somatic embryogenesis in plantain banana. *In Vitro Plant* 32 (2), 66-71.
- Khalid, N y B. C. Tan (2016). A to Z on Banana Micropropagation and Field Practices. *In Plant Tissue Culture: Propagation, Conservation and Crop Improvement*. (ed). Springer, Singapore. pp. 101-118.
- 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 (1), 132-137.
- Kumaravel, M., S. Uma, S. Backiyarani, M. A. Saraswathi, M. M. Vaganan, M. Muthusamy y K. P. Sajith (2017). Differential proteome analysis during early somatic embryogenesis in *Musa* spp. AAA cv. Grand Naine. *Plant cell reports*, 36 (1), 163-178.
- Lekshmi, R. S., K. B. Soni, S. Alex, D. S. Nair, L. Sreekantan y B. R. Reghunath (2017). A rapid protocol for somatic embryogenesis mediated regeneration in banana (*Musa* spp.) cv. Nendran. *Journal of Horticultural Science*, 11 (2), 116-123.
- Shoji, M., H. Sato, R. Nakagawa, R. Funada, T. Kubo y S. Ogita (2006). Influence of osmotic pressure on somatic embryo maturation in *Pinus densiflora*. *Journal of forest research*, 11 (6), 449-453.
- Sowmya, H. D., T. R. Usharani y S. Mohandas (2016). Somatic Embryogenesis as a Tool in Genetic Transformation. In *Banana: Genomics and Transgenic Approaches for Genetic Improvement*. (ed). Springer, Singapore. pp. 141-155.

Srinivas, L., T. R. Ganapathi, P. Suprasanna y V. A. Bapat (2006). Desiccation and ABA treatment improves conversion of somatic embryos to plantlets in banana (*Musa* spp.) cv. Rasthali (AAB).

Strosse, H., R. Domergue, B. Panis, J. V. Escalant y F. Côte (2003). Banana and plantain embryogenic cell suspensions. INIBAP technical guidelines 8.

Youssef, M., A. James, A. Mayo-Mosqueda, J. R. Ku-Cauich, R. Grijalva-Arango y R. M. Escobedo-Gracia Medrano (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 (15), 2216-2223.

CAPÍTULO III

CAMBIOS FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS EN EL EMBRIÓN SOMÁTICO DE PLÁTANO MACHO CV. “CURRARÉ ENANO” DURANTE SU DESARROLLO/MADURACIÓN

3.1 INTRODUCCIÓN

La embriogénesis somática *in vitro* es un modelo utilizado para el estudio de los procesos fisiológicos y bioquímicos que ocurren durante el desarrollo/maduración de los embriones somáticos (ES). Existen diversos protocolos para la inducción de la embriogénesis somática en variedades comestibles de plátano, los cuales difieren en el tipo de explante que utilizan para la formación del callo embriogénico, como el uso de flores masculinas o flores femeninas inmaduras, yemas en proliferación (curds) o meristemos en proliferación (escalpos). Sin embargo, son pocos los trabajos enfocados en mejorar los protocolos para incrementar la tasa de germinación de los ES y la generación de plantas.

Como ha sido reportado en diferentes especies como *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Medicago truncatula* y *Medicago sativa*, la pérdida de agua durante la maduración del embrión, favorece la acumulación de moléculas osmoprotectoras y de reserva, como son los carbohidratos y entre los que se encuentran los oligosacáridos de la familia de la rafinosa (RFO's), estando estos relacionados con la tolerancia al estrés por desecación del embrión y el aumento en su capacidad germinativa (Leprince *et al.*, 2017; Bloch *et al.*, 2005).

Por ello, en el presente trabajo analicé los cambios fisiológicos y bioquímicos del embrión somático durante su desarrollo en dos medios de maduración (MM1 - 2 g/L⁻¹ y MM2 - 3 g/L⁻¹) con potenciales hídricos diferentes (0.27 MPa y 0.28 MPa), donde se evaluó el cambio en peso seco y contenido de agua (objetivo específico 2) de los ES de plátano macho cv. “Curraré enano”, así como los niveles de sacarosa, glucosa, fructuosa, *myo*-inositol, galactosa y galactinol, y los RFO's rafinosa y estaquiosa (objetivo específico 3) durante un curso temporal de 90 días.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE AGUA Y PORCENTAJE DE PESO SECO EN LOS EMBRIONES SOMÁTICOS DE PLÁTANO MACHO CV. “CURRARÉ ENANO”

El material biológico procedió de los experimentos de maduración de los ES, material que fue colectado como se describe en el capítulo II. La determinación del peso fresco, peso seco y contenido de agua se llevó a cabo en los estadios, globular, tipo pera, coleoptilar temprano y coleoptilar tardío, tanto del tratamiento 1 (MM1) como del tratamiento 2 (MM2). Para peso fresco, se colectaron aproximadamente 100 mg de tejido embrionario en tubos Eppendorf de 1.5 mL previamente etiquetados y pesados, los cuales se almacenaron a -80°C. Posteriormente, se liofilizó y pesó el contenido del tubo para obtener el porcentaje de peso seco de la siguiente manera:

$$\text{Peso seco} = (\text{Peso fresco del tejido} - \text{Peso del tejido liofilizado}) \times 100\%$$

Para la determinación del contenido de agua se utilizó la fórmula de Teyssier (*et al.*, 2011).

$$\text{Contenido de agua} = \text{Peso seco (mg)} - \text{Peso fresco (mg)} / \text{Peso seco (mg)}$$

El contenido de agua se expresó como mg H₂O/g peso seco (Dronne *et al.*, 1997).

3.2.2 EXTRACCIÓN DE CARBOHIDRATOS TOTALES

La extracción de carbohidratos totales se realizó en embriones en cada uno de los estadios de desarrollo de plátano macho cv. “Curraré enano”. Para la extracción se empleó el protocolo de Vespreet *et al.* (2012). Se utilizaron aproximadamente 10 mg de cada estadio de los embriones somáticos previamente liofilizados, los cuales fueron pulverizados con nitrógeno líquido en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Al polvo fino se le añadió 1 mL de etanol al 80% (v/v) y se incubó a 80°C en seco durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron los tubos a 9000 x g durante 10 min, se decantó el sobrenadante en un tubo de vidrio de 10 ml (S1), mientras que a la pastilla resultante se le agregó 1 mL de agua ultra pura y se dejó incubando 30 min a 50°C en seco. Al término de la incubación, 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 a 9,000 x g y el sobrenadante se transfiere al tubo S1 (previamente mencionado) y la pastilla resultante se desechó. Cabe mencionar que el contenido del tubo S1 se liofilizó antes de realizar la determinación de los perfiles de carbohidratos.

El material liofilizado se re-suspendió en 1 mL de agua grado HPLC y se filtró, primero a través de una membrana MILLEX™ de 0.45 µm seguido con filtros Phenex-NY de 0.20 µm y se almacenaron en viales ámbar a -20°C hasta que se realizaron los análisis de carbohidratos totales y perfiles de carbohidratos.

3.2.3 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS SOLUBLES POR HPLC-RID

La determinación de los carbohidratos solubles se realizó por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), empleando un cromatografo Agilent 1100®, equipado con un detector de índice de refracción (HPLC-RID) y utilizando una columna Rezex™ RCM-monosaccharide (300 x 7.8 mm), con un sistema de cartucho de guardia Carbo-Ca (4 x 3 mm) (Phenomenex, Torrance, CA, USA).

Para el análisis, se utilizó agua grado HPLC como fase móvil, la cual se filtró con una membrana Millipore® de 0.45 µm y se degasificó al vacío durante 30 min. Las condiciones de corrida fueron: fase móvil, agua grado HPLC a un flujo de 0.5 mL/min, temperatura de 75°C y presión de 30 bares. En el equipo se inyectaron 20 µL de cada una de las diluciones de los estándares (3 réplicas por dilución), así como las muestras de cada estadio embrionario (3 réplicas por estadio) con un tiempo de corrida de 30 minutos.

3.2.4 ESTÁNDARES Y CURVAS DE CALIBRACIÓN

Para realizar la cuantificación de los distintos carbohidratos se empleó el método del estándar externo, para lo cual, se realizaron diluciones seriadas (2, 4, 6, 8 y 10 mg/mL) a partir de un stock de 50 mg de cada uno de los carbohidratos para generar una curva de calibración para cada estándar (Anexo 2). Para su preparación se pesaron 50 mg de cada uno de los carbohidratos, disolvieron y se aforaron a 5 mL con agua grado HPLC y posteriormente, se filtraron utilizando membranas MILLEX™ de 0.45 µm y Phenex-NY de

0.20 µm. Las diluciones de cada uno de los estándares se almacenaron en viales color ámbar a -20°C hasta su análisis.

