

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

Estudio proteómico de cultivos *in vitro* de

Persea americana

Tesis que presenta

Mónica García Flores

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

Febrero de 2023

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 Mónica García Flores titulado Estudio proteómico de cultivos *in vitro* de *Persea americana* fue realizado en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, en los laboratorios No. 22 y 24 del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección de los Dres. Víctor Manuel Loyola Vargas y Víctor Manuel Aguilar Hernández dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente



Dra. Cecilia Hernández Zepeda

Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, febrero de 2023

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 en 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: MONICA GARCIA

Mónica García Flores

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de **Bioquímica y Biología Molecular de Plantas** del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado “Generación de estrategias científico-tecnológicas con un enfoque multidisciplinario e interinstitucional para afrontar la amenaza que representan los complejos ambrosiales en los sectores agrícola y forestal de México”, No. 292399, financiado por el CONACyT (FORDECYT), bajo la dirección de los **Dres. Víctor Manuel Loyola Vargas y Víctor M. Aguilar Hernández**.

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento a las instituciones que hicieron posible la realización de este trabajo. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante la maestría (número 525353). Gracias al financiamiento del proyecto 292399 FORDECyT por el apoyo brindado. Al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) donde se realizó el presente trabajo.

Quiero agradecer a mis directores de tesis, el Dr. Víctor M. Loyola Vargas, por aceptarme en su grupo de trabajo, por la orientación, enseñanzas y aprendizaje durante mi estancia, gracias por impulsarnos a crecer como profesionistas. Agradezco la co-Dirección del Dr. Víctor M. Aguilar Hernández por permitirme trabajar en su laboratorio y el aprendizaje adquirido, por su asesoría y orientación en resolver todas las dudas durante el proceso.

Mi más sincero agradecimiento a mis sinodales, la Dra. Clelia De la Peña y la Dra. Sara Luz Nahuat Dzib por orientarme en cada tutorial y por las observaciones que ayudaron a enfocar el trabajo en los puntos importantes. Al Dr. Felipe Vázquez por la orientación y observaciones realizadas en la revisión del trabajo. A todos, gracias por sus comentarios y correcciones para mejora del manuscrito.

Agradezco especialmente a la Dra. Rosa Ma. Galaz Avalos, por su apoyo y guía durante mi estancia en el laboratorio, gracias por compartir sus conocimientos y por el aprendizaje invaluable. Mi agradecimiento especial también para la maestra Ligia G. Brito Arguez, por el gran apoyo y enseñanzas durante la realización de los experimentos de proteómica y su ayuda durante las largas jornadas de trabajo.

Gracias a la maestra Ana Odett Quintana, por orientarme y enseñarme durante el trabajo de laboratorio y por ayudarme siempre a resolver las dudas, a la Dra. Angela F. Kú y a la maestra Zurizadai Monroy por su apoyo en la parte de histología. Gracias a la maestra Verónica Borbolla por el material otorgado y por la orientación en el trabajo, a la maestra Evelyn Carrillo por su apoyo en el laboratorio y su ayuda en el manejo del equipo. Agradezco al Dr. Castellanos por su apoyo y ayuda en el procesamiento de datos, a mis compañeros de los laboratorios 22 y 24, por el apoyo, las charlas, consejos y el aprendizaje.

Y finalmente pero no menos importante a mi familia y amigos por su apoyo para lograr esta meta.

DEDICATORIAS

A mi familia y amigos que estuvieron presentes durante el desarrollo del trabajo.

.

ÍNDICE

ÍNDICE	I
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE CUADROS	XIII
ABREVIACIONES.....	XV
RESUMEN	XIX
ABSTRACT	XXI
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I.....	3
ANTECEDENTES.....	3
1. EL AGUACATE (<i>PERSEA AMERICANA</i> MILL)	3
1.2. TAXONOMÍA Y VARIEDADES	3
1.3. BOTÁNICA DEL AGUACATE- CARACTERÍSTICAS GENERALES	4
1.3.1 FLORACIÓN.....	4
1.3.2 VARIEDADES DE FLORACIÓN TIPO A	6
1.3.3 VARIEDADES DE FLORACIÓN TIPO B	6
1.3.4 SEMILLA Y FRUTO	6
1.4. IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LA PRODUCCIÓN DE AGUACATE	7
1.5. PRINCIPALES PLAGAS Y ENFERMEDADES QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN DEL AGUACATE....	8

1.6. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA	8
1.6.1. FASES DE LA INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	10
1.6.2. CULTIVOS EMBRIOGÉNICOS Y NO EMBRIOGÉNICOS	10
1.6.3. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA INDIRECTA	12
1.7 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN AGUACATE	13
1.7.1. PROBLEMÁTICA DEL DESARROLLO DE CULTIVOS EMBRIOGÉNICOS DE AGUACATE.....	14
1.8. LA PROTEÓMICA COMO HERRAMIENTA DE ESTUDIO EN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	16
1.8.1. ANÁLISIS PROTEÓMICOS EN EL CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE AGUACATE.....	17
1.9 REGULADORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL EN EL CULTIVO <i>IN VITRO</i>	21
1.9.1 AUXINAS, BIOSÍNTESIS Y TRANSPORTE	22
1.9.2. ANÁLOGOS DE AUXINAS	24
1.10. CITOCININAS.....	26
1.10.1. BIOSÍNTESIS DE LAS CITOCININAS.....	27
1.11. JUSTIFICACIÓN.....	29
1.12. OBJETIVOS.....	29
1.12.1 OBJETIVO GENERAL	29
1.12.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
1.13. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	30
CAPÍTULO II.....	32
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
2.1. MATERIAL BIOLÓGICO	32

2.2. INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS DIRECTA.....	32
2.3. INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS INDIRECTA.....	32
2.3.1. PRUEBA DE INÓCULO.....	33
2.3.2. CARACTERIZACIÓN DE CULTIVO DE CALLOS.....	33
2.3.3. DETERMINACIÓN DE LOS PESOS FRESCO Y SECO DE LOS CALLOS.....	33
2.3.4. PARÁMETROS DE CRECIMIENTO.....	33
2.4 ANÁLISIS PROTEÓMICO.....	35
2.4.1 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO TCA/ACETONA.....	36
2.4.2 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DEL FENOL.....	37
2.4.3. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA.....	37
2.4.4. SEPARACIÓN EN GEL DE DOBLE DIMENSIÓN 2-DE.....	38
2.4.5. ISOELECTROENFOQUE.....	38
2.4.6. EQUILIBRIO.....	38
2.4.7. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE).....	39
2.4.8. TINCIÓN CON AZUL DE COOMASSIE.....	39
2.5. ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS REVELADAS.....	39
CAPÍTULO III.....	41
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DEL CULTIVO DE TEJIDOS DE AGUACATE.....	41
3.1. INDUCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS DIRECTA.....	41
3.2. ANÁLISIS HISTOLÓGICO.....	44
3.3. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA INDIRECTA.....	45

3.3.1. CARACTERIZACIÓN: PRUEBA DEL INÓCULO	46
3.3.2. PESO FRESCO	46
3.3.3. PESO SECO	47
3.4. CARACTERIZACIÓN DE CRECIMIENTO DE CALLO DE AGUACATE.....	48
3.4.1. DETERMINACIÓN DEL PESO FRESCO.....	48
3.4.2 DETERMINACIÓN DEL PESO SECO.....	52
CAPÍTULO IV	57
4. ANÁLISIS PROTEÓMICO	57
4.1 ESTABLECIMIENTO Y ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONDICIONES PARA LA EXTRACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS Y SU SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA.....	57
4.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA	59
4.3. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE PROTEÍNAS PRESENTES EN CALLO DE <i>P. AMERICANA</i> EN MEDIO DE PROLIFERACIÓN	61
4.4 PROTEÍNAS DIFERENCIALES EN LOS DIFERENTES DÍAS DE CULTIVO DE CALLO DE AGUACATE.	64
4. 5. DISCUSIÓN.....	74
4.5.1 PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA	74
4.5.2. ESTUDIO PROTEÓMICO	76
CAPÍTULO V	79
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	79
5.1 CONCLUSIONES	79
5.2 PERSPECTIVAS	80
BIBLIOGRAFÍA	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Morfología del árbol de aguacate en floración. La altura promedio del árbol de aguacate en las plantaciones comerciales es de 5 m. B) Hoja lustrosas agudas o acuminadas, C) flor en fase femenina, D) flor en fase masculina, E) formación de baya de aguacate. <https://disfrutarconelhuertoyeljardin.blogspot.com/2014/05/un-aguacate-en-el-jardin-cuidados-y-poda.html>, <https://www.portalfruticola.com/noticias/2016/12/13/floracion-hermafrodita-del-palto-hoy-hembra-manana-macho/> 5

Figura 1.2. Partes del fruto de aguacate ‘Hass’. Tomado de González et al., (2020). En el aguacate el pericarpio está formado de tres capas: exocarpo (cáscara), mesocarpo (pulpa) y endocarpo junto a la cubierta seminal. El endocarpo se compone de pocas capas de parénquima de células aplanadas tangencialmente que a menudo se adhieren a la testa (Barrientos et al., 1996). 7

Figura 1.3. Representación visual de la embriogénesis vegetal. Vías de generación de embriones somáticos, forma directa e indirecta mediante la formación previa de callo. (a) En dicotiledóneas presenta los estadios globulares, corazón, torpedo y cotiledonar y (b) en monocotiledóneas se pasa del estadio globular a la forma escutelar y después a la coleoptilar (Juárez-Escobar et al., 2021). 9

Figure 1.4. Embriogénesis somática. La ES puede ser inducida a partir de una amplia variedad de tejidos de la planta. Hay dos vías conocidas que producen embriones somáticos. El explante produce callo embriogénico, y los embriones somáticos emergen de la masa embriogénica. En el segundo caso, los embriones somáticos surgen directamente del explante, sin la formación de la masa embriogénica. CE callo embriogénico; CNE callo no embriogénico; ESG, embrión somático globular; ESC embrión somático cotiledonar, E, ECG embrión cigótico globular; ECC embrión cigótico cotiledonar; EI, explante indiferenciado; ED, explante diferenciado. Redibujado de Aguilar-Hernández y Loyola-Vargas (2018). 11

Figura 1.5. Curva de crecimiento típica de suspensiones celulares. Gráfico que muestra la relación del número de células en las diferentes fases (de retraso, exponencial, lineal, de desaceleración y estacionaria) con el tiempo de incubación, en un cultivo. Figura redibujada de Galaz-Ávalos et al. (2012). 13

Figure 1.6. Inducción, multiplicación, mantenimiento y regeneración de embriones somáticos

de aguacate 'Reed'. (a) Frutos de aguacate inmaduros de 5 a 10 mm de tamaño; (b) y (c) embriones de aguacate inmaduros extraídos del saco embrionario; (d) embrión somático primario; (e) embrión somático secundario; (f) embriones somáticos en proliferación MMSE; (g) embriones somáticos blanco-opacos en medio de desarrollo de embriones; (h) germinación de embriones; (i) brote unipolar; (j) brote bipolar; (k) plántula completa en medio con carbón activado; (l) planta aclimatada (O'Brien et al., 2018). 14

Figura 1.7. Vías de síntesis del AIA. (A) Se identifican las cuatro vías dependientes de triptófano: en azul se presenta la vía de IAM (3-indolacetamida), en la cual participan las hidrolasas AMI1 que convierten el IAM a AIA (ácido indolacético); en anaranjado se presenta la vía IAOx (3-indolacetaldoxima), participan las citocromo monooxigenasas (CYP79B2 y 3) para convertir el triptofano en IAOx, sugiriendo que las nitrilasas (NITs) convierten al indol-3-acetonitrilo (IAN) en AIA; en rojo la vía del IPA (ácido 3-indol pirúvico), en la cual la triptofano aminotransferasa y las enzimas relacionadas 1 y 2 (TAA1 y TAR1 y 2) convierten el triptofano en IPA (ácido indol pirúvico), el cual a su vez es convertido en AIA por la YUCCA (YUC); en morado la vía TAM (triptamina), donde la triptófano descarboxilasa (TDCs) convierten el triptófano en TAM, el cual es convertido a indol-3-acetaldehído (IAAId) mediante la acción de YUCCA 4 (YUC4) para generar IAA. B) Vía de degradación y conjugación del AIA. Obtención de AIA libre mediante síntesis y degradación (principalmente por oxidación); la conjugación reversible permite disponer de AIA libre; funcionando como un reservorio de AIA. Los conjugados pueden ser reversibles o irreversibles y afectar la unión a receptores por competencia y/o por la vía de transducción de señales. Redibujado de Garay-Arroyo et al., (2014). 23

Figura 1.8. Auxinas naturales y algunos de sus análogos. (A) El ácido indol-3-acético (AIA), el ácido 4-cloroindol-3-acético (4- AIA-Cl) y el ácido fenilacético (APA) son auxinas activas naturales. (B) El ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), el ácido 1 naftalenoacético (ANA), el ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico (dicamba) y el ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (picloram) son análogos de auxinas. Modificado de Korasick et al., (2013). 25

Figura 1.9. Estructuras químicas de las citocininas. a) Una estructura de adenina y el sistema de numeración para la nomenclatura de las CK. b) CK isoprenoides representativas y CK aromáticas. Se dan nombres comunes con abreviaturas de uso común entre paréntesis. Cadena lateral isoprenoide dentro de óvalo azul y cadena aromática dentro del óvalo rosa. c) Estructura de conjugados de CK. La molécula conjugada con la CK está dentro del óvalo gris.