Los estándares utilizados fueron: galactinol, estaquiosa, sacarosa, glucosa, *myo*-inositol, fructosa, galactosa, rafinosa y manitol (todos de Sigma-Aldrich®).

3.2.5 PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN

Para determinar el porcentaje de recuperación (%R) (Gangola *et al.*, 2014), se utilizó una concentración conocida inicial (0.5 mg/ml) de un estándar interno (manitol), durante el proceso de extracción de carbohidratos en cada uno de los estadios embrionarios de plátano macho cv. "Curraré enano".

$$\% R = (\text{Concentración inicial} \times 100) / (\text{Concentración final})$$

Concentración final: Concentración del estándar interno después del proceso de extracción.

3.2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizaron tres réplicas de los análisis para cada carbohidrato por estadio embrionario de los dos tratamientos de cada experimento independiente. Los datos obtenidos fueron registrados y analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido por una prueba de Tukey de comparación múltiple de medias utilizando el programa Minitab® Statistical Software V 18.0 (Minitab Inc.). Las medias fueron consideradas significativamente diferentes con una $p \leq 0.05$.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 PORCENTAJE DE PESO SECO Y CONTENIDO DE AGUA DURANTE EL DESARROLLO-MADURACIÓN DE LOS EMBRIONES SOMÁTICOS

El contenido de agua y el porcentaje de peso seco (PS) en cada uno de los estadios de desarrollo del ES se evaluó en embriones colectados a los días 30, 45, 60 y 90 días de permanecer en los medios de maduración MM1 o MM2.

Durante los primeros 30 días, los embriones en estadio globular desarrollados en ambos medios (MM1 y MM2) no presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el contenido de agua (alrededor de $10 \text{ mg H}_2\text{O g}^{-1} \text{ PS}$) (Figura 3.1). Entre 45 y 90 días (del estado tipo pera a coleoptilar tardío) hubo una gradual pérdida del contenido de agua y un incremento en el porcentaje de PS en cada uno de los estadios en ambos tratamientos, sin embargo, los embriones en MM2 presentaron el menor contenido de agua (Figura 3.1), lo que se traduce en una mayor biomasa visto por el aumento en el porcentaje de PS (Figura 3.2). En el estadio coleoptilar tardío (90 días), fue donde se observó la mayor diferencia significativa ($p < 0.5$) en contenido de agua (5.27 mg y $2.75 \text{ mg H}_2\text{O g}^{-1} \text{ PS}$) entre los ES de los tratamientos MM1 y el MM2 (Figura 3.1).

Los presentes resultados demuestran que, durante la maduración del embrión globular al estadio pera, y al coleoptilar tardío hubo una desecación parcial, siendo más significativa al día 90, cuando los embriones coleoptilares tardíos en MM2, presentaron el menor contenido de agua (Figura 3.1).

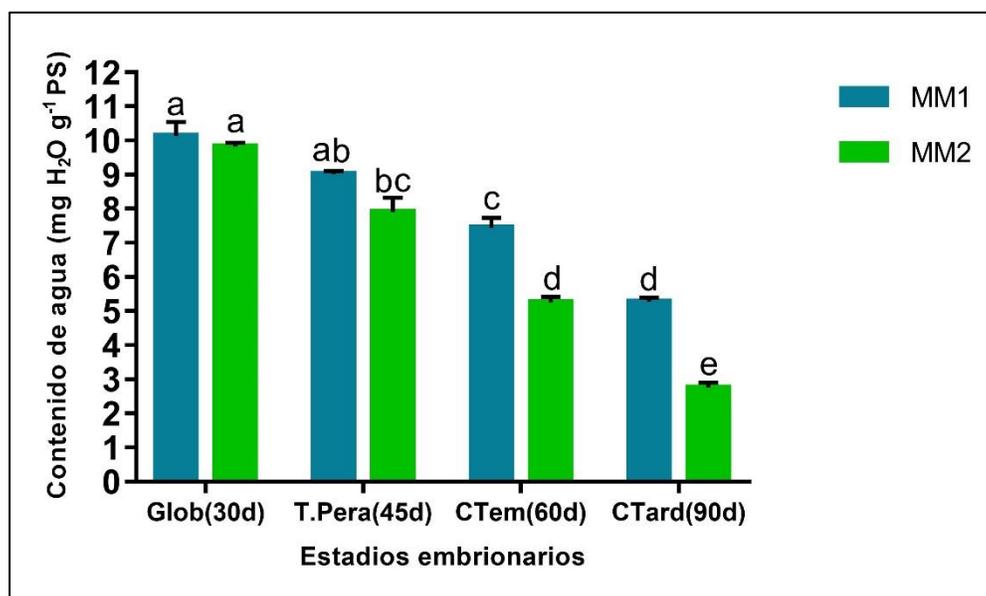


Figura 3.1 Contenido de agua en los embriones somáticos en los estadios, globular, tipo pera, coleoptilar temprano y coleoptilar tardío, desarrollados en el medio de maduración 1 (MM1) y el medio de maduración 2 (MM2). Las barras representan el error estándar ($n=3$). Valores con diferentes letras tiene diferencia significativa ($p < 0.05$; prueba de Tukey).

Por otra parte, se observó un incremento significativo en el porcentaje de peso seco ($p > 0.05$) a partir del estadio coleoptilar temprano (60 días) en el MM2 con valores de 16.02%, en comparación con el estadio globular (30 días) de 9.24% (Figura 3.2). En MM1, el incremento significativo ($p > 0.05$) se observó hasta el estadio coleoptilar tardío (90 días), con valores de 15.96%, en comparación con el estadio globular 9.01% (Figura 3.2). A pesar de que el incremento en el porcentaje de PS se dio en diferentes estadios embrionarios, al final, el estadio con mayor porcentaje de PS, en ambos tratamientos, fue el estadio coleoptilar tardío. Como resultado, los embriones en estadio coleoptilar tardío del MM2 fueron los que presentaron el mayor porcentaje de PS (26.77%) lo cual equivale en un incremento del 33.65% en PS comparado con el estadio globular. Esto nos muestra que una disminución de la presión osmótica ocasionada por el incremento del agente gelificante en el tratamiento MM2, se favorece la pérdida de agua y el incremento de PS en los estadios embrionarios de plátano macho.

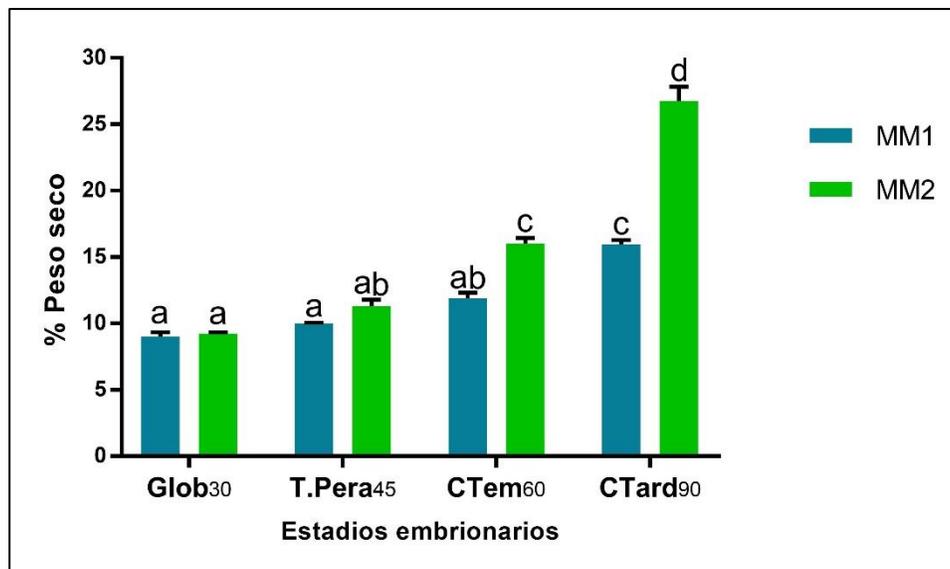


Figura 3.2 Peso seco de embriones en los estadios globular (30 días), tipo pera (45 días), coleoptilar temprano (60 días) y coleoptilar tardío (90 días) desarrollados en el medio de maduración 1 (MM1) y el medio de maduración 2 (MM2). Las barras representan el error estándar ($n=3$). Valores con diferentes letras presentan diferencias significativas ($p < 0.05$), de acuerdo con la prueba de Tukey.