Imagen redibujada de Marqu ez-Lop ez et al., (2019)..... 28

Figura 1.10. Esquema de estrategia experimental de trabajo. Inducción de la embriogénesis somática mediante las vías directa e indirecta a partir de explante de hoja y tallo de plántulas in vitro y embriones cigóticos de aguacate respectivamente. 31

Figura 2.1. Diagrama de proceso en análisis proteómico. Muestra de forma general los pasos que se llevan a cabo en el proceso del análisis proteómico desde la extracción a partir del tejido hasta el análisis bioinformático..... 36

Figura 3.1. Desarrollo de embriones y brotes a partir de tallo cultivados en medio de Yasuda con ácido ascórbico. Primer experimento, A y B sección de tallo con crecimiento de estructuras embrionarias en diferentes estadios de desarrollo. Segundo ensayo, C sección de tallo oxidada con formación de brotes y embriones globulares. D, parte basal de hoja con formación de callo en la nervadura. Tercer ensayo, E explantes de tallo con formación de brotes, F formación de callo en explante de hoja, G formación de PEMs y/o callo en sección de tallo. 42

Figura 3.2. Formación de callo en diferentes medios de cultivo. Explantes de tallo y hoja provenientes de medio de inducción en medio de Yasuda liquido con BA. A y B, formación de callo friable en secciones de tallo sembrados en medio MS adicionado con picloram. C, callo formado en sección de hoja en medio semisólido B5mP. D, sección de tallo oxidado con formación de callo y brotes en medio B5mP..... 43

Figura 3.3. Cortes longitudinales de secciones de tallo. A y B formación de embriones somáticos en forma de corazón en la zona subepidérmica del explante, C formación de callo en zona adyacente a la ES. D y F, formación de masas proembriogénicas, E brote emergiendo de la superficie superior del tallo. Cortes de 25  m, objetivo 4x, tinción con azul de toluidina. Abreviaturas ESC embrión somático cotiledonar, CLL callo, PEM masa proembriogenica, BR brote. 45

Figura 3.4. Prueba de inóculo de crecimiento en peso fresco de callo de aguacate. Determinación del peso fresco en inóculos de 0.5 y 1 g evaluados cada 7 d durante 42 días de cultivo. Los datos corresponden al promedio de tres repeticiones   SE. 47

Figura 3.5. Prueba de inóculo de crecimiento en peso seco de callo de aguacate. Determinación del peso seco en inóculos de 0.5 y 1 g de peso fresco y posteriormente

liofilizados; muestreo realizado cada 7 d durante 42 días de cultivo. Los datos correspondientes al promedio de tres repeticiones \pm SE. 48

Figura 3.6. Tendencia de crecimiento de callo de aguacate análisis de peso fresco de datos totales. A) Crecimiento de los callos de aguacate en los días de muestreo correspondientes a 4, 18, 24, 28 y 40 días. B) Gráfica de tendencia del crecimiento de callo de las diferentes muestras, las líneas de colores corresponden al número de muestra tomada (de 3-5 muestras) cada 2 días (puntos verde, rojo y azul) durante 42 días de cultivo, línea negra indica el promedio de las muestras analizadas..... 50

Figura 3.7. Curva de crecimiento en peso fresco del callo de aguacate. Promedio del crecimiento, muestreo del peso fresco realizado cada 2 días durante un periodo de 42 d. Las flechas azules señalan los puntos de crecimiento diferenciales que se refiere a las diferentes etapas de la curva de crecimiento. Los puntos señalados corresponden a los días 16, 22, 28 y 40, estos puntos fueron tomados posteriormente para el análisis proteómico. Datos corresponden al promedio de tres repeticiones \pm SE. 51

Figura 3.8. Tendencia de crecimiento en peso seco del callo de aguacate. Las líneas de colores corresponden al número de muestra tomada cada dos días (puntos verde, rojo y azul) durante 42 días de cultivo, la línea negra indica el promedio de las muestras analizadas. 52

Figura 3.9. Curva de crecimiento midiendo el peso seco de los callos de aguacate. Promedio del crecimiento, muestreo del peso seco realizado cada dos días durante un periodo de 42 d. Las flechas amarillas señalan los puntos de crecimiento diferenciales que se refiere a las diferentes etapas de la curva de crecimiento. Los puntos señalados corresponden a los días 16, 22, 28 y 40, estos puntos fueron tomados posteriormente para el análisis proteómico. Los datos corresponden al promedio de tres repeticiones \pm SE. 53

Figura 4.1. Separación electroforética de extractos de proteína de cultivos *in vitro* de aguacate, obtenidos por el método de TCA/acetona y fenol. A y B extracción mediante la técnica TCA/acetona a partir de 200 mg de PF (peso fresco) de callo en muestras aleatorias, colocando 10, 15 y 20 μ L, C extracción TCA/acetona a partir de 1 g de PF de material liofilizado, 25 μ g de proteína en gel, D muestra de día 32 utilizando material liofilizado a partir de 4 g de PF (180 mg de PS) colocando 25 y 50 μ g en cada carril, E método de extracción fenólica 4 g de PF muestra liofilizada día 24 , 40 μ g de proteína en gel y F extracción fenólica de muestra liofilizada de 4 g

PF días 20 y 36 de muestreo colocando 25 y 20 μg de proteína respectivamente en 10 μL de muestra. 58

Figura 4.2. A, Comparación del perfil de proteínas con diferente método de extracción. Carril 1, método del fenol extracción de 4 g de PF día 40; carril 2, método del fenol mitad de muestra de tejido (2 g) día 28; carril 3, método de TCA/acetona con 2 g de tejido de tejido día 28. B Gel de segunda dimensión método de extracción con fenol día 40..... 59

Figura 4.3. Cuantificación de proteína en las diferentes fases de crecimiento de callo de aguacate en medio de proliferación. Se muestrearon los días 16, 21, 28 y 40 del ciclo de cultivo para la determinación de la cantidad de proteína. Las barras indican el promedio de proteína extraída en $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ de dos replicas en los días 16 y 40 y de tres en os en los días 21 y 28 \pm SE..... 60

Figura 4.4. Geles de una dimensión de proteínas presentes en callo de *P. americana*. Extracciones de 16, 21, 28 y 40 días de crecimiento en el medio de proliferación. La electroforesis en gel SDS-PAGE para la proteína de la segunda extracción se realizó cargando 50 μg de proteína de cada muestra por carril. B para la proteína de la cuarta extracción, se colocaron 30 μg de proteína..... 61

Figura 4.5. Comparación de los patrones electroforéticos en geles de poliacrilamida en doble dimensión. Tercer experimento. A) Se corrieron las proteínas del tercer experimento. Las muestras se obtuvieron de diferentes fases de crecimiento de callo de aguacate en medio de proliferación a los 16, 21, 28 y 40 días de cultivo. Los geles fueron preparados con 2 mg de proteína y teñidos con azul de Coomassie. 62

Figura 4.6. Comparación de los patrones electroforéticos en geles de poliacrilamida en segunda dimensión. Cuarto experimento. B) Se corrieron las proteínas del cuarto experimento. Las muestras se obtuvieron de diferentes fases de crecimiento de callo de aguacate en medio de proliferación a los 16, 21, 28 y 40 días de cultivo. Los geles fueron preparados con 2 mg de proteína y teñidos con azul de Coomassie. 63

Figura 4.7. Análisis comparativo de las proteínas diferenciales en los días 16 y 21 de los cultivos de callo de *Persea americana*. Los recuadros verdes señalan las proteínas diferenciales derivadas de ANOVA, en azul se muestra el número de la proteína. Los puntos encerrados en rojo son las proteínas analizadas 66

Figura 4.8. Análisis comparativo de las proteínas diferenciales en los días 28 y 40 de cultivo de callo de <i>Persea americana</i> . Los recuadros verdes señalan las proteínas diferenciales derivadas de ANOVA, en azul se muestra el número de la proteína. Los puntos encerrados en rojo son las proteínas analizadas.....	67
Figura 4.9. Gráficas de volumen de los puntos 5, 9 25 y 39, durante los días 16, 21, 28 y 40 del ciclo de cultivo de callo de aguacate en medio MSP de mantenimiento y proliferación. Probabilidad de ANOVA < 0,05 y un fold change ≥ 1	69
Figura 4.10. Análisis en 3D del volumen de las proteínas 5,9, 25 y 39 presentes en callo de <i>Persea americana</i> durante los días 16, 21, 28 y 40 de cultivo en medio MSP.....	70
Figura 4.11. Gráficas de volumen de los puntos 40, 48, 49 y 67, durante los días 16, 21, 28 y 40 del ciclo de cultivo de callo de aguacate en medio MSP de mantenimiento y proliferación. Probabilidad de ANOVA < 0,05 y un fold change ≥ 1.....	71
Figura 4.12. Análisis en 3D del volumen de las proteínas 5, 9, 25 y 39 presentes en callo de <i>Persea</i> durante los días 16, 21, 28 y 40 de cultivo en medio MSP.....	72
Figura S1. Geles de electroforesis de doble dimensión mostrando la selección de proteínas para análisis de los dos experimentos. En rojo se muestra las proteínas que se seleccionaron para el análisis y en morado las proteínas excluidas.	105
Figura S2. Geles de electroforesis de doble dimensión mostrando las proteínas seleccionadas para su identificación, en rojo se muestran el total de proteínas seleccionadas para análisis y en verde las que se filtraron por ANOVA	106

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.1. Porcentaje de parentesco dentro y entre razas de aguacate. Valores basados en análisis mediante RAPD (Bufler y Fiedler, 1996).....	4
Cuadro 1.2. Comportamiento floral del aguacate.	6
Cuadro 1.3 Abundancia de proteínas identificadas de cultivos tipo SE y tipo PEM (Guzmán-García et al., 2013).	18
Cuadro 1.4. Probables proteínas diferenciales encontradas en callo embriogénico y no embriogénico de aguacate Hass y Criollo. Sobreacumulación, acumulación y baja abundancia (Olivares-García et al., 2020).	20
Cuadro 3.1 Parámetros de crecimiento en peso fresco de cultivos de callo de aguacate	46
Cuadro 3.2 Parámetros de crecimiento en peso seco de cultivos de callo de aguacate...	48
Cuadro 3.3. Valores de parámetros de crecimiento de callo de aguacate en peso fresco y peso seco.....	51
Cuadro 4.1. Número de marcadores seleccionados de cada punto para la normalización	64
Cuadro 4.2. Lista de proteínas diferencialmente detectadas durante el crecimiento de callo de aguacate. Proteínas con volumen diferencial de acuerdo con ANOVA ≤ 0.05 y veces de cambio ≥ 1 en los diferentes puntos de muestreo con el punto isoelectrico (pI) y masa molecular (MM) correspondiente. Los valores para cada punto representan el volumen de las proteínas analizadas, las sombreadas con gris ligero son las de menor volumen y las sombreadas en gris oscuro son las que tenían mayor volumen. El ID corresponde al número de identificación asignado por el programa para cada uno de los puntos.	65
Cuadro 4.3. Lista de probables <i>proteínas candidatas</i> , identificadas diferencialmente en etapas de crecimiento de callo de <i>Persea americana</i> . Identificación de puntos por valores de pI punto isoelectrico y MM masa molecular en base de datos SWISS 2DE-PAGE. Fecha de integración en SWISS-2DPAGE. Fecha de liberación uno de diciembre de 2000 (release 13)	74
Cuadro S1. Composición de los medios de cultivo.....	93

Cuadro S2. Resumen de trabajos realizados en embriogénesis somática de aguacate y los diferentes tratamientos utilizados.95

Cuadro S3. Análisis de las proteínas diferenciales en cultivos de callo de *Persea*, en los distintos días de cultivo, en medio de proliferación, indicando la masa molecular (MM), el punto isoeléctrico (pI) y el volumen de dicha proteína para cada punto, las proteínas diferenciales en su volumen se encuentran sombreadas en azul.103

ABREVIACIONES

2,4-D	2,4- ácido diclorofenoxiacético
ABA	Ácido abscísico
AIA	Ácido indol acético
AIP	Ácido indol pirúvico
B5	Sales de medio Gamborg
BA	6- Benciladenina
CE	Callos embriogénicos
CKs	citocininas
CNE	Callos no embriogénicos
CQ	Centro quiescente
CSDPE	Células somáticas determinadas pre-embriogénicamente
CSNE	Células somáticas no embriogénicas
cZ	<i>Cis</i> zeatina
Dicamba	3,6-dicloro-2-metoxibenzoico
DIGE	Diferential in gel electrophoresis
DOC	Deoxicolato de sodio
DTT	Ditiotreitol
Dz	Dihidrozeatina
ECC	Embrión cigótico cotiledonar
ED	Explante diferenciado
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EI	Explante indiferenciado

ES	Embriogénesis somática
ESC	Embrión somático cotiledonar
ESD	Embriogénesis somática directa
ESG	Embrión somático globular
ESI	Embriogénesis somática indirecta
FAA	Formaldehido
FRK	Fructocinasa
GA	Ácido giberélico
GST	Glutation S-transferasa
IAM	Iodoacetamida
IAM	3-indolacetamida
IAOx	3- indo acetaldoxima
IBA	Ácido indol-3 butírico
iP	Isopenteniladenina ribótidos
IPT	Isopenteniltransferasa
MM	Masa molecular
MMSE	Medio de mango para embriogénesis somática
MS	Medio Murashige y Skoog
MSP	Medio MS con picloram
PEM	Masa proembriogénica
pl	Punto isoeléctrico
Picloram	Ácido tricloropicolínico
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
RAPD	Random Amplifid Polymorphic DNA
RC	Reguladores del crecimiento

ROS	Especies reactivas de oxígeno
TAA	Triptófano aminotransferasa de <i>Arabidopsis</i>
TAM	Triptamina
Trp	Triptófano
tZ	<i>Trans</i> zeatina
WOSEs	White Opac Somatic Embryons
YUCCA	Flavin monoxigenasas
Z	Zeatina

RESUMEN

Entre los factores que afectan la producción de aguacate (*Persea americana* Mill.), se encuentra los daños ocasionados por plagas y enfermedades, causando riesgos fitosanitarios importantes. Dado el largo tiempo que requiere su mejoramiento genético, al igual que otras especies perennes, las herramientas biotecnológicas son una alternativa para llevar a cabo dicho mejoramiento. Entre estas herramientas la embriogénesis somática (ES) permite la propagación de plantas elite, al mismo tiempo que se puede usar para el mejoramiento genético de la especie. Con la finalidad de contribuir a elucidar el proceso de ES en aguacate, en el presente trabajo se probó un protocolo de embriogénesis somática directa (ESD), utilizando explantes de hoja y tallo de plantulas *in vitro*, sembrados en medio MS con benciladenina 5 μM y ácido ascórbico (AA; 100 y 200 mg L^{-1}) como antioxidante. La respuesta embriogénica en los explantes de tallo en presencia de 100 mg L^{-1} de AA fue del 81.81% y se determinó la presencia de embriones globulares. En presencia de 200 mg L^{-1} de AA se obtuvieron embriones somáticos globulares en el 55.55% de los explantes y la vida de los cultivos se extendió por dos semanas. Para la ES indirecta, se sembraron embriones cigóticos maduros en medio MS con picloram 0.41 μM ; este tratamiento produjo la formación de callo. Para la caracterización del cultivo se utilizó un gramo de callo como inóculo. Dado el buen crecimiento del callo, hasta 15 g de peso fresco al final de un ciclo de 40 días, se decidió caracterizar cuatro puntos del ciclo de cultivo desde el punto de vista proteómico. Las muestras de callo se tomaron a los 16, 21, 28 y 40 días de crecimiento. Para la extracción de la proteína se utilizó el método del fenol/acetato de amonio, el cual rindió una muestra de proteína de buena calidad para la electroforesis. Utilizando el software Melanie se identificaron 97 proteínas con buena resolución en los cuatro días de muestreo, de ellas se seleccionaron 69 proteínas para el análisis. Se determinó que existe poca variabilidad entre las dos réplicas analizadas para cada uno de los cuatro días. La normalización de la intensidad de las proteínas seleccionadas permitió determinar que ocho proteínas se encuentran abundantemente diferenciadas entre los cuatro días de muestreo. Los rangos de pH isoeléctrico estuvieron comprendidos entre 4.03 a 6.9 y una masa molecular de 35 a 53 kDa. Este conocimiento es un buen punto de partida para ahora identificar a las proteínas y determinar en qué ruta metabólica están involucradas.

ABSTRACT

Among different factors that affect the production of avocado (*Persea americana* Mill.), the damage caused by pests and diseases is the most important. Because of the long time that requires the genetic improvement of this species, as any other perennial species; biotechnological tools are required to do so. Among these biotechnological tools, somatic embryogenesis (SE) is the one that allows the propagation of elite plants, as well as genetic improvement of the species. In order to contribute elucidating the process of SE in avocado, a protocol of direct somatic embryogenesis (DSE) using explants of leaves and stems of seedlings *in vitro* was developed. The explants were placed in MS medium with benzyladenine 5 μM and ascorbic acid (AA; 100 and 200 mg L^{-1}) as an antioxidant. The embryogenic response in the explants (stems) with 100 mg L^{-1} of AA was 81.81%, and the formation of globular embryos was observed. On the other hand, globular somatic embryos were obtained in 55.55% of the explants cultured with 200 mg L^{-1} of AA, and the survival of the culture was extended by two weeks. For the induction of the indirect SE, mature zygotic embryos were planted in MS medium with 0.41 μM picloram; this treatment produced callus. For the characterization of the culture, one gram of callus was used as inoculum. The growth of the callus was abundant, up to 15 g of fresh weight at the end of a 40-day cycle. For this reason, it was decided to characterize four points of the culture cycle by using proteomics. Callus samples were taken at 16, 21, 28, and 40 days of growth. The phenol/ammonium acetate method was used for protein extraction, which yielded a good quality of protein sample for electrophoresis. Using the Melanie software, 97 proteins, with a good resolution, were identified in the four days of sampling, from which 69 proteins were selected for analysis. It was determined that there is no significant variability between the two replicates analyzed for each of the four days. The intensity normalization of the selected proteins allowed determining that eight proteins were differentially accumulated among the four days of sampling. The isoelectric pH was between 4.03 to 6.9, and the molecular mass between 35 to 53 kDa. The knowledge described in this work is a good starting point to identify the proteins during the SE of avocado and it can help to determine which metabolic pathway are involved in such process.

INTRODUCCIÓN

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es un árbol perennifolio subtropical de la familia Lauracea. Económicamente es de los frutos más importantes a nivel mundial y México encabeza la lista como principal país productor (Araújo et al., 2018). La principal variedad que se cultiva es la Hass y su demanda ha aumentado en los últimos años por su elevado valor nutricional y funcional (López Encina et al., 2014).

Existen diferentes factores que afectan el cultivo de aguacate, como las plagas, amenazando potencialmente su producción. Los complejos de escarabajos ambrosiales, conocidos como escarabajo ambrosial del laurel rojo *Xyleborus glabratus* vector del hongo *Raffaelea lauricola* y el escarabajo barrenador polífago *Euwallacea* sp - *Fusarium euwallacea*, representan un importante riesgo fitosanitario y pérdidas significativas en la producción (Carrillo et al., 2012). La investigación en la resistencia a éstas y otras enfermedades en las especies es muy difícil debido a que los métodos convencionales de cultivo muestran inconvenientes cuando son aplicados a ciertas especies de árboles recalcitrantes, lo que limita significativamente la transferencia y expresión de genes de interés. Por lo que se ha sugerido la aplicación del cultivo *in vitro*, específicamente mediante la embriogénesis somática (ES), el cual es un método de reproducción asexual de plantas en el que se desarrollan los embriones a partir de células somáticas. Este método tiene la ventaja de ser un sistema eficiente para el estudio molecular, fisiológico y de eventos relacionados con el desarrollo vegetal, ya que además permite obtener altos volúmenes de producción de plantas clonadas en corto tiempo y con menores costos.

En *P. americana* se han obtenido cultivos embriogénicos derivados de embriones cigóticos inmaduros y de tejido nucellar (Witjaksono et al., 1999; Mooney y Staden, 1987); sin embargo, lograr la maduración de los embriones somáticos ha sido un obstáculo para la conversión final en plantas limitando la explotación de la técnica. La mayoría de los estudios realizados en la ES de aguacate han estado dirigidos al mejoramiento de los protocolos de obtención y germinación de embriones mediante modificaciones en la composición de los medios de cultivo, pero hay una limitada información sobre los procesos moleculares y bioquímicos que controlan la inducción y desarrollo de embriones somáticos en el aguacate.

Entre las principales limitaciones que presenta el proceso de ES en aguacate se encuentran: la baja respuesta del explante durante las etapas de inducción del callo embriogénico, el establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas, la maduración de embriones somáticos y su conversión posterior a planta, por lo que no puede considerarse un protocolo exitoso.

Abordando la problemática de la ES en aguacate desde otro enfoque, se considera que la capacidad de regeneración de los cultivos puede estar vinculada a un patrón proteómico diferencial durante el desarrollo de los embriones (Olivares-García et al., 2020). Por lo que es necesaria la realización de estudios proteómicos en cultivos *in vitro* de aguacate, que nos ayude a determinar los factores moleculares clave en la inducción y progresión del proceso embriogénico. El objetivo del presente trabajo es contribuir a elucidar el proceso de ES en el aguacate mediante la evaluación del ciclo de crecimiento de cultivos de *P. americana* var. Hass, durante la etapa de proliferación de callo, mediante la vía indirecta, identificando las proteínas diferencialmente expresadas en el proceso de crecimiento, además, sugerimos un sistema de inducción de ES vía directa, a partir de explantes de tallo y hoja en un medio con citocininas (CKs).

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1. EL AGUACATE (*Persea americana* Mill)

1.1. Origen del aguacate

El aguacate es nativo de Mesoamérica, sus orígenes se remontan a las regiones de Chiapas-Guatemala y Honduras. De acuerdo con los registros arqueológicos, el material más antiguo registrado de aguacate son semillas encontradas en cuevas de Coxcatlán, región de Tehuacán, Puebla, México, que se remontan a 7000 años aC aproximadamente (Storey et al., 1986; Smith, 1966).

1.2. Taxonomía y variedades

El aguacate está clasificado como una angiosperma, perteneciente a la familia Lauraceae, la cual agrupa aproximadamente 50 géneros y comprende alrededor de 2500 especies entre las que se encuentran el laurel (*Laurus nobilis* L.) y la canela (*Cinnamomum verum* J. Presl) (Rohwer, 1993; Cronquist, 1981). El género *Persea* se compone de 150 especies de árboles, clasificados en dos subgéneros *Persea* y *Eriodaphne*, (Chanderbali et al., 2013; Sánchez-Romero et al., 2006; Williams, 1977) los cuales son vegetativamente compatibles entre especies del mismo subgénero pero incompatibles entre especies de subgéneros diferentes. El subgénero *Eriodaphne* se ha encontrado resistente a la enfermedad de pudrición de la raíz ocasionada por *Phytophthora*, característica que no presenta *Persea*.