3.3.2 TIEMPOS DE RETENCIÓN Y PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN

El uso del intercambio iónico para la separación de los carbohidratos y su detección mediante el método de HPLC-RID permitió la detección de los carbohidratos de interés durante el desarrollo del embrión somático. En el cuadro 3.1 se presentan los resultados de los tiempos de retención de los estándares individuales. El cromatograma de la mezcla de carbohidratos, que comprendió a todos los estándares del cuadro 3.1 mostró una buena separación entre todos los carbohidratos analizados, excepto el galactinol y glucosa, cuyos valores de retención no fueron iguales a los de su respectivo estándar individual, en su lugar aparece un pico con mayor amplitud a un tiempo de retención 14.252 min, que corresponde a un valor intermedio entre ambos carbohidratos, así como en la detección de los carbohidratos extraídos en los cuatro estadios embrionarios de plátano macho. A su vez, el porcentaje de recuperación para cada estadio embrionario fue de 85, 92, 96 y 86 % para los estadios globular, tipo pera, coleoptilar temprano y coleoptilar tardío, respectivamente. Esto nos indica la eficiencia del protocolo de extracción de carbohidratos empleado.

Cuadro 3.1 Tiempos de retención de los estándares de carbohidratos. Condiciones de corrida (fase móvil agua grado HPLC, flujo de 0.5 mL/min, temperatura 75°C y presión 30 bar).

Estándares	Tiempo de retención (min)
Estaquiosa	10.55
Rafinosa	11.22
Sacarosa	12.23
Galactinol	14.18
Glucosa	14.46
Galactosa	16.34
Myo-inositol	18.37
Fructosa	18.77

3.3.3 CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS SOLUBLES TOTALES

El cuadro 3.2 presenta los resultados de los niveles de sacarosa, glucosa, fructosa, galactosa, *myo*-inositol, así como de la rafinosa y estaquiosa, oligosacáridos de la familia de la rafinosa (RFO's), encontrados en los cuatro estadios de desarrollo del embrión somático bajo ambos tratamientos.

Durante el proceso de maduración, la sacarosa presentó la mayor acumulación en ambos tratamientos (Cuadro 3.2). En general, este carbohidrato mostró diferencias significativas entre tratamientos, existiendo mayores niveles en el tratamiento MM1 y siendo los estadios globular (30 días) y coleoptilar temprano (60 días) los que mostraron la mayor y menor acumulación, respectivamente (2,194.4 y 10,733.9 $\mu\text{g g}^{-1}$ PS). En el caso del tratamiento MM2, la sacarosa también reveló el menor contenido en el estadio globular, mientras que la mayor acumulación se dio en el estadio tipo pera (45 días) (1,481.8 y 5,531.88 $\mu\text{g g}^{-1}$ PS), respectivamente.

Cuadro 3.2 Contenido de carbohidratos ($\mu\text{g.gr}^{-1}$ PS) solubles en embriones somáticos (ES) de plátano macho cv. "Curraré enano", sometidos a dos tratamientos de maduración durante 90 días.

Tratamiento	Estadios del ES*	Sacarosa	Glucosa	Fructuosa	Galactosa	<i>Myo</i> -inositol	Rafinosa	Estaquiosa
MM1	1	2,194.4e	472.3c	160.75b	225.25c	122.24b	0.00e	0.00
	2	6,966.7b	835.0a	123.45cd	186.03d	93.87cd	0.00e	0.00
	3	10,733.9a	829.4 ^a	163.28b	236.05b	124.15b	0.00e	0.00
	4	3,655.0d	641.5b	162.97b	249.48a	123.92b	304.39d	0.00
MM2	5	1,481.9f	219.7d	133.53bc	127.28e	101.53bc	0.00e	0.00
	6	5,532.0c	480.0c	442.70a	248.30a	336.60 ^a	855.8b	0.00
	7	3,776.8d	185.3d	91.07e	187.97d	69.25e	972.96a	0.00
	8	3,737.0d	0.0e	100.32de	112.21f	76.28de	480.80c	72.53

Desviación estándar agrupada	160.11	16.86	11.01	3.80	8.34	14.43	2.11
-------------------------------------	--------	-------	-------	------	------	-------	------

*Estadios 1 y 5: Globular, 2 y 6: Tipo pera, 3 y 7: Coleoptilar temprano, 4 y 8: Coleoptilar tardío. Los valores con diferentes letras tienen diferencia significativa ($p < 0.05$) de acuerdo con la prueba de Tukey.

Con relación a los monosacáridos glucosa y fructosa, se observaron diferencias significativas entre los tratamientos y los estadios embrionarios. El tratamiento MM1 mostró, en general, mayores niveles que MM2 (Cuadro 3.2). En el tratamiento MM1, los niveles de glucosa para los estadios tipo pera y coleoptilar temprano (45 y 60 días) no mostraron diferencias significativas, siendo los que presentaron el mayor contenido, alrededor de $835 \mu\text{g g}^{-1}$ PS, seguido, en orden descendente por el coleoptilar tardío y el globular (641.5 y $472.3 \mu\text{g g}^{-1}$ PS), respectivamente. En el caso del tratamiento MM2, los niveles de glucosa fueron menores respecto de MM1, con el valor más alto para el estadio tipo pera, disminuyendo en el globular y el coleoptilar temprano (480 , 219.7 y $185.3 \mu\text{g g}^{-1}$ PS) y estando ausente en el coleoptilar tardío. En cuanto a los niveles de fructosa se encontraron diferencias significativas entre ambos tratamientos y estadios. Este carbohidrato mostró un rango que va desde 91.07 a $442.7 \mu\text{g g}^{-1}$ PS, siendo el estadio tipo pera del tratamiento MM2 el que mostró el valor más alto.

Por su parte, las moléculas que participan en la síntesis del galactinol, como es la galactosa y el *myo*-inositol, estuvieron presentes en todos los estadios embrionarios, alcanzando los valores máximos de acumulación en el estadio Coleoptilar tardío ($249.48 \mu\text{g g}^{-1}$ PS y $123.9 \mu\text{g g}^{-1}$ PS) del tratamiento MM1, y en el estadio tipo pera del tratamiento MM2 ($248.30 \mu\text{g g}^{-1}$ PS y $336.63 \mu\text{g g}^{-1}$ PS), respectivamente. En relación a los RFO's, únicamente estuvo presente la rafinosa en el estadio coleoptilar temprano del tratamiento MM1 con un valor de ($304.38 \mu\text{g g}^{-1}$ PS), mientras que en el tratamiento MM2, se encontraron valores de rafinosa a partir del estadio tipo pera ($855.8 \mu\text{g g}^{-1}$ PS), aumentando su concentración en el estadio coleoptilar temprano ($972.96 \mu\text{g g}^{-1}$ PS) y disminuyendo en el coleoptilar tardío ($480.82 \mu\text{g g}^{-1}$ PS). Otro oligosacárido detectado fue la estaquiosa, el cual estuvo presente únicamente el estadio coleoptilar tardío del tratamiento MM2, con una concentración de $72.52 \mu\text{g g}^{-1}$ PS (Cuadro 3.2). En general, se observó que la mayor acumulación de carbohidratos, pero fundamentalmente de los RFO's se da en los estadios tipo pera y coleoptilar temprano del

MM2, lo que sugiere que en estos estadios muy probablemente inicie la tolerancia a la desecación.

3.4 DISCUSIÓN

En el presente trabajo se evaluó el efecto que tendría el cambio de la presión osmótica del medio sobre la pérdida de agua y la ganancia de biomasa, resultado de la acumulación de moléculas de reserva de los embriones somáticos de plátano macho cv. “Curraré enano” en desarrollo. Para ello, se determinaron los cambios en el contenido de agua, el peso seco, así como los niveles de carbohidratos solubles en cada uno de los estadios embrionarios (globular, tipo pera, coleoptilar temprano y coleoptilar tardío).

Los resultados obtenidos muestran diferencias en todos los parámetros medidos en los embriones somáticos desarrollados en diferentes medios a pesar que estos provienen de la misma suspensión celular. Éstas influyen significativamente en la capacidad del embrión para germinar, como se observa en el capítulo dos (Figura 2.8). La pérdida gradual de agua ocurrió en ambos tratamientos (Figura 3.1), sin embargo, en el medio con el potencial hídrico mayor (0.28 MPa), los embriones en el estadio coleoptilar tardío presentaron el menor contenido de agua. Esto concuerda con lo reportado en embriones cigóticos de *Arabidopsis thaliana*, en los que en la fase de maduración tardía se observa el menor contenido de agua y comienza la tolerancia a la desecación (Leprince *et al.*, 2017).