La especie *Persea americana* consta de tres variedades o razas botánicas y subespecies; que son *P. americana* var. *Drymifolia*, *P. americana* var. *Guatemalensis* y *P. americana* var. *Americana* (Chanderbali et al., 2013), comúnmente conocidas como raza mexicana, guatemalteca y antillana, respectivamente (Furnier et al., 1990; Storey et al., 1986). La raza mexicana está adaptada a lugares elevados en los trópicos (1400-2500 m), la guatemalteca a elevaciones medias (1000-2000 m) y la Antillana a tierras bajas (Chanderbali et al., 2013). Bergh (1992) indicó que las tres razas son genéticamente equidistantes, afirmación que fue corroborada con análisis de marcadores genéticos de ADN mediante RAPD (Amplificación al Azar de ADN Genómico) por Bufler y Fieder (1996) (Cuadro 1.1).

Cuadro 1.1. Porcentaje de parentesco dentro y entre razas de aguacate. Valores basados en análisis mediante RAPD (Bufler y Fiedler, 1996).

	raza Mexicana	raza Antillana	raza Guatemalteca	¿raza Costaricensis?
raza Mexicana	75.4±5.6	52.7±4.1	57.5±4.6	58.6±2.3
raza Antillana		71.1±5.2	58.1±5.4	58.4±3.2
raza Guatemalteca			73.2±6.0	59.2±4.7
¿raza Costaricensis?				
<i>Persea schiedeana</i>				

Se estima que se han obtenido alrededor de 400 variedades de aguacate, divididas dentro de las razas antes mencionadas, entre las que destacan “Hass” que proviene de un injerto mezcla de las razas mexicana y guatemalteca, “Fuerte” caracterizada por su cascara gruesa, Criollo que presenta una cascara delgada, “Bacon” de fruto ovalado, “Duke” de raza Mexicana, “Pinkerton” forma de pera y “Gwen” de forma redonda, entre otras (Bergh y Lahav, 1996).

1.3. Botánica del aguacate- características generales

El árbol de aguacate en promedio alcanza una altura de 20 m, sin embargo, en plantaciones comerciales solo se deja crecer hasta 5 m para facilitar las prácticas de control fitosanitario, cosecha, poda y fertilización foliar. El árbol presenta un tronco grueso y hojas perennifolias alargadas con varias ramificaciones que forman una copa densa con una amplitud media de la copa de 7-14 m (Pérez Álvarez et al., 2015), las ramas jóvenes son glabras (que no presentan tricomas o estructuras en la superficie externa), frecuentemente glaucas (coloración verde-azulado), las hojas tienen pecíolos delgados de 10 a 30 cm de largo, son agudas o acuminadas (terminación en punta), verde oscuras en el haz, frecuentemente lustrosas.

1.3.1 Floración

Las inflorescencias, panículas (racimo ramificado de flores) son de color grisáceo-puberulentas o séricas, cerca de las terminaciones de las ramas de 6 a 20 cm de largo, pedunculadas; los pedicelos son delgados, de 3 a 6 mm de largo, con un perianto pálido (Figura 1.1) (Rivera Páez et al., 2016). La especie presenta un tipo de reproducción conocido como dicogamia y protoginia, es decir, existe una separación temporal en la maduración de los sexos dentro de la misma flor o de la misma planta, las flores maduran primero su órgano femenino y después el

órgano masculino. Las flores son hermafroditas, pero presentan problemas en su polinización porque no coincide el tiempo de receptividad de los pistilos, con la caída del polen (Zapata Guzmán et al., 2018).



Figura 1.1. Morfología del árbol de aguacate en floración. La altura promedio del árbol de aguacate en las plantaciones comerciales es de 5 m. B) Hoja lustrosas agudas o acuminadas, C) flor en fase femenina, D) flor en fase masculina, E) formación de baya de aguacate. <https://disfrutarconelhuertoyeljardin.blogspot.com/2014/05/un-aguacate-en-el-jardin-cuidados-y-poda.html>, <https://www.portalfruticola.com/noticias/2016/12/13/floracion-hermafrodita-del-palto-hoy-hembra-manana-macho/>

Las flores se abren en dos periodos diferentes siendo funcionales de forma alterna sus órganos femeninos y masculinos, según el periodo, la floración se hace funcional con la apertura del órgano femenino. Hay entonces una clasificación de los árboles de aguacate de acuerdo con

comportamiento de sus flores, que son las variedades de floración tipo A y las de tipo B (Cuadro 1.2).

Cuadro 1.2. Comportamiento floral del aguacate.

<i>Tipo floral</i>	<i>Día 1</i>		<i>Día 2</i>	
	Mañana	Tarde	Mañana	Tarde
A	Femenino	Cerrada	Cerrada	Masculino
B	Cerrada	Femenino	Masculino	Cerrada

1.3.2 Variedades de floración tipo A

Las flores tipo A abren en estado femenino por la mañana del primer día y se cierran al mediodía, no vuelven a abrirse hasta la tarde del segundo día, que lo realizan en estado masculino

1.3.3 Variedades de floración tipo B

Las flores de las variedades de floración tipo B se abren por primera vez en estado femenino por la tarde del primer día y en su estado masculino durante la mañana del segundo día. Para aumentar la frecuencia de fecundación se debe producir la polinización cruzada. Por lo cual se plantan de manera conjunta variedades con una floración complementaria y que permita la presencia en el mismo momento de flores de ambos sexos, flores de variación tipo A y flores de tipo B (Garner y Lovatt, 2016; Chanderbali et al., 2008; Schroeder, 1952).

1.3.4 Semilla y fruto

La semilla de aguacate no soporta la deshidratación por lo que es recalcitrante. Presenta un solo embrión y contiene dos cotiledones unidos formando una masa globular. El fruto del aguacate es una baya que deriva de un gineceo unicarpelar, el pericarpio consta de tres capas: el exocarpo que comprende la cáscara, el mesocarpo pulposo, que es la porción comestible de la fruta, y una capa interna delgada junto a la cubierta de la semilla que corresponde al endocarpo (Figura 1.2) (Barrientos et al., 1996).

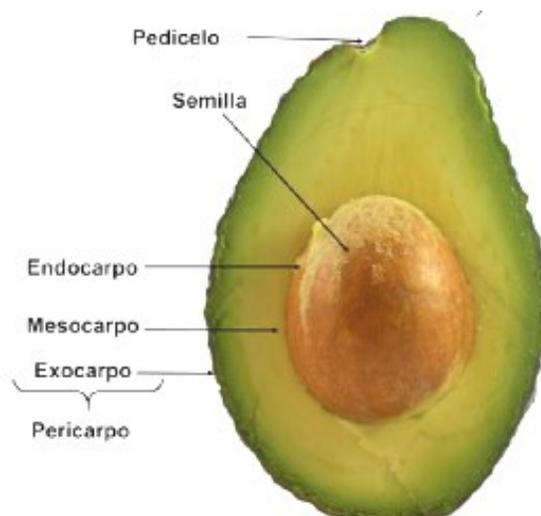


Figura 1.2. Partes del fruto de aguacate 'Hass'. Tomado de González et al., (2020). En el aguacate el pericarpio está formado de tres capas: exocarpo (cáscara), mesocarpo (pulpa) y endocarpo junto a la cubierta seminal. El endocarpio se compone de pocas capas de parénquima de células aplanadas tangencialmente que a menudo se adhieren a la testa (Barrientos et al., 1996).

1.4. Importancia económica de la producción de aguacate

La importancia económica a nivel mundial del aguacate, se debe a su contenido nutricional de macroelementos esenciales, como vitaminas, minerales (Dreher y Davenport, 2013) y ácidos grasos insaturados, haciéndolo un alimento muy popular (Pierce, 1959). De acuerdo con la FAO, México es el mayor productor de aguacate con un 25% de la producción mundial (FAOSTAT, 2022).

Debido al aumento en la demanda en el mercado de este fruto, la producción mundial ha ido creciendo de forma significativa, alcanzando una cifra estimada de 6.3 millones de toneladas en 2018. El 80.57% de la producción se concentra en cinco países, de acuerdo con el siguiente orden: México, principal productor; seguido de República Dominicana; Perú, con un 10.16% de la producción, Indonesia y finalmente Colombia, quien produjo en 2016 el 7.29% del aguacate mundial. Respecto a las importaciones, Estados Unidos y los mercados europeos son los mayores importadores del mundo, mientras que hay un comportamiento creciente para los mercados en la región asiática, particularmente en los mercados japonés y chino.

1.5. Principales plagas y enfermedades que afectan la producción del aguacate

Las plagas y enfermedades en las huertas de aguacate producen pérdidas significativas en la producción, representando una amenaza potencial a futuro (Olivares-García et al., 2020). Entre las principales afectaciones están la pudrición de la raíz ocasionada por el oomiceto *Phytophthora*, la infección por *Colletotrichum* spp. y *Lasiodiplodia theobromae* causantes de las enfermedades antracnosis y pudrición peduncular, respectivamente (Smith et al., 2019), así como el daño ocasionado por los complejos de escarabajos ambrosiales (*Xyleborus glabratus* - *Raffaelea lauricola*) y el escarabajo barrenador (*Euwallacea* sp.- *Fusarium euwallaceae*) (Carrillo et al., 2012). *Xyleborus glabratus* (Eichhoff), un escarabajo barrenador vector del hongo *Raffaelea lauricola*, es responsable de la marchitez del laurel rojo, enfermedad mortal de especies de la familia Lauraceae, el cual fue detectado en el año 2002 en los Estados Unidos, causando pérdidas considerables en huertos comerciales de aguacate. Por su parte el escarabajo barrenador polífago *Euwallacea* sp., fue detectado en el año 2003 en los Estados Unidos y en el 2012 se reportó la marchitez regresiva causada por su hongo simbionte *Fusarium euwallaceae*, registrado afectaciones del 100% en plantaciones de aguacate, así como daños en especies silvestres en Estados Unidos y en Israel.

En México, se detectó por primera vez la presencia del escarabajo barrenador polífago (*Euwallacea* sp.) en febrero del año 2015. Con el objeto de contener y evitar la diseminación de la plaga en diciembre del mismo año se implementó el plan de acción para la vigilancia y aplicación de medidas de control contra complejos ambrosiales reglamentados para México. Entre las diferentes estrategias para afrontar los riesgos potenciales que presentan estas plagas, se han realizado trabajos para producir variedades de aguacates resistentes como una alternativa eficiente para combatir enfermedades (Lavi et al., 1991). Sin embargo, el trabajo se ha obstaculizado por los largos ciclos de reproducción y la dificultad para controlar la polinización bajo dicogamia (polinización abierta) (Pliego-Alfaro et al., 1999), optando por la reproducción *in vitro* como una alternativa prometedora mediante la ES del aguacate, en donde cada paso en el proceso es caracterizado por distintos eventos bioquímicos y moleculares.

1.6. Embriogénesis somática

La ES es el proceso por el cual una sola célula somática o un grupo de células cambian su programa genético, y dan origen a un embrión, el cual es transformado por etapas consecutivas

de desarrollo en una planta adulta (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2016). Dependiendo de la naturaleza del explante, el protocolo de ES puede seguir una de dos rutas de desarrollo: directa o indirecta. En la ES directa (ESD) los embriones se desarrollan directamente a partir de un explante que tiene capacidad embriogénica intrínseca. La ES indirecta (ESI) implica la inducción y proliferación de callos embriogénicos (CE), seguido del desarrollo y maduración de embriones y finalmente la conversión a plántulas (Figura 1.3). La inducción de callos se logra con frecuencia en medio de cultivo suplementado con análogos de auxinas, mientras que la ausencia de las auxinas generalmente promueve el desarrollo del embrión somático.

En las plantas eudicotiledóneas, se identifican cuatro estadios de desarrollo, globular, corazón, torpedo y cotiledonar (George et al., 2008) mientras que en monocotiledóneas es globular, escutelar y coleoptilar, (Figura 1.3a y 1.3b). Los explantes más utilizados para la inducción de la ES son el polen, los meristemos apicales, raíz, hojas, pétalos, tallo y embriones inmaduros (Figura 1.4.) (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2016).