Existe evidencia de que los oligosacáridos de la familia de la rafinosa (RFO's) se acumulan bajo diferentes condiciones de estrés, tanto biótico como abiótico, en diferentes tejidos de las plantas, pero especialmente en la semilla, durante el desarrollo del embrión cigótico, donde tanto la sacarosa como los RFO's juegan un papel importante en la generación de tolerancia al estrés por desecación (Sengupta *et al.*, 2015). Klimaszewska y Smith (1997) mostraron que un potencial osmótico menor, producto de una alta concentración de gelificante en el medio, promueve la maduración de los embriones somáticos en *Pinus strobus*. Los autores lo atribuyeron a la reducción de la disponibilidad del agua en el medio. Los mismos resultados fueron reportados por Malabadi *et al.*, (2004) para *Pinus kesiya*, o por Lelu-Walter *et al.*, (2018) para *Pseudotsuga menziessi* donde demostraron que la reducción en la disponibilidad del agua por un aumento en la concentración de gelificante (Phytigel) en el medio, promueve la maduración de los embriones somáticos. Esto sugiere

que con la pérdida gradual de agua durante el desarrollo embrionario se promueven cambios fisiológicos en el embrión, necesarios para su correcta maduración, siendo uno de ellos la síntesis de carbohidratos solubles. Si por el contrario, los embriones son sometidos a una rápida desecación, no desarrollarán las características indicativas de una buena maduración, como demostraron Adams y Rinne (1983) en semillas de soya.

Son pocos los trabajos en los cuales se analiza la presencia de los compuestos claves para la síntesis de los oligosacáridos de la familia de la rafinosa, *myo*-inositol, galactosa, y sacarosa, así como los RFO's, rafinosa y estaquiosa, en cada uno de los estadios embrionarios. Uno de ellos, es el reportado por Horbowicz *et al.*, (1995), quienes identificaron y cuantificaron a los carbohidratos en ES de *Medicago Sativa*. En el estadio globular, tipo pera y coleoptilar, la presencia de glucosa, *myo*-inositol y sacarosa, se relacionó con mis resultados, no así su concentración, las cuales fueron entre 5 y 6 veces mayores en el caso de la sacarosa y el *myo*-inositol. Con relación a los RFO's, reportaron la presencia de rafinosa y estaquiosa en cada uno de los estadios embrionarios, los cuales alcanzaron sus valores máximos en el estadio coleoptilar. A diferencia de los embriones de plátano macho, donde la rafinosa fue identificada en los estadios tipo pera, coleoptilar temprano y coleoptilar tardío, alcanzando sus valores máximos en el estadio tipo pera. A su vez, la estaquiosa únicamente fue identificada en el estadio coleoptilar tardío. Cabe destacar que debido a la cercanía de los picos del tiempo de retención de los estándares de galactinol y glucosa (14.18 y 14.46 min), y que cuando se analizaron las muestras experimentales correspondientes, el rango los picos de retención detectados varió entre 14.22 y 14.46 min, fue imposible discriminar con certeza la presencia de ambos carbohidratos en los estadios embrionarios. Por ello, se excluyó del análisis el galactinol. Por lo anterior es recomendable realizar el análisis del galactinol y glucosa mediante cromatografía de gases para poder hacer una distinción entre ambas moléculas.

La sacarosa fue el carbohidrato con mayor acumulación en los embriones somáticos de plátano macho, lo cual fue demostrado por Gangola *et al.*, (2014) y Xiaoli *et al.*, (2008) en semillas de garbanzo y en semillas de soya (Giannoccaro *et al.*, 2008), donde la concentración de sacarosa se encontró en un rango entre 5 y 10% del total de carbohidratos cuantificados. Se ha determinado que las concentraciones de sacarosa aumentan durante la maduración de los embriones y su función ha sido relacionada con la expansión celular, la morfogénesis y la síntesis de almidón (Khan *et al.*, 2015; Gibson, 2005).

Con respecto a los RFO's, la rafinosa fue el oligosacárido que presentó la mayor concentración durante el desarrollo/maduración de los embriones somáticos, pero principalmente en los estadios tipo pera y coleoptilar temprano del MM2 (Cuadro 3.2), esto se relaciona con la gradual pérdida de agua en los embriones (Figura 3.1) y probable adquisición de tolerancia a la desecación del embrión. Estos resultados concuerdan con lo reportados por Peterbauer y Richter (2001), ya que la rafinosa es el oligosacárido predominante durante el desarrollo de semillas monocotiledóneas. Además, se ha reportado que existe una correlación entre el contenido total de RFO's y la proporción de RFO's /Sacarosa, y no la cantidad individual de RFO's, en la adquisición de tolerancia a la desecación durante el desarrollo embrionario y el vigor de la semilla (Li *et al.*, 2017). Los RFO's presentes, posiblemente participan en la generación de un estado vítreo condensado, esto para evitar la completa desecación del embrión y evitar la formación de solutos cristalinos que puedan dañar a la célula. A su vez, actúa protegiendo a las membranas celulares y permitiendo el flujo molecular necesario para que se lleven a cabo las reacciones químicas (Poonam *et al.*, 2016; Rosental y Fait, 2014). En el caso de los ES desarrollados en el tratamiento MM1, no hubo un cambio significativo en la concentración de los carbohidratos identificados, observando únicamente una disminución en la concentración de sacarosa en el estadio coleoptilar tardío, lo cual se puede relacionar con la presencia de la rafinosa, ya que la sacarosa es un precursor para su biosíntesis.

El presente trabajo es uno de los primeros donde se evalúa la presencia y el contenido de carbohidratos solubles y de RFO's en los embriones somáticos de plátano macho cv. "Curraré Enano". De hecho, el haber encontrado rafinosa en mayor cantidad en los embriones de estadios más avanzados de maduración del tratamiento MM2, y en menor cantidad la estaquiosa en solo el estadio coleoptilar tardío, sugiere de la presencia de galactinol, por ser precursor de rafinosa. Siendo que plátano es una monocotiledónea, nuestros resultados apoyan lo encontrado en maíz de que la rafinosa contribuye más a la posa de RFO's en monocotiledóneas, a diferencia en las dicotiledóneas donde se ha reportado que la estaquiosa y verbascosa son las que contribuyen más a dicha posa de que la rafinosa (Li *et al.* 2017).

En resumen, este es el primer trabajo donde se analizan parámetros fisiológicos y bioquímicos en embriones somáticos de plátano cv. "Curraré enano" en sus cuatro estadios de desarrollo/maduración. De dicho análisis se puede concluir que existen diferencias en el

estrés osmótico ocasionado por la reducción en la disponibilidad de agua en ambos tratamientos (MM1 contra MM2), siendo en el segundo donde se promovió una mayor desecación del embrión y a su vez hubo una mayor acumulación de compuestos de reserva, como es la sacarosa y los RFO's. Esto a su vez nos puede sugerir, que el aumento en el potencial hídrico y la relación en la acumulación de sacarosa/RFO's promovieron la adquisición de la tolerancia a la desecación en los ES del tratamiento MM2, generando embriones viables, y con una mayor capacidad de germinación.

BIBLIOGRAFIA

- Adams, C. A., M. C. Fjerstad, y R. W. Rinne (1983). Characteristics of Soybean Seed Maturation: Necessity for Slow Dehydration 1. *Crop Science*, 23 (2), 265-267.
- Bloch, A., G. M. Grenier-de March, T. Sourdioux y Peterbauer y A. Richter (2005). Induction of raffinose oligosaccharide biosynthesis by abscisic acid in somatic embryos of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Science*, 168 (4), 1075-1082.
- Gangola, M. P., S. Jaiswal, Y. P. Khedikar y R. N. Chibbar (2014). A reliable and rapid method for soluble sugars and RFO analysis in chickpea using HPAEC–PAD and its comparison with HPLC–RI. *Food chemistry*, 154, 127-133.
- Giannoccaro, E., Y. J. Wang y P. Chen (2008). Comparison of two HPLC systems and an enzymatic method for quantification of soybean sugars. *Food Chemistry*, 106 (1), 324-330.
- Gibson, S. I. (2005). Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Current opinion in plant biology*, 8 (1), 93-102.
- Horbowicz, M., R. L. Obendorf, B. D. McKersie y D. R. Viands (1995). Soluble saccharides and cyclitols in alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos, leaflets, and mature seeds. *Plant Science*, 109 (2), 191-198.
- Khan, M. A., B. H. Abbasi, H. Ali, M. Ali, M. Adil y I. Hussain (2015). Temporal variations in metabolite profiles at different growth phases during somatic embryogenesis of *Silybum marianum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 120 (1), 127-139.
- 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 (4), 949-957.
- Lelu-Walter, M. A., F. Gautier, K. Eliášová, L. Sanchez, C. Teyssier, A. M. Lomenech y C. Reeves (2018). High gellan gum concentration and secondary somatic embryogenesis: two key factors to improve somatic embryo development in *Pseudotsuga menziesii*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 132 (1), 137-155.