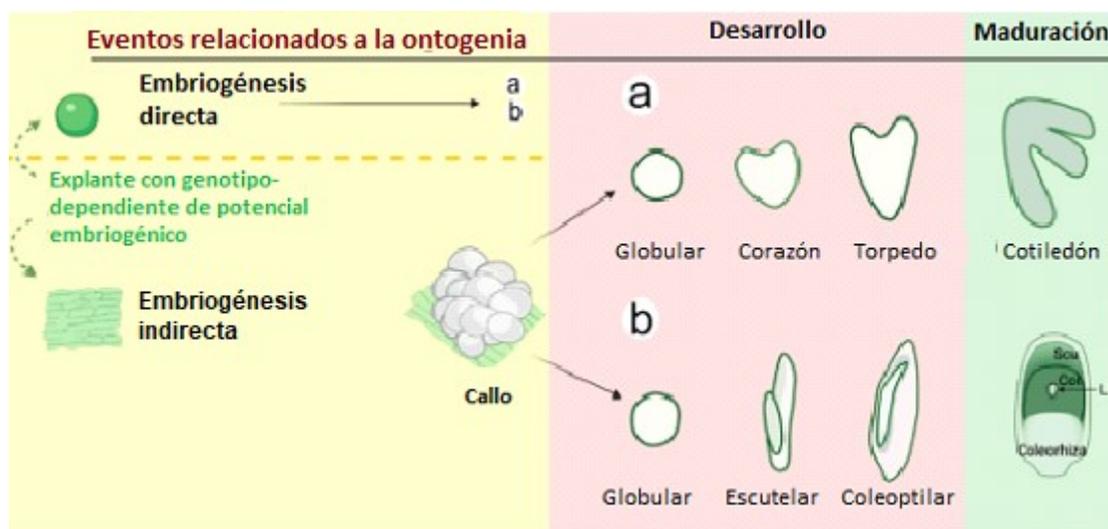


Figura 1.3. Representación visual de la embriogénesis vegetal. Vías de generación de embriones somáticos, forma directa e indirecta mediante la formación previa de callo. (a) En dicotiledóneas presenta los estadios globulares, corazón, torpedo y cotiledonar y (b) en monocotiledóneas se pasa del estadio globular a la forma escutelar y después a la coleoptilar (Juárez-Escobar et al., 2021).

1.6.1. Fases de la inducción de la embriogénesis somática

Las fases para la inducción de la ES, identificadas en plantas eudicotiledóneas son las siguientes:

- Fase 0. Fase de continuas divisiones celulares, se forman agregados celulares embriogénicos en presencia de una auxina.
- Fase 1. Se elimina la auxina, hay una proliferación lenta de agregados sin diferenciación, en los tres primeros días.
- Fase 2. Ocurre entre el tercer y cuarto día sin auxina presente en el medio, se caracteriza por una rápida división celular en ciertas partes del agregado, debido a la polarización de la síntesis del ADN, dando lugar al embrión globular y su suspensor (si es que se forma) en la zona donde no ocurrió división.
- Fase 3. Ocurre el desarrollo del embrión en los estadios de corazón y torpedo (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2016).

1.6.2. Cultivos embriogénicos y no embriogénicos

A diferencia del callo no embriogénico (CNE) y del explante diferenciado (ED), que no producen embriones somáticos, el callo embriogénico (CE) y el tejido del explante indiferenciado (EI) contienen células embriogénicas generadas a partir de las células somáticas, que pasan a través de una vía del embrión somático globular (ESG) a un embrión somático cotiledonar (ESC) y finalmente en un embrión maduro que, después del proceso de germinación, puede generar una plántula (Figura 1.4). Se cree que un gametofito femenino fecundado sigue un camino morfológico comparable a la ES, desde un embrión cigótico globular (ECG) hasta un embrión cigótico cotiledonar (ECC) (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2016).

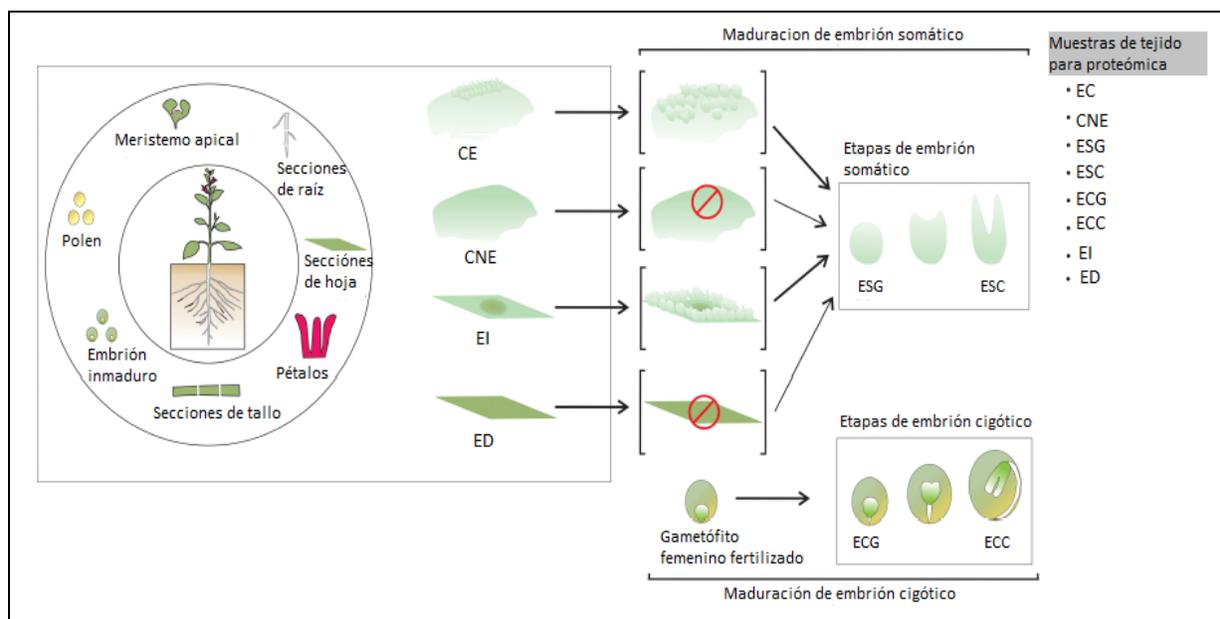


Figure 1.4. Embriogénesis somática. La ES puede ser inducida a partir de una amplia variedad de tejidos de la planta. Hay dos vías conocidas que producen embriones somáticos. El explante produce callo embriogénico, y los embriones somáticos emergen de la masa embriogénica. En el segundo caso, los embriones somáticos surgen directamente del explante, sin la formación de la masa embriogénica. CE callo embriogénico; CNE callo no embriogénico; ESG, embrión somático globular; ESC embrión somático cotiledonar, E, ECG embrión cigótico globular; ECC embrión cigótico cotiledonar; EI, explante indiferenciado; ED, explante diferenciado. Redibujado de Aguilar-Hernández y Loyola-Vargas (2018).

Los tratamientos para la obtención de embriones somáticos dependen de si el tejido del explante está formado por células somáticas determinadas pro-embriogénicamente (CSDPE) o células somáticas no embriogénicas (CSNE). Las CSPE o embriogénesis somática directa, se da cuando un estímulo de la división celular es suficiente para la formación de un embrión somático a partir del explante o desde segmentos de embriones cigóticos o completos. En la CSNE o embriogénesis indirecta, las células del tejido deben pasar por varias divisiones mitóticas en presencia de una auxina, dando lugar a un callo o a suspensiones celulares (Fujimura y Komamine, 1980).

Diferentes factores pueden afectar la inducción de la ES, las condiciones del medio de cultivo, concentraciones elevadas de reguladores del crecimiento (RC) y la herida del explante son tipos de estrés que pueden hacer que las células vegetales cambien sus programas celulares y moleculares. En el caso de suspensiones celulares el tipo de explante, la edad y el genotipo de la planta madre, las condiciones fisiológicas de incubación y la densidad celular, así como la

generación de agregados celulares homogéneos, son factores a considerar en la adquisición de potencial embriogénico (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2016). Muchas especies pueden producir embriones somáticos a partir de suspensiones celulares, pero requieren la adición de auxinas al medio de cultivo, donde tienen un papel fundamental en la inducción de la ES y las etapas iniciales de desarrollo de los embriones somáticos (Nic-Can y Loyola-Vargas, 2016). Histológicamente se sabe que determinadas características morfológicas distinguen a las células embriogénicas, las cuales se caracterizan por ser pequeñas, isodiamétricas, con un gran núcleo y un citoplasma denso (Nomura y Komamine, 1985), mientras que las células no embriogénicas se diferencian por presentar una forma más elongada y un gran número de vacuolas (Pasternak et al., 2002).

1.6.3. Embriogénesis somática indirecta

La vía de ESI involucra la formación de callos, los cuales son masas amorfas que surgen de la proliferación de células del parénquima y que pueden formarse a partir de diferentes explantes. Los callos no tienen patrones de organización, sino que están presentes en centros localizados de actividad meristemática y por lo general aparecen en regiones cambiales rudimentarias con zonas de diferenciación vascular, dando un crecimiento irregular y con potencial para desarrollar raíces normales, brotes y embriones que formaran plántulas.

El crecimiento del callo y sus características depende de diferentes factores, como son el explante usado para iniciar los callos, la composición del medio y las condiciones experimentales durante el período de incubación (Hernández Amasifuen y Díaz Pillasca, 2019). Los callos pueden desarrollarse con textura dura y lignificados limitando la separación en fragmentos pequeños; o bien pueden ser frágiles y fáciles de separar a este tipo de callo se le denomina cultivos friables y pueden ser utilizados para el establecimiento de suspensiones celulares. De forma similar a lo que ocurre en el crecimiento de suspensiones celulares, el crecimiento de callo comprende las siguientes fases de crecimiento (Figura 1.5), fase lag o de latencia, se observa cuando en un medio fresco, los cultivos crecen lentamente durante los primeros días. En la fase exponencial o fase logarítmica, la tasa de crecimiento específica (μ) es el aumento de la biomasa por unidad de concentración de la misma, la cual es constante y medible. Cuando la tasa de crecimiento es igual a 1, el Td (tiempo de duplicación) es igual al promedio del tiempo del ciclo celular. La fase exponencial se puede prolongar usando bajas densidades celulares en la iniciación del cultivo, o el empleo de elevadas concentraciones de

nutrimentos en el medio (Galaz-Ávalos et al., 2012) Al final de la fase lineal, la tasa específica de crecimiento declina uniformemente con el tiempo; Esta declinación aumenta en la fase de desaceleración progresiva, para alcanzar finalmente la fase estacionaria; donde no hay aumento neto en la síntesis de biomasa o en el número de células.

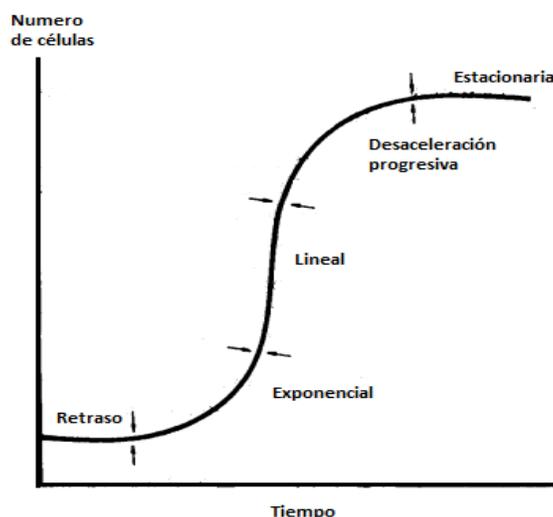


Figura 1.5. Curva de crecimiento típica de suspensiones celulares. Gráfico que muestra la relación del número de células en las diferentes fases (de retraso, exponencial, lineal, de desaceleración y estacionaria) con el tiempo de incubación, en un cultivo. Figura redibujada de Galaz-Ávalos et al. (2012).

1.7 Embriogénesis somática en aguacate

La inducción de la ES en el aguacate se ha llevado a cabo principalmente a partir de embriones cigóticos de frutos inmaduros en un proceso marcado por las siguientes etapas: (1) desinfección superficial de los explantes e inducción del cultivo embriogénico, (2) mantenimiento y proliferación de los cultivos embriogénicos, (3) maduración y germinación de los embriones somáticos, (4) cultivo *in vitro* de plantas regeneradas y (5) aclimatación y transferencia a campo (Figura 1.6).

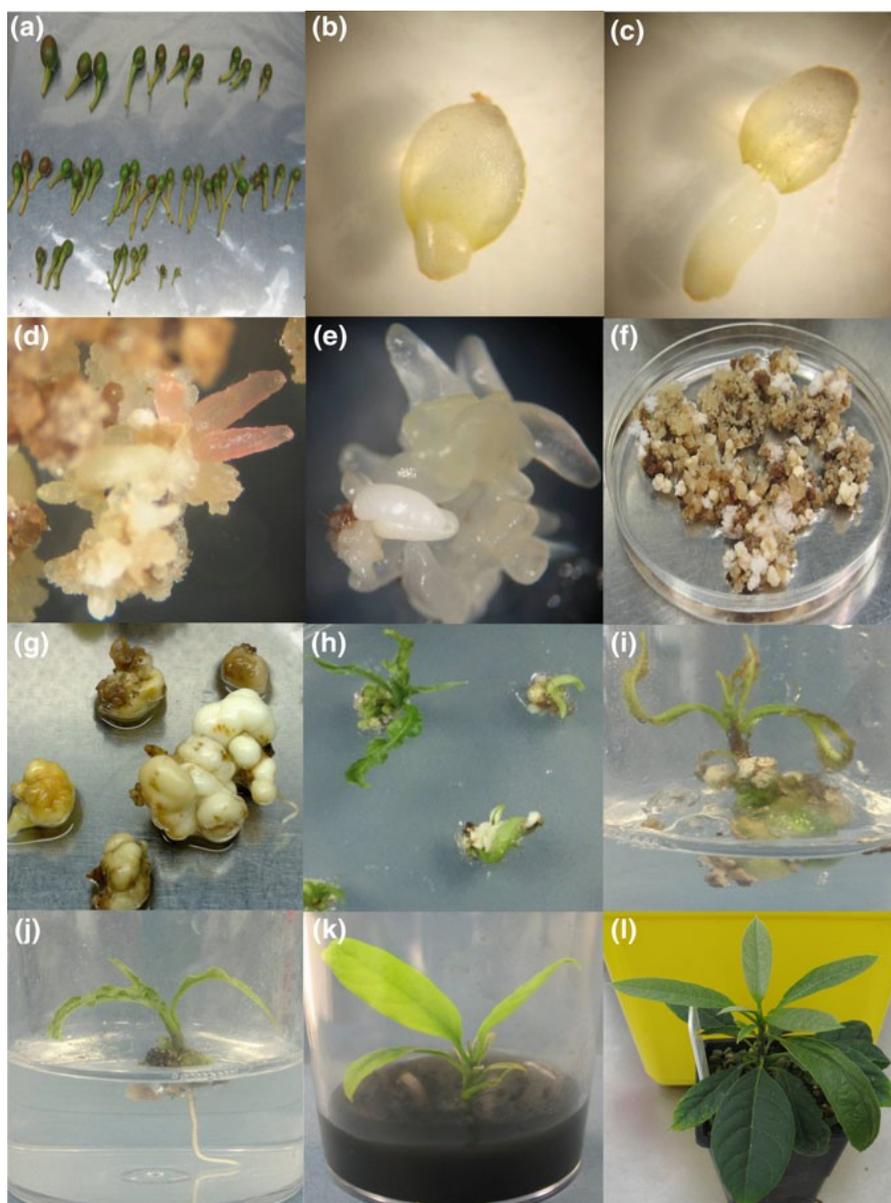


Figure 1.6. Inducción, multiplicación, mantenimiento y regeneración de embriones somáticos de aguacate 'Reed'. (a) Frutos de aguacate inmaduros de 5 a 10 mm de tamaño; (b) y (c) embriones de aguacate inmaduros extraídos del saco embrionario; (d) embrión somático primario; (e) embrión somático secundario; (f) embriones somáticos en proliferación MMSE; (g) embriones somáticos blanco-opacos en medio de desarrollo de embriones; (h) germinación de embriones; (i) brote unipolar; (j) brote bipolar; (k) plántula completa en medio con carbón activado; (l) planta aclimatada (O'Brien et al., 2018).

1.7.1. Problemática del desarrollo de cultivos embriogénicos de aguacate

Los trabajos que se han realizado sobre la ES del aguacate se basan en las etapas antes mencionadas durante el proceso de desarrollo del embrión, cuya finalidad es la maduración del mayor número de embriones blancos opacos y su conversión a plántulas. Durante los últimos treinta años, se ha realizado un número importante de investigaciones enfocadas en la optimización de un protocolo para la ES del aguacate (Cuadro S1). Para estos trabajos se ha utilizado diferentes variedades de aguacate, partiendo en su mayoría de embriones cigóticos inmaduros de diferente longitud, y unos pocos mencionan la utilización de tejido nuclear. En cuanto al medio de cultivo para la inducción de la ES principalmente son las sales del medio MS y las sales del medio de Gamborg B₅ (Cuadros S1 y S2). Entre los RC empleados en esta etapa se encuentran los análogos de auxinas 2,4-D y picloram. Para la etapa posterior de mantenimiento, se puede emplear el mismo medio de inducción y/o proliferación MSP (sales Murashige y Skoog con picloram) ya sea sólido o líquido o B₅mP (sales mayores de medio de Gamborg B₅ y sales menores del medio MS más picloram), en esta etapa se puede variar la concentración de la fuente de nitrógeno (Cuadros S1 y S2).

El principal cambio en la formulación del medio se centra en la etapa de maduración en la cual se han utilizado diferentes sistemas para lograr la maduración de los embriones. Es en esta fase, en la que se han probado diferentes concentraciones de sacarosa, así como de RC que incluyen ABA (ácido abscísico), BA (benciladenina) y GA₃ (ácido giberélico). Entre los agentes osmóticos analizados están el polietilenglicol y el sorbitol. También se ha reportado la adición de diferentes aminoácidos como glutamina, prolina, hidrolizado de caseína, así como agua de coco y carbón activado. Incluso durante esta etapa se han utilizado rayos gamma para producir mutantes.

En años recientes Witjaksono reportó el empleo del medio MMSE para inducir la ES del mango (Pateña et al., 2002), en la etapa de maduración, obteniendo resultados favorables. Las características distintivas del medio son una mayor concentración de sacarosa, la adición de agua de coco y el empleo de 2,4-D como RC. Mientras que para la etapa de germinación se emplea generalmente BA y GA₃, también se ha indicado el uso de carbón activado en esta etapa. Este medio ha sido empleado en nuestro laboratorio con éxito para la producción de suspensiones celulares.

En aguacate la vía de regeneración embriogénica ha sido estudiada en detalle, diversos reportes indican que la ES del aguacate pueden perder su competencia embriogénica en 3-4

meses después de la inducción dependiendo del genotipo (Mooney y Staden, 1987) aunado a la pérdida de viabilidad con el tiempo, el principal factor que limita la conversión de ES a plantas es la maduración incompleta (Ammirato, 1987). Después de la maduración se observan dos tipos de regeneración: unipolar (ápice de brote o raíz) y bipolar (se presentan ambos ápices de brote y raíz). En la primera (unipolar) los embriones pueden ser enraizados o rescatados mediante microinjerto *in vitro*. El porcentaje de embriones bipolares de alta calidad es muy bajo, alrededor del 2-3% o menos dependiendo del genotipo, este bajo valor de conversión de ES es el principal factor limitante en la regeneración vía ES.

Los estudios sobre la ES del aguacate se han visto limitados debido a la falta de información bioquímica y molecular disponible, sobre los procesos que gobiernan la inducción y el desarrollo de la ES, tanto en la etapa de maduración, como en cada estadio previo de desarrollo de la ES. Si bien la ES permite obtener elevados volúmenes de producción de plantas clonadas en corto tiempo y con menores costos, aún existen limitaciones en el sistema durante las etapas de inducción del callo embriogénico, establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas, maduración de los embriones somáticos y su conversión posterior a planta.

1.8. La proteómica como herramienta de estudio en la embriogénesis somática

El análisis proteómico es una herramienta poderosa para examinar la condición fisiológica de los tejidos y órganos de las plantas, bajo procesos de desarrollo específicos que puede ayudar a definir los cambios que se llevan a cabo en los embriones somáticos a través de las etapas de su desarrollo, así como durante su maduración y germinación. En la célula, el proteoma varía según el estado en el que se encuentre la célula permitiendo identificar, categorizar y clasificar las proteínas con respecto a su función y a las interacciones que establecen entre ellas. De tal forma que se pueden caracterizar las redes funcionales que establecen las proteínas y su dinámica durante procesos fisiológicos y patológicos (Jorrín-Novo, 2020; 2021). En este sentido la proteómica está ayudando a descifrar las señales y cambios en el programa genético que lleva a las células somáticas a convertirse en células embriogénicas y su posterior conversión a embriones maduros. La identificación de proteínas relacionadas con el desarrollo del embrión puede revelar la base molecular de la ES (Pan et al., 2009). Las clases de proteínas más frecuentemente identificadas en proteomas de embriones somáticos pertenecen a proteínas relacionadas con la glucólisis, a la biosíntesis de los ácidos grasos, atrapadores de

especies reactivas de oxígeno (ROS) y chaperonas moleculares (Aguilar-Hernández y Loyola-Vargas, 2018).

A pesar de los estudios realizados aún hay un gran número de importantes rutas metabólicas y de transducción de señales por estudiar, así como las modificaciones postraduccionales de las proteínas. Por ello es esencial realizar el estudio del proteoma del desarrollo de los cultivos *in vitro* de aguacate e identificar las proteínas clave involucradas en el proceso, así como determinar los patrones de modificación de proteínas (acetilación, fosforilación, ubiquitinación, entre otras). En tanto el estudio proteómico nos brindará nuevas vías para el entendimiento de la dinámica y compleja interconexión de los eventos que se llevan a cabo durante la ES (Aguilar-Hernández y Loyola-Vargas, 2018).

1.8.1. Análisis proteómicos en el cultivo *in vitro* de aguacate

Entre los trabajos reportados de proteómica en cultivos embriogénicos de aguacate están el de Guzmán García et al., (2013), en este trabajo mediante un análisis 2D-DIGE se analizó el vínculo de la capacidad de regeneración diferencial de cultivos tipo SE y tipo PEM (masas proembriogénicas) a un patrón proteómico, observando que los perfiles de proteínas de los callos de ambos tipos eran diferentes. Este grupo encontró en líneas tipo ES, una alta abundancia de proteínas involucradas de respuesta a estrés, incluyendo la familia de enzimas glutatión S-transferasa (GST) la cual se ha reportado como un marcador potencial de la transición a partir de PEMs hacia SE mediante un patrón de expresión cambiante durante el proceso de desarrollo, una alta abundancia de la familia de proteínas manganeso superóxido dismutasa (SOD), la cual convierte los radicales superóxido en peróxido de hidrogeno y oxígeno como defensa al estrés oxidativo. La fenilcumarán bencil éter reductasa (PCBER) involucrada en la síntesis de los fenilpropanoides derivados de compuestos de defensa de las plantas, esta enzima es necesaria para la biosíntesis de taninos, la formación de lignanos y la lignificación (Cuadro 1.3).

En los estudios proteómicos también se ha observado un aumento, durante la generación del callo, de la familia de proteínas chaperonas HSP (HSP70) las cuales son comunes en cultivos embriogénicos y están relacionadas con el correcto plegado y acumulación de polipéptidos previniendo su agregación. También se encontró alta abundancia de proteínas involucradas en el metabolismo; la fructocinasa (FRK) que juega un papel primario en el metabolismo al

catalizar la transferencia de un grupo fosfato del ATP a la fructosa para formar fructos-6-fosfato, además de ser una de las proteínas de respuesta a auxinas. La D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa (PGDH) vinculada a la síntesis de serina. La metionina sintasa que contribuye en la formación de metionina a partir de la cual se producen etileno y poliaminas. Respecto a las proteínas de baja abundancia en las líneas embriogénicas se determinó la malato deshidrogenasa, enzima que cataliza la oxidación reversible de malato a oxalacetato y es considerada como un marcador de la etapa de desarrollo embriogénico. La glucosilasa I relacionada al sistema de destoxificación por metilglicoxal el cual es un potente agente que promueve la diferenciación en plantas. La metionina sintasa se encontró con diferentes isoformas en líneas PEM y ES.

Cuadro 1.3 Abundancia de proteínas identificadas de cultivos tipo SE y tipo PEM (Guzmán-García et al., 2013).