-
- Leprince, O., A. Pellizzaro, S. Berriri, y J. Buitink (2017). Late seed maturation: drying without dying. *Journal of experimental botany*, 68 (4), 827-841.
- Li, T., Y. Zhang, D. Wang, Y. Liu, L. M. Dirk, J. Goodman y T. Zhao (2017). Regulation of Seed Vigor by Manipulation of Raffinose Family Oligosaccharides in Maize and *Arabidopsis thaliana*. *Molecular plant*, 10 (12), 1540-1555.
- Malabadi, R. B., H. Choudhury y P. Tandon (2004). Initiation, maintenance and maturation of somatic embryos from thin apical dome sections in *Pinus kesiya* (Royle ex. Gord) promoted by partial desiccation and Gellan gum. *Scientia Horticulturae*, 102 (4), 449-459.
- Peterbauer, T. y A. Richter (2001). Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. *Seed Science Research*, 11 (3), 185-197.
- Poonam, R. B., N. Handa, H. Kaur, A. Rattan y S. Bali (2016). Sugar signalling in plants: a novel mechanism for drought stress management. *Water Stress and Crop Plants*, 287-302.
- Rosental, L., H. Nonogaki y A. Fait (2014). Activation and regulation of primary metabolism during seed germination. *Seed Science Research*, 24(1), 1-15.
- Sengupta, S., S. Mukherje, P. Basak, y L. Majumder (2015). Significance of galactinol and raffinose family oligosaccharide synthesis in plants. *Frontiers in Plant Science*, 6 (656), 1-11.
- Teyssier, C., C. Grondin, L. Bonhomme, A. M. Lomenech, M. Vallance, D. Morabito y M. A. Lelu-Walter (2011). Increased gelling agent concentration promotes somatic embryo maturation in hybrid larch (*Larix eurolepsis*): a 2-DE proteomic analysis. *Physiologia plantarum*, 141 (2), 152-165.
- 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 (9), 2102-2107.

CAPÍTULO IV

EXPRESIÓN DEL GEN GALACTINOL SINTASA EN CUATRO ESTADIOS DE DESARROLLO EMBRIONARIO DE PLÁTANO MACHO CV. “CURRARÉ ENANO”

4.1 INTRODUCCIÓN

Los oligosacáridos de la familia de la rafinosa (RFO's), especialmente rafinosa y estaquiosa, juegan un importante papel en la tolerancia al estrés por desecación. Estas moléculas son sintetizadas y almacenadas principalmente en semillas, protegiendo al embrión de la desecación asociada a la maduración (Sengupta *et al.*, 2012), aunque también se acumulan en otros tejidos. Galactinol sintasa (*GoS*), es la enzima clave para la biosíntesis de los RFO's, sintetizando galactinol a partir de la UDP-galactosa y el *myo*-inositol, y la cual actúa como molécula donadora de unidades de galactosa, para la síntesis de rafinosa y estaquiosa (Panikulangara *et al.*, 2004).

Han sido identificados un gran número de isoformas del gen *GoS* en diferentes plantas, con funciones específicas y expresiones localizadas. En *Arabidopsis thaliana*, *Boea hygrometrica*, *Coffea arabica* y *Zea mays*, se ha demostrado que la sobre expresión del gen *GoS*, bajo condiciones de estrés, induce la acumulación de grandes cantidades de galactinol, así como de rafinosa y estaquiosa, lo que ocasiona mayor tolerancia de las plantas al estrés. De igual manera, se ha detectado un aumento en el número de transcritos del gen *GoS* durante el desarrollo de las semillas, posiblemente aminorando la condición de estrés por desecación (Krasensky y Jonak, 2012; Dos santos *et al.*, 2011; Tajin *et al.*, 2002).

Es por ello que en el presente trabajo se utilizó la PCR tiempo real (RT-qPCR) para evaluar el comportamiento de la expresión del gen galactinol sintasa (*GoS1*) en cada uno de los estadios de desarrollo/maduración del embrión somático de plátano macho cv. “Curraré Enano” sometidos a dos condiciones de presión hídrica en el medio de maduración.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 EXTRACCIÓN DE ARN

La extracción se realizó empleando la metodología de Chomczynski y Sacchi (1987). Se pesaron aproximadamente 100 mg de embriones somáticos (ES) previamente almacenados a -80°C. Se transfirió el tejido embrionario a un mortero pre-enfriado y se pulverizó vigorosamente. Una vez obtenido un polvo fino, se adicionaron 200 µL de TRIzol™ Reagent (Invitrogen™) al mortero, y se continuó con la molienda. El homogenizado final se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se le adicionaron 200 µL de TRIzol™ Reagent. El tubo se agitó vigorosamente con ayuda del vortex y se incubó en hielo durante 30 min. Pasado este tiempo, se centrifugó a 13 000 rpm (16,060x g) a 4°C durante 15 min. El sobrenadante resultante se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo (midiendo previamente su volumen) y se le adicionaron 2/10 partes de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se agitó vigorosamente con ayuda de vortex y se centrifugó a 13000 rpm (16,060x g) a 4°C durante 20 min. El sobrenadante resultante se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 ml y se le adicionó un volumen de isopropanol frío, se agitó por inversión e incubó a -80 °C durante 30 min. Después se dejó descongelar en hielo 5 min y se centrifugó a 13 000 rpm (16 060 x g) a 4°C durante 25 min. Luego se decantó el sobrenadante cuidadosamente para evitar la pérdida de la pastilla presente en el fondo del tubo. La pastilla se lavó dos veces con 300 µL de etanol al 70% (v/v), se agitó por inversión gentilmente y se centrifugó a 13 000 rpm (16060 x g) a 4°C durante 5 min (este paso se realizó dos veces). Finalmente, se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 300 µL de etanol al 100% y se centrifugó a 13 000 rpm (16 060 x g) a 4°C durante 15 min. Se eliminó el sobrenadante con mucho cuidado para no perder la pastilla y el tubo se colocó invertido sobre un papel estéril para dejar secar la pastilla a temperatura ambiente.

La pastilla se re-suspendió en 50 µL de agua ultra pura libre de ARNasas y se almacenó a -20°C para su posterior cuantificación.

4.2.2 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ARN TOTAL

La determinación de la concentración de ARN total se realizó por medio de espectrofotometría, utilizando el NanoDrop™ 2000. Se colocó en el sensor del equipo 1 µL de muestra y se realizaron las lecturas. Para determinar la pureza del ARN total se

emplearon los datos de las relaciones A_{230}/A_{280} y A_{260}/A_{280} . La concentración de ARN total se reportó en ng/ μ L.

4.2.3 DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DEL ARN TOTAL EN GEL DE AGAROSA

El análisis de la calidad del ARN se llevó a cabo utilizando un gel de agarosa al 1% en condiciones desnaturalizantes. Para su preparación se utilizó TBE 10X (890 mM Tris-base, 890 mM ácido bórico y 20 mM EDTA).

Antes de la corrida, las muestras de ARN se prepararon de la siguiente manera: se realizó una dilución del ARN total a una concentración de $1\mu\text{g}/10\mu\text{L}$ en tubos Eppendorf de 0.60 mL, se le adicionaron 17 μL de buffer desnaturalizante (2.77 M formamida, MOPS 10X, 12.30 M formaldehído) y se incubaron a 65°C durante 5 min. Después los tubos fueron colocados en hielo. Posteriormente se añadieron 2 μL de buffer de carga (50% glicerol, 1 mM EDTA, 0.025% de azul de bromofenol y 10 mg/mL de bromuro de etidio) y se cargaron en el gel 5 μL . Las condiciones de corrida fueron 80 volts durante 45 min. Para poder observar la integridad del ARN en el gel se utilizó el foto documentador Biorad.

4.2.4 DIGESTION DE ADN CONTAMINANTE

Para la síntesis del ADNc se requiere de un ARN libre de ADN, debido a que éste puede amplificar e interferir con futuras reacciones. Para su eliminación, se utilizó el protocolo de Deoxyribonuclease I, Amplification Grade de Invitrogen™.

El ARN total fue cuantificado mediante el uso del espectrofotómetro NanoDrop™ 2000. Posteriormente, se realizó una dilución del ARN total a $1\mu\text{g}/10\mu\text{L}$ de cada uno de los estadios embrionarios en tubos Eppendorf de 0.6 mL.

A la dilución se añadieron:

- 1 μL 10X buffer de reacción DNAsa I
- 1 μL DNAsa, 1U/ μL

Posteriormente se incubaron los tubos durante 15 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se inactivó a la enzima adicionando 1 μ L 25 mM EDTA e incubando a 65°C durante 10 minutos.

4.2.5 SÍNTESIS DE LA PRIMERA HEBRA DE ADNc

Para la síntesis de la primera hebra de ADNc se utilizó el protocolo SuperScript™ Reverse transcriptase de Invitrogen™.