Abundancia de proteínas en cultivos tipo ES	Proceso/Función	
Familia de enzimas GST (glutación S-transferasa)	Marcador de transición de PEM a SE	Respuesta a estrés
Familia de proteínas (SOD) Manganeso superóxido dismutasa	Convierte los radicales superóxidos en peróxido de hidrógeno y oxígeno como defensa al estrés oxidativo	
La fenilcumarán bencil éter reductasa (PCBER) biosíntesis de taninos, formación de lignanos	Síntesis de fenilpropanoides (derivados de compuestos de defensa de las plantas)	
Proteínas chaperonas HSP (HSP70)	Plegado y acumulación correcta de péptidos	
Fructocianasa FRK (proteína de respuesta a auxinas)	Cataliza transferencia de grupo fosfato de ATP a fructosa= fructosa -6-fosfato,	Metabolismo
D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa PGDH	Síntesis de serina	
Metionina sintasa (isoformas)		
Malato deshidrogenasa (marcador de etapa de desarrollo embriogénico)	Cataliza la oxidación de malato a oxalacetato	Baja abundancia
Glucosilasa I	Sistema de destoxificación methilglicoxal (diferenciación)	

En un trabajo reciente, Olivares García et al., (2020), hicieron la identificación de proteínas en cultivos embriogénicos y no embriogénicos de aguacate Hass y criollo, obteniendo 126 proteínas acumuladas diferencialmente en ambas variedades. Identificaron proteínas relacionadas con el estrés, sobre acumuladas en CE en comparación con CNE, además de un mayor número de proteínas asociadas con estímulos de estrés en el aguacate Criollo en comparación con cultivos *in vitro* de Hass. En el proteoma central se registraron enzimas PP (fenilpropanoides) como la fenilalanina amonio liasa 1 (PAL1) acumulada en CE en comparación con CNE de ambas variedades, pero con valores significativamente mayores en Hass. En adición una citocromo P450, familia 71, subfamilia B, polipéptido 35 (CYP7135), peroxidasa 52 (POX52), 4-cumarato: CoA ligasa 1 (4CL1), cafeoil-CoA O- metiltransferasa 1 (CCoAOMT1), flavona 3'-O-metiltransferasa 1 (OMT1) y leucoantocianidina dioxigenasa (LDOX) se sobre acumularon en CE de Hass y Criollo en comparación con CNE. La cafeoil-CoA O-metiltransferasa (CCoAOMT) y la familia de aldehído deshidrogenasa de dos miembros C4 (ALH2C4) se acumularon en CE de la variedad Hass, mientras que en CE de aguacate Criollo mostraron valores contrastantes. Una probable cinamil alcohol deshidrogenasa 9 (CAD9) se acumuló en CNE. Además de proteínas relacionadas con el metabolismo de PP, se identificaron proteínas asociadas con el proceso biosintético de flavonoides en mayor proporción en CE que en CNE, como las isomerasas de la chalcona-flavanona (CHI1 y CHI3) y la flavanona 3-hidroxilasa (F3H), la proteína de la superfamilia UDP-glicosiltransferasa con una anotación de quercetina 3-O-glucosiltransferasa (GO: 0080043) y actividad de quercetina 7-O-glucosiltransferasa (GO: 0080044) se sobre acumuló en CE (Olivares García et al., 2020), (Figura S2). (Cuadro 1.4).

En CE de Hass, se determinó la sobreacumulación de dos proteínas de la familia de la citocromo P450 (C3'H, CYP98A3 y CYP71A22), relacionadas con el proceso biosintético de los fenilpropanoides. La sobreacumulación de la cinamato-4-hidroxilasa (C4H, CYP73A5) y de la UDP-glucosil transferasa 73B5) y una flavonol 3-O-actividad glucosiltransferasa. En CE de la variedad Criollo, se pudo identificar a la PAL2 en mayor proporción que en CNE, así como la peroxidasa 72 (POX72) asociada con el proceso biosintético de la lignina, la UDP-glucosil transferasa 85A2, con la función molecular de la quercetina 3-O-glucosiltransferasa y la quercetina 7-O-glucosiltransferasa, así como la actividad de UDP-glucosiltransferasa asociada con la función molecular del proceso biosintético de la lignina. Las proteínas relacionadas con el proceso catabólico de la fenilalanina, como la p-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa y la tirosina

descarboxilasa 1, se sobreacumularon en CNE de la variedad Criolla en comparación con CE. También se determinó que algunas proteínas asociadas con la biogénesis de la pared celular se encuentran en mayor proporción en CE que en CNE: la pectinesterasa inhibidor de la pectinesterasa 17, E1 similar a la celulosa sintasa, proteína de la superfamilia similar a la pectina liasa, probables glucanos endo-1,3-β-glucosidasas y peroxidasas se identificaron en mayor número. También se identificó a los ácidos *p*-cumárico y *t*-ferúlico, componentes polifenólicos que estimulan la producción de embriones somáticos en aguacate.

Cuadro 1.4. Probables proteínas diferenciales encontradas en callo embriogénico y no embriogénico de aguacate Hass y Criollo. ■ Sobreacumulación, ■ acumulación y □ baja abundancia (Olivares-García et al., 2020).

Tipo de proteínas / proceso	Nombre de proteína	Callo embriogénico CE		Callo no embriogénico CNE	
		Hass	Criollo	Hass	Criollo
Enzimas fenilpropanoides (PP)	(PAL 1) fenilalanina amonio liasa 1	■	■	□	□
	Citocromo P450	■	■	□	□
	Familia 71,	■	■	□	□
	Subfamilia B,	■	■	□	□
	Polipéptido 35 (CYP7135),	■	■	□	□
	Peroxidasa 52 (POX52)	■	■	□	□
	4-cumarato: CoA ligasa 1 (4CL1),	■	■	□	□
	Cafeoil-CoA O-metiltransferasa 1 (CCoAOMT1	■	■	□	□
	Flavona 3'-O-metiltransferasa 1 (OMT1)	■	■	□	□
	Leucoantocianidina dioxigenasa (LDOX)	■	■	□	□
	Cafeoil-CoA O-metiltransferasa (CCoAOMT)	■	□	□	□
Familia de aldehído deshidrogenasa de 2 miembros C4 (ALH2C4)	■	□	□	□	
	Cinamil alcohol deshidrogenasa 9 (CAD9)	■	□	■	■
Asociadas con	Chalcona-flavanona (CHI1 y CHI3)	■	■	□	□

el proceso de biosíntesis de flavonoides	Flavanona 3-hidroxilasa (F3H)	■	■	■	■
	Proteína de la superfamilia UDP-glicosiltransferasa	■	■	■	■
Metabolismo de PP	Proteínas de la familia del citocromo P450 (C3'H, CYP98A3 y CYP71A22),	■	■	■	■
	Proteínas de la familia del citocromo P450 (CYP93D1 y CYP94D2)	■	■	■	■
	Cinamato-4-hidroxilasa (C4H, CYP73A5)	■	■	■	■
	UDP-glucosil transferasa 73B5	■	■	■	■
	Flavonol 3-O-actividad glucosiltransferasa	■	■	■	■
	PAL2	■	■	■	■
Proceso biosintético de la lignina,	Peroxidasa 72 (POX72)	■	■	■	■
	UDP-glucosil transferasa 85A2	■	■	■	■
Proceso catabólico de fenilalanina	<i>p</i> -hidroxifenilpiruvato dioxigenasa y	■	■	■	■
	Tirosina descarboxilasa 1	■	■	■	■
Biogénesis de la pared celular	Probable pectinesterasa/inhibidor de pectinesterasa 17	■	■	■	■
	E1 similar a la celulosa sintasa	■	■	■	■
	Proteína de la superfamilia similar a la pectina liasa	■	■	■	■
	Probable glucano endo-1,3-β-glucosidasas	■	■	■	■
	Peroxidasas	■	■	■	■

1.9 Reguladores del crecimiento vegetal en el cultivo *in vitro*

La adición de RC en los sistemas de cultivo de plantas desempeña un papel central en la diferenciación celular y de forma importante durante la inducción de la ES. La mayor parte del proceso de ES depende de la concentración y el tipo de RC utilizado para cada cultivo, si bien en algunos casos ocurre sin la adición de éstos (Méndez-Hernández et al., 2019). Se sabe que las auxinas junto con las CKs, participan en la división celular durante el desarrollo de las plantas, actuando sinérgicamente o de forma antagónica (Nic-Can y Loyola-Vargas, 2016). Por

otro lado, se menciona que la presencia de una auxina es necesaria para la inducción de la ES, la cual puede ser removida posteriormente, mientras que en otros casos es necesario la combinación de RC o la adición de CKs solas al medio (Avilez-Montalvo et al., 2022). Por lo tanto, la adición de cierto tipo de RC en la inducción y las etapas posteriores del proceso de ES, dependerá de diversos factores como la especie con la cual se esté trabajando, así como el medio y las condiciones de cultivo. Para comprender mejor el papel de estos RC, a continuación, se resumen algunas de sus características.

1.9.1 Auxinas, biosíntesis y transporte

Las auxinas regulan un amplio rango de procesos de desarrollo y crecimiento de la planta, como la división, el crecimiento y la diferenciación celular. El ácido indol-3-acético (AIA) es la principal auxina natural en plantas y se sintetiza principalmente en hojas, primordios, y semillas en desarrollo (Korasick et al., 2013); pero además, la producción de auxina local también tiene lugar en células de meristemas de la raíz y del embrión apical, la capa radicular, el centro quiescente (QC), el meristemo proximal de la raíz y el haz vascular de los hipocótilos, controlando de esta forma la biosíntesis espacio-temporal, inactivación y transporte de AIA durante el crecimiento y desarrollo de las plantas (Dandekar y Naseem, 2017).

El transporte de AIA es de célula a célula, principalmente en el sistema vascular, cambium y el procambium, mientras que el transporte a la raíz involucra al floema (Davies, 2010). La síntesis de AIA tiene dos vías principales: una dependiente de triptofano (Trp) que tiene cuatro ramificaciones cuyos nombres se derivan de uno de los intermediarios más importantes de cada una de las vías, el 3-indol acetamida (IAM), el 3-indol acetaldoxima (IAOx), la triptamina (TAM), y la del ácido 3-indol pirúvico (AIP) y otra independiente de triptofano derivado de un precursor del mismo (Figura 1.7A) (Fukui et al., 2022; Hayashi, 2021).

El AIA es principalmente sintetizado a partir de la vía del triptófano a través del indol-3-piruvato (IPA) en una reacción de dos pasos catalizados por la TRIPTOFANO AMINOTRANSFERASA DE *Arabidopsis* (TAA) y la YUCCA (YUC) (Figura 1.7 A) (Tillmann et al., 2022; Morffy y Strader, 2020; Agboola et al., 2019). Si bien no se sabe mucho del catabolismo de las auxinas se propone que ocurre a través de la oxidación enzimática del núcleo indol del AIA (formando ox-AIA o los conjugados de ox-AIA), o a través de la descarboxilación oxidativa tanto de la cadena como del núcleo del AIA. Los niveles de auxina se pueden regular mediante conjugación,

inactivándose por conjugación con azúcares y varios aminoácidos; estos conjugados se pueden hidrolizar produciendo AIA activo mediante hidrolasas (Fig.1.7B). Los conjugados podrían competir con el AIA libre por sitios en los receptores, en los transportadores y también intervenir en el metabolismo, alterando el nivel de la auxina biológicamente activa (Hayashi, 2021; Mateo-Bonmatí et al., 2019).