En tubos Eppendorf de 0.6 mL se añadieron por reacción:

Oligo(dT)	1 μ L
ARN (100 ng/μL)	2.5 μ L
dNTP mix (10mM)	1 μ L
H₂O libre de ARNasas	7.5 μ L
	Volumen final = 12 μ L

El contenido del tubo se mezcló e incubó a 65°C durante 10 minutos. Al término, se colocó en hielo y añadieron:

First-strand buffer 5X	4 μ L
0.1 M DTT	2 μ L
ARNasa OUT (40 U/μL)	1 μ L

Se mezcló el tubo gentilmente y se incubó a 42°C durante 2 min. Después se adicionó 1 μ L de SuperScript™ II RT, se mezcló gentilmente e incubó a 42°C durante 50 min. Al final, se detuvo la reacción calentando el tubo a 70°C durante 15 min y se procedió a su cuantificación por medio de espectrofotometría utilizando el NanoDrop™ 2000.

4.3 DISEÑO DE CEBADORES PARA LA ENZIMA GALACTINOL SINTASA

Se diseñaron cebadores para su amplificación en qRT-PCR con base en las secuencias obtenidas en el transcriptoma de plátano manzano para el gen galactinol sintasa 1 (*Go/S1*).

Su diseño se realizó utilizando el programa Primer 3 (Rozen y Skaletsky, 2000). Los factores que se tomaron en cuenta fueron: la selección del dominio conservado galactosil transferasa 8, una temperatura de alineamiento de 60°C, el número de nucleótidos por cebador (15-28 nucleótidos) y un porcentaje de guanina, citosina de 50% (Thornton y Basu, 2010). Las secuencias seleccionadas de oligonucleótidos se muestran en el cuadro 4.1.

Cuadro 4.1 Cebadores diseñados para la validación del gen que codifican a la enzima *GoIS1* y *Tub1* en plátano macho cultivar “Curraré Enano”.

Nombre	Gen	Región	Producto (pb)	%GC	Tm (°C)	Secuencia
GoIS 1-F	Galactinol Sintasa 1	228-353	126	60	59.97	5' CGAGATCGAGCCTGTCTACC 3'
GoIS 1-R				55	60	5' GCGTCCAGGTACACCATCTT 3'
Tub 1-F	Tubulina		110	50	60	5' TGTTGCATCCTGGTACTGCT 3'
Tub 1-R				55	60	5' GGCTTTCTTGCACTGGTACAC 3'

4.4 PCR TIEMPO REAL

Para la cuantificación del contenido de transcritos del gen *GoIS1* en cada uno de los estadios embrionarios se utilizó el método de cuantificación relativa $\Delta\Delta Ct$. Las reacciones de amplificación se realizaron en el equipo de PCR tiempo real StepOne (Applied Biosystem™) utilizando Máxima SYBR Green/ROX qPCR Mater Mix 2X (Thermo Scientific™). El volumen total por reacción fue de 10 μ L, los cuales contenían: 100ng/ μ L ADNc, 1X SYBR Green/ROX Master Mix, 0.30 μ M de cada cebador y el volumen final fue ajustado con agua destilada estéril. Las condiciones de corrida de la qRT-PCR fueron; un periodo de corrida a 95°C, 10 min, seguido de 40 ciclos a 95°C, 15 s, 62.5°C, 60 s y 95°C, 15 s para desnaturalización, alineamiento y extensión respectivamente. La especificidad del amplicón fue verificada por una curva de alineación a 60°C y 95°C después de los 40 ciclos. La cuantificación de la expresión relativa del gen *GoIS1* se llevó a cabo utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ donde $-\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ blanco} - Ct \text{ tubulina}) \text{ tiempo } x - (Ct \text{ blanco} - Ct \text{ tubulina}) \text{ tiempo } 0$

(Livak y Schmittgen 2001). Como testigo interno para la normalización se utilizó el gen constitutivo de tubulina y el estadio globular como control. Cada análisis se realizó cuatro veces para cada una de las muestras biológicas.

4.5 RESULTADOS

4.5.1 EXTRACCIÓN DE ARN

Se realizó la extracción de ARN de los cuatro estadios de desarrollo embrionario de plátano macho cv. "Curraré enano" colectados del medio de maduración 1 (MM1) y medio de maduración 2 (MM2). De cada una de las muestras, se determinó su concentración, así como la presencia de contaminantes.

Para determinar la pureza de las muestras se utilizaron las relaciones entre las absorbancias A_{230}/A_{280} y A_{260}/A_{280} . La primera indica la presencia de contaminantes como polisacáridos o fenoles y su rango aceptable debe ser ≥ 2 y la segunda, la presencia de contaminantes proteicos y cuyo rango aceptable está entre 1.8 y 2 para ADN y ARN respectivamente.

Con base en los datos presentados (Cuadro 4.2), se puede concluir que las muestras de ARN extraídas se encuentran en los rangos óptimos para la síntesis de ADNc.

Cuadro 4.2 Concentración y pureza del ARN extraído en cada estadio de maduración.

Estadio	Concentración (ng/ μ L)	A_{260}/A_{280}	A_{230}/A_{280}
Globular (MM1)	1328	2.04	2.08
Tipo pera (MM1)	596	2.03	2.1
CTemp (MM1)	552	2.09	2
CTardío (MM1)	214.13	2	1.35
Globular (MM2)	1568.2	2	2
Tipo pera (MM2)	962.4	2.01	2
CTemp (MM2)	255.4	1.98	1.99
CTardío (MM2)	238.3	1.99	1.61

Para determinar la integridad de las muestras de ARN, se corrió un gel de agarosa al 1% (Figura 4.1). En él, se observó la presencia de las dos bandas mayoritarias de ARNr, sin rastros de ADN genómico y la ausencia de barridos que indicarían la degradación del ARN.

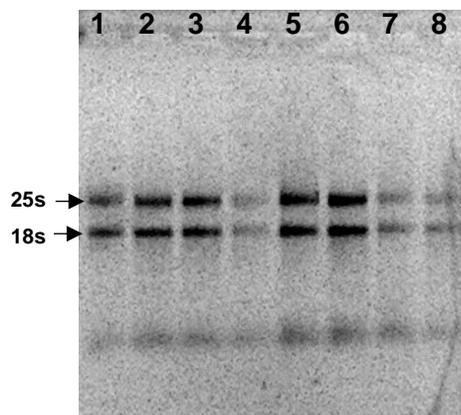


Figura 4.1 ARN en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carriles **1)** Globular (MM1) **2)** Tipo pera (MM1) **3)** Coleoptilar temprano (MM1) **4)** Coleoptilar tardío (MM1) **5)** Globular (MM2) **6)** Tipo pera (MM2) **7)** Coleoptilar temprano (MM2) **8)** Coleoptilar tardío (MM2). **MM1** (MM + 2 gL⁻¹ gelrite), **MM2** (MM + 3 gL⁻¹ gelrite).

A partir del ARN extraído se realizó la síntesis de la primera hebra de ADNc, la cual se utilizó como molde para los posteriores análisis de expresión. En el Cuadro 4.3 se muestran las concentraciones de los ADNc sintetizados.

Cuadro 4.3 Concentración de la primera hebra de ADNc sintetizada.

Estadio	Concentración (ng/μL)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₃₀ /A ₂₈₀
Globular (MM1)	753.10	1.74	1.92
Tipo pera (MM1)	743.70	1.72	1.70
CTemp (MM1)	747.20	1.73	1.67
CTardío (MM1)	734.20	1.70	1.61
Globular (MM2)	746.70	1.70	1.78
Tipo pera (MM2)	748.90	1.73	1.70
CTemp (MM2)	724.20	1.70	1.60

CTardío (MM2)	753.90	1.74	1.73
---------------	--------	------	------

4.5.2 VALIDACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE LA GALACTINOL SINTASA 1 (*GOLS1*) EN EMBRIONES SOMÁTICOS DE PLÁTANO MACHO, MEDIANTE PCR PUNTO FINAL

Para determinar la funcionalidad de los cebadores diseñados de *GoIS1* y *Tub1* se realizó una PCR punto final, utilizando como molde el ADNc de cada uno de los estadios embrionarios de plátano macho, de los embriones desarrollados en ambos tratamientos de maduración MM1 (Figura 4.2) y MM2 (Figura 4.3). El volumen total por reacción fue de 10 μ L, los cuales contenían; 100 ng/ μ L de ADNc, 1X Buffer PCR, 1.5mM MgCl₂, 0.20 mM dNTP's, 0.20 μ M de cada cebador y 1 U TaqPol. El volumen final fue ajustado con agua destilada estéril. Las condiciones de termociclador fueron 5 min a 94°C para desnaturalización inicial, seguido de 30 ciclos de 40, 30 y 60 s a 94, 62.5 y 72 °C para la desnaturalización, alineamiento y extensión, respectivamente y un último periodo de extensión de 10 min.

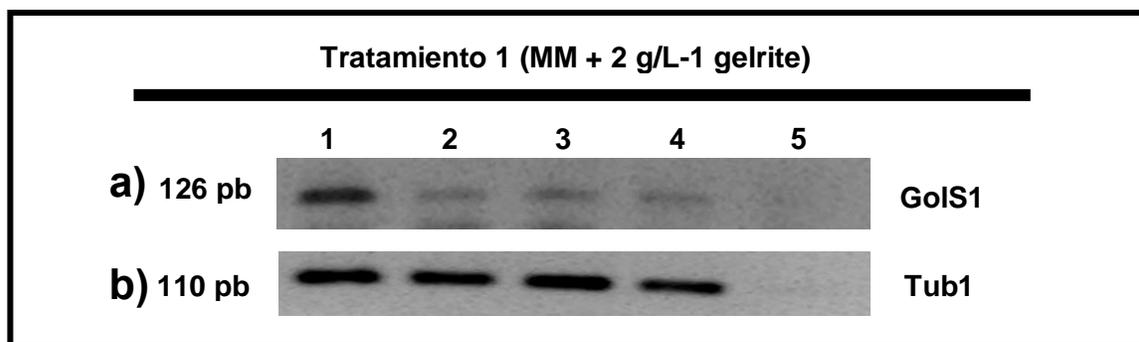


Figura 4.2 Los transcritos de la galactinol sintasa 1 se amplificaron de ADNc de diferentes estadios embrionarios de plátano macho desarrollados en el medio de maduración MM1 (0.2% p/V gelificante). Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, **a)** *GoIS1* (MM1). Carril 1.-Glob 2.-T. Pera 3.-CTemp 4.-CTard 5.-CN (H₂O) **b)** Gen *Tub1* (MM1). Carril 1.-Glob 2.-T.Pera 3.-CTem 4.-CTard 5.- CN (H₂O).

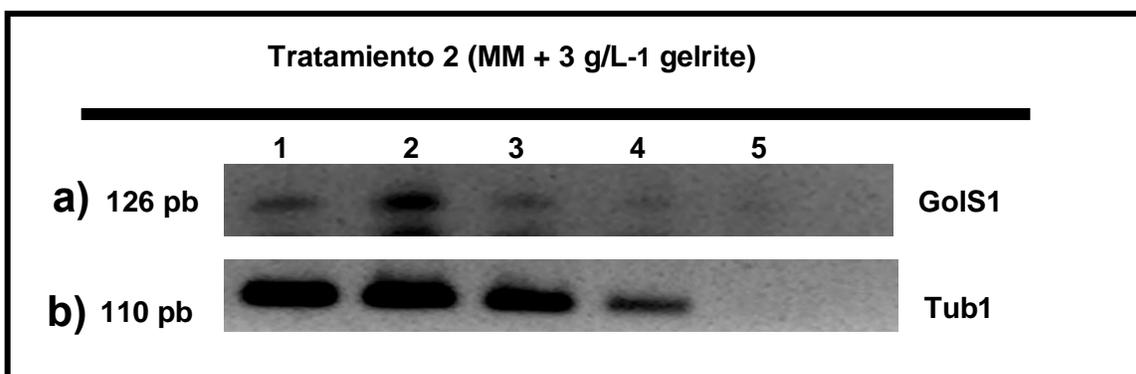


Figura 4.3 Transcritos de la Galactinol sintasa 1 se amplificaron de ADNc de diferentes estadios embrionarios de plátano macho desarrollados en el medio de maduración MM2 (0.3% p/v de gelificante). Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, **a)** *GoIS1* (MM2). Carril 1.-Glob 2.-T.Pera 3.-CTem 4.-CTard 5.-CN (H₂O) **b)** Gen *Tub1* (MM2). Carril 1.-Glob 2.-T.Pera 3.-CTem 4.-CTard 5.-CN (H₂O).

Las figuras 4.2 y 4.3 exhiben las fotografías de los geles donde se presentan las bandas correspondientes al fragmento de tamaño esperado de 126pb del gen *GoIS1* y al de 110pb del gen de tubulina para cada estadio embrionario (Figura 4.2 y 4.3). En el tratamiento MM1 se observa una mayor expresión del gen *GoIS1* en el estadio globular, a diferencia del tratamiento MM2, en el cual la mayor expresión se presenta en el estadio tipo pera, y va disminuyendo en los estadios coleoptilar temprano y coleoptilar tardío.

4.5.3 EXPRESIÓN RELATIVA DEL GEN DE LA GALACTINOL SINTASA 1 (*GoIS1*) DURANTE LA MADURACIÓN DEL EMBRIÓN SOMÁTICO MEDIANTE PCR TIEMPO REAL

Con la PCR punto final, se observó cómo se expresa el gen *GoIS1* en los embriones somáticos desarrollados bajo los dos tratamientos de maduración, sin embargo, dichos resultados no proporcionan un valor cuantitativo, por ello se determinó el nivel de expresión del gen *GoIS1* mediante PCR cuantitativa (qPCR) en cada uno de los estadios embrionarios, utilizando como testigo del proceso, el estadio globular (Figura 4.4).

En el tratamiento MM1, se determinó que el estadio globular utilizado como muestra control tiene el nivel de expresión 1 (Figura 4.4 a) y la expresión de los tres estadios restante disminuyendo respecto de dicho control, esto se relaciona con lo observado en la PCR

punto final (Figura 4.2), donde la banda de mayor intensidad corresponde al estadio globular.

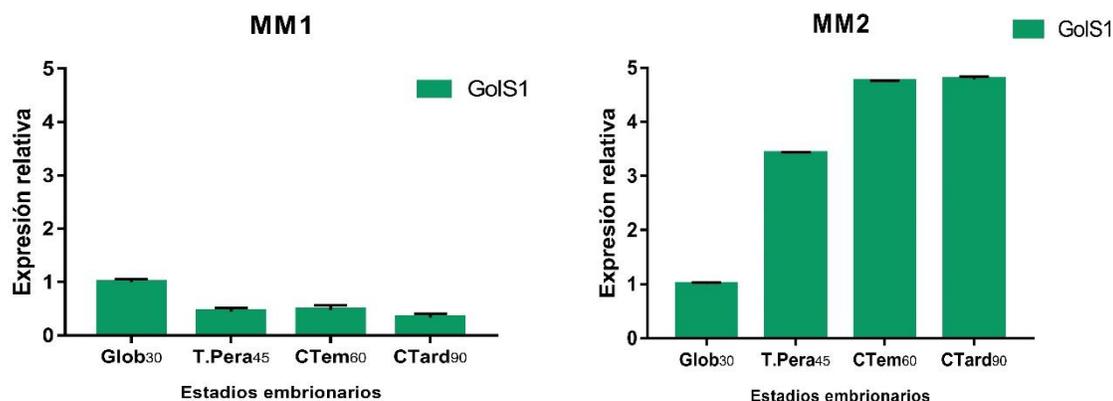


Figura 4.4 Nivel de expresión relativa del gen *GoS1* en los cuatro estadios del embrión somático de plátano macho cv. “Currare enano” **a)** MM1 y **b)** MM2. La expresión fue normalizada utilizando el gen de tubulina como testigo interno y el estadio globular como control. Las barras denotan el valor promedio de incremento en expresión respecto del control (estadio globular) \pm el error estándar (n=3).

En el caso del tratamiento MM2, el aumento en el nivel de expresión de *GoS1* es apreciable a partir del estadio tipo pera siendo 3.0 veces el valor del control (estadio globular), e incrementa 4.5 veces al valor control hacia los estadios coleoptilar temprano y tardío (Figura 4.4 b), respectivamente. Si comparamos estos resultados con los de la PCR punto final, se observó que existe una concordancia con el aumento en la intensidad de banda correspondiente al transcrito de *GoS1* en el estadio tipo pera del MM2 (Figura 4.2 b). El hecho de que en el tiempo real (Figura 4.4 b) se observaron mayores niveles de transcritos en los estadios coleoptilares temprano y tardío respecto del control y el tipo pera, y en el caso del punto final no fue así, ya que la intensidad de las bandas disminuye incluso en el control de tubulina (Figura 4.2 b), sugiere que se pudo haber cometido un error de cargado en el gel.

4.6 DISCUSIÓN

En el presente capítulo se detectó por primera vez la expresión diferencial del gen galactinol sintasa (*GoS1*) durante el desarrollo del embrión somático de plátano macho cv. “Curraré Enano” bajo dos tratamientos, con potenciales hídricos diferentes. El análisis por RT-qPCR

demonstró que en el tratamiento MM1, la expresión del gen *Go/S1* en el estadio globular, el cual fungió como control, fue el más alto, disminuyendo en los estadios tipo pera, coleoptilar temprano y coleoptilar tardío. Estos resultados se relacionan con lo observado en el gel (Figura 4.2), donde la banda con mayor intensidad corresponde al estadio globular. Sin embargo, el perfil de expresión del gen *Go/S1*, no se relaciona con la acumulación de los RFO's, debido a que la rafinosa se observó únicamente en el estadio coleoptilar tardío (Cuadro 3.2).

A diferencia del MM1, en el tratamiento MM2 hubo un incremento (2 veces mayor) en la expresión del gen *Go/S1* en el estadio tipo pera con respecto al estadio globular, pero se observaron los niveles más altos de expresión (4.5 veces mayor) en los estadios coleoptilar temprano y coleoptilar tardío con respecto al control (Figura 4.4). El aumento en la expresión del gen *Go/S1* en los estadios tardíos de maduración se relacionó con la disminución en el contenido de agua en el embrión (Figura 3.1) y el aumento en la concentración de los RFO's, rafinosa y estaquiosa (Cuadro 3.2). Estos resultados concuerdan con lo reportado por (Gojlo et al., 2015 y Taji et al., 2002) donde la mayor expresión del gen *Go/S1* se observó en semillas de *Vicia hirsuta* y *Arabidopsis thaliana* bajo condiciones de desecación.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis nos demuestran la necesidad de identificar al galactinol en cada estadio embrionario, y de esta manera poder determinar la relación entre el nivel de expresión del gen *Go/S1* y la acumulación de los RFO's en los ES de plátano macho. De igual manera es necesaria la identificación del gen que codifica a la enzima rafinosa sintasa (*RafS*), para evaluar su expresión y tener un panorama más claro sobre el papel de los oligosacáridos en el desarrollo y maduración de los ES de plátano macho cv "Curraré enano".

BIBLIOGRAFÍA

- Chomczynski, P. y N. Sacchi (1987). Single step method of RNA isolation by guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162, 156-162.
- Dos Santos, T. B., I. G. Budzinski, C. J. Marur, C. L. Petkowicz, L. F. Pereira y L. G. Vieira (2011). Expression of three galactinol synthase isoforms in *Coffea arabica* L. and accumulation of raffinose and stachyose in response to abiotic stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49 (4), 441-448.
- Droc, G., D. Lariviere, V. Guignon, N. Yahiaoui, D. This, O. Garsmeur, A. Dereeper, C. Hamelin, X. Argout, J. F. Dufayard, J. Lengelle, F. C. Baurens, A. Cenci, B. Pitollat, A. D'Hont, M. Ruiz, M. Rouard, y S. Bocs (2013). The Banana Genome Hub. doi:10.1093/database/bat035.
- Fraga, D., T. Meulia y S. Fenster (2014). Real-time PCR. *Current protocols essential laboratory techniques*, 8 (1), 10-3.
- Gasteiger, E., C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M. R. Wilkins y R. Appel (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. *The Proteomics Protocols Handbook*. (ed): Springer. (pp. 571–607).
- Gojło, E., P. Pospel, L. B. Lahuta, P. Podliński, M. Kucewicz y R. J. Górecki (2015). The acquisition of desiccation tolerance in developing *Vicia hirsuta* seeds coincides with an increase in galactinol synthase expression and soluble α -D-galactosides accumulation. *Journal of plant physiology*, 184, 37-48.
- Grapin, A., J. Schwendiman y C. Teisson (1996). Somatic embryogenesis in Plantain banana. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*, 32, 66-71.
- Higuchi, R., G. Dollinger, P. S. Walsh y R. Griffith (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*, (10), 413-417.

-
- Krasensky, J. y C. Jonak (2012). Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of experimental botany*, 63 (4), 1593-1608.
- Kong, Q., J. Yuan, L. Gao, S. Zhao, W. Jiang, Y. Huang y Z. Bie (2014). Identification of suitable reference genes for gene expression normalization in qRT-PCR analysis in watermelon. *PLoS one*, 9(2), e90612.
- Livak, K. J. y T. D. Schmittgen (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Morel, G., y R. Wetmore (1951). Fern Callus Tissue Culture. *American Journal of Botany*, 38, 141-143.
- Murashige, T. y F. Skoog (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15 (3), 473-497.
- Panikulangara, T. J., G. Eggers-Schumacher, M. Wunderlich, H. Stransky, y F. Schöffl (2004). Galactinol synthase1. A novel heat shock factor target gene responsible for heat-induced synthesis of raffinose family oligosaccharides in Arabidopsis. *Plant physiology*, 136 (2), 3148-3158.
- Peterbauer, T. y A. Richter (2001). Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. *Seed Science Research*, 11 (3), 185-197.
- Rozen, S. y H. Skaletsky (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Bioinformatics Methods and Protocols*. (ed): Springer (pp. 365-386).
- Sengupta, S., S. Mukherjee, S. Parween y A. L. Majumder (2012). Galactinol synthase across evolutionary diverse taxa: Functional preference for higher plants? *FEBS letters*, 586 (10), 1488-1496.

-
- Shivani, Awasthi, P., 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, 1-19.
- Sonnhammer, E., S. Eddy y R. Durbin (1997). Pfam: a comprehensive database of protein domain families based on seed alignments. *Proteins* 28, 405–420.
- Shibley, L. Gregory. (2006). *Real-time PCR*. Taylor and Francis (pp. 1-37).
- Taji, T., C. Ohsumi, S. Iuchi, M. Seki, M. Kasuga, M. Kobayashi y K. Shinozaki (2002). Important roles of drought-and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 29 (4), 417-426.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei y S. Kumar (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2731–2739.
- Thornton, B. y C. Basu (2011). Real-Time PCR (qPCR) Primer Design Using Free Online Software. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 39, 145-15.
- Imai, T., B. E. Ubi, T. Saito y T. Moriguchi (2014). Evaluation of reference genes for accurate normalization of gene expression for real time-quantitative PCR in *Pyrus pyrifolia* using different tissue samples and seasonal conditions. *PLoS One*, 9 (1).

CAPÍTULO V

5.1 CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis, provienen las siguientes conclusiones:

- La pérdida de agua durante el desarrollo y la maduración del embrión somático de *Musa spp*, favorece la acumulación de moléculas de reserva como son la sacarosa y los RFO's.
- Se identificó por primera vez la presencia de rafinosa y estaquiosa en embriones somáticos de plátano macho cv. "Curraré Enano", lo que puede ser un parteaguas para encaminar investigación básica del porque la presencia de estos oligosacáridos y cuál podría ser su posible papel en la maduración del ES.
- Se corroboró la presencia del gen que codifica a la enzima galactinol sintasa (molécula clave para la síntesis de RFO's) y fue posible evaluar su nivel de expresión en los estadios embrionarios de plátano macho.

5.2 PERSPECTIVAS

- Utilizar métodos más sensibles de detección como es la cromatografía de gases, para poder discriminar la presencia de los carbohidratos glucosa y galactinol.
- Evaluar la expresión de los genes que codifican a la enzima rafinosa sintasa y estaquiosa sintasa, para validar el papel de los oligosacáridos en el desarrollo embrionario de *Musa spp*.
- Medir la actividad enzimática de la enzima galactinol sintasa y rafinosa sintasa.

ANEXOS

Anexo 1. Composición de los medios de cultivo utilizados para el establecimiento y desarrollo de los embriones somáticos de plátano macho cv. Currare enano (Chifle).

Componentes	MPF	Inducción de CE (MA)	Proliferación CE (MA1)	Suspensiones celulares (M2)	Maduración (MM)	Germinación
Macroelementos	MS	MS	½ MS	MS	MS	MS
Microelementos	MS	MS	MS	MS	MS	MS
KH₂PO₄ (mM)	1.25				1.25	1.25
Vitaminas	MS	MS	MW	MS	MW	MS
Biotina (µM)		4.1	4.1	4.1		
REGULADORES DE CRECIMIENTO						
2,4-D (µM)		18	4.5	4.5		
NAA (µM)		5.4				
IAA (µM)	1	5.7				
TDZ (µM)	2.5					
SUPLEMENTOS						
Extracto de malta (mg L⁻¹)				100	50	
L-glutamina (µM)				684		
Sacarosa (mM)	87.6	87.6	87.6	131	131	87.6
Gelrite (g L⁻¹)	2	2	2		3	3
pH	5.8	5.7	5.7	5.3	5.8	5.8

CE: Callo embriogénico, **MS:** Murashige y Skoog (1962); **MW:** Morel y Wetmore (1951)

Anexo 2. Curvas estándar para *myo*-inositol (A), galactinol (B), fructosa (C), glucosa (D), rafinosa (E), estaquiosa (F), galactosa (G) y sacarosa (H). Condiciones de corrida (fase móvil agua grado HPLC, flujo de 0.5 mL/min, temperatura de 75°C y presión 30 bar)