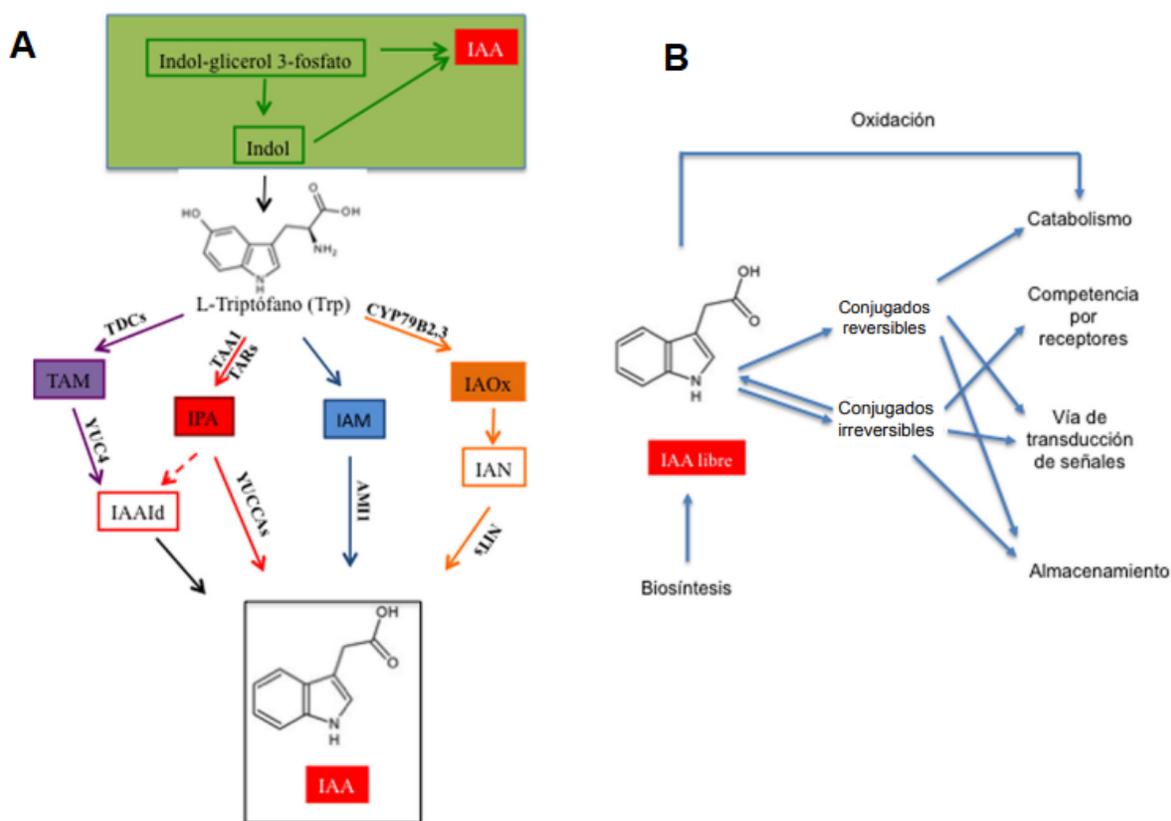


Figura 1.7. Vías de síntesis del AIA. (A) Se identifican las cuatro vías dependientes de triptófano: en azul se presenta la vía de IAM (3-indolacetamida), en la cual participan las hidrolasas AMI1 que convierten el IAM a AIA (ácido indolacético); en anaranjado se presenta la vía IAOx (3-indolacetaldoxima), participan las citocromo monooxigenasas (CYP79B2 y 3) para convertir el triptófano en IAOx, sugiriendo que las nitrilasas (NITs) convierten al indol-3-acetonitrilo (IAN) en AIA; en rojo la vía del IPA (ácido 3-indol pirúvico), en la cual la triptófano aminotransferasa y las enzimas relacionadas 1 y 2 (TAA1 y TAR1 y 2) convierten el triptófano en IPA (ácido indol pirúvico), el cual a su vez es convertido en AIA por la YUCCA (YUC); en morado la vía TAM (triptamina), donde la triptófano descarboxilasa (TDCs) convierten el triptófano en TAM, el cual es convertido a indol-3-acetaldehído (IAAld) mediante la acción de YUCCA 4 (YUC4) para generar AIA. B) Vía de degradación y conjugación del AIA. Obtención de AIA libre mediante síntesis y degradación (principalmente por oxidación); la conjugación reversible permite disponer de AIA libre; funcionando como

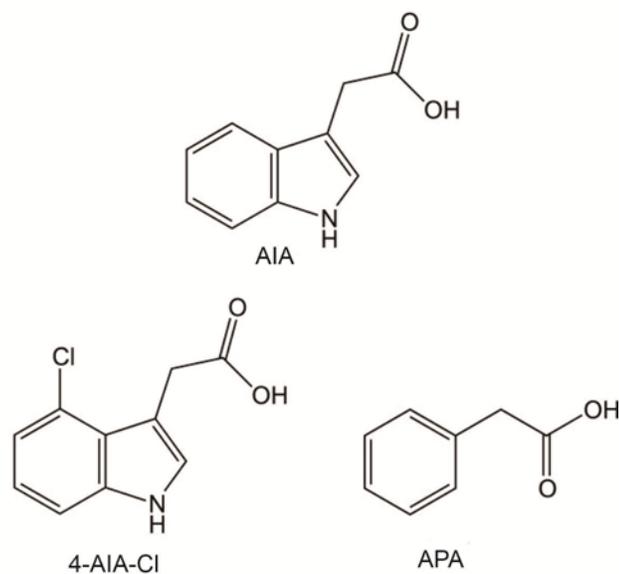
un reservorio de AIA. Los conjugados pueden ser reversibles o irreversibles y afectar la unión a receptores por competencia y/o por la vía de transducción de señales. Redibujado de Garay-Arroyo et al., (2014).

1.9.2. Análogos de auxinas

Los análogos de las auxinas son aquellas auxinas que se obtienen a partir de precursores químicos en laboratorio y tienen características y forma de acción similar a las auxinas naturales. Cuando se suministran de forma exógena ciertos compuestos ya sea de origen natural o sintético, inducen una respuesta de auxina endógena, como se ha demostrado en *Daucus carota* en la que la adición de auxinas exógenas favorece la acumulación de AIA endógeno (Michalczuk et al., 1992). Sin embargo, una exposición prolongada a auxinas exógenas dentro del tejido puede detener el desarrollo normal de la ES, ya que su acumulación dentro de los embriones puede interferir con la capacidad de formar gradientes de auxina internos que permiten la polarización de las células (Nissen y Minocha 1993). Esta adquisición de la polaridad es importante para la formación de la simetría bilateral durante los estadios iniciales de la embriogénesis (García et al., 2019).

En la figura 1.8 se presentan las estructuras de las principales formas de auxinas naturales y sus análogos. Las auxinas activas de origen natural (Fig. 1.8 A), como el AIA, el ácido 4-cloroindol-3-acético (4-Cl-AIA) y el ácido fenilacético (APA), y de los análogos (Fig.1.8 B), como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), el ácido 1-naftalenoacético (ANA), el ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico (dicamba) y el ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (picloram), inducen una respuesta de auxina (Korasick et al., 2013).

(A) Auxinas naturales activas



(B) Auxinas sintéticas activas

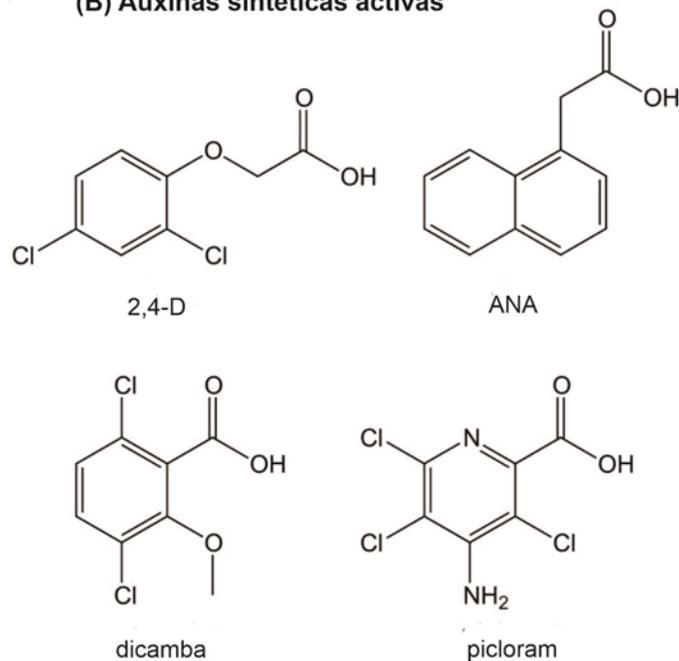


Figura 1.8. Auxinas naturales y algunos de sus análogos. (A) El ácido indol-3-acético (AIA), el ácido 4-cloroindol-3-acético (4- AIA-Cl) y el ácido fenilacético (APA) son auxinas activas naturales. (B) El ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), el ácido 1 naftalenoacético (ANA), el ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico (dicamba) y el ácido 4-

amino-3,5,6-tricloropicolínico (picloram) son análogos de auxinas. Modificado de Korasick et al., (2013).

1.10. Citocininas

Las CKs desempeñan varias funciones en el desarrollo de las plantas. Actúan en conjunto con otros RC, principalmente las auxinas regulando la división y diferenciación celular y participan en el desarrollo vascular del floema y el xilema. Las CKs tienen un papel central en el crecimiento de brotes ya que promueven la actividad de los meristemos apicales y axilares, por su efecto en la división y/o diferenciación celular regulando así la proliferación celular (Márquez-López et al., 2019). Si bien las CKs promueven el crecimiento y desarrollo de brotes, por otro lado, inhiben el crecimiento de la raíz, regulando la ramificación y arquitectura de raíces (Chang et al., 2015). También se ha encontrado que tienen un papel en la regulación de la filotaxia de las hojas (Besnard et al., 2014), el desarrollo del gineceo (Sehra y Franks, 2015), el desarrollo del gametofito femenino y el desarrollo del cambium vascular (Nieminen et al., 2008).

Las CKs se sintetizan en numerosos tipos de células tanto en las raíces como en los brotes, se produce un transporte local y de larga distancia (Kamada-Nobusada y Sakakibara, 2009), se transportan de las raíces a los brotes a través del xilema (principalmente como ribósidos) y de los brotes a las raíces a través del floema (principalmente como CKs de tipo iP) (Kudo et al., 2010). Los niveles de CKs de la raíz aumentan en respuesta al nitrato y el transporte de esta CKs podría representar una señal de larga distancia para coordinar el desarrollo de brotes y raíces.

Las CKs son derivados de la adenina y se encuentran los dos isómeros posibles; *trans*- y *cis*-zeatina (*tZ* y *cZ*) con una cadena lateral de cinco carbonos conectada al grupo amino exocíclico (N6), lo cual determina el carácter alcalino de las CKs (Fig. 1.9A). Los metabolitos comunes de las CKs incluyen *N*⁹-ribósidos, *N*⁹-ribótidos, *N*⁷-glucósidos y *O*-glucósidos (Schaller et al., 2015). Las CKs se clasifican en tres principales grupos: formas activas, formas de translocación y formas de almacenamiento e inactivadas. La clase más común son las de tipo isoprenoide que incluyen a los dos isómeros de la zeatina (Z), la dihidrozeatina (DZ) y la *N*6-(Δ^2 -isopentenil) adenina iP. De acuerdo con su configuración *cis* o *trans* se nombran las zeatinas dependiendo de cuál de los dos grupos metilo está hidroxilado. Se sabe que la *tZ* es más abundante que la *cZ* en las plantas; sin embargo, esta aseveración depende de la especie en estudio (Figura 1.9

B). Más del 90% de las CKs del arroz son tipo *cis*, en tanto que las CKs de *Arabidopsis thaliana* son del tipo isopentennil y del tipo *trans*. Las principales CKs aromáticas presentes en los tejidos vegetales son la *N*⁶-benciladenine (BA), la *orto*-topolina (oT), la *meta*-topolina (mT), la *orto*-metoxitopolina (MeoT) y la *meta*-metoxitopolina (MemT) (Figura 1.9C) (Márquez-López et al., 2019). Se puede observar que existen nueve CKs naturales, de las cuales las de origen isoprénico (cuatro) se encuentran más distribuidas en la naturaleza que las cinco de origen aromático (Márquez-López et al., 2019) las cuales se encuentran en la familia de los árboles del género *Populus*. De hecho, el nombre topolino deriva de la palabra checa “topol” que significa álamo.

1.10.1. Biosíntesis de las citocininas

El primer paso en la biosíntesis de las CKs, la condensación entre el dimetilalil pirofosfato (DMAPP) y el ATP/ADP/AMP es catalizado por la enzima isopenteniltransferasa (IPT), y produce los *N*⁶-isopentenyladenine ribótidos (iP) correspondientes (Sakakibara, 2006). Los iP ribótidos formados se convierten a CKs del tipo tZ por hidroxilación de la cadena lateral isoprenoide por enzimas del tipo citocromo P450 enzimas, las CYP735A1/CYP735A2. Los ribonucleótidos, y ribonucleósidos producidos por la pérdida del fosfato y de la glucosa dan origen finalmente a la forma activa por medio de la enzima 5'-O-monofosfato fosforribohidrolasas (LONELY GUY; LOGs) (Márquez-López et al., 2019; Takei et al., 2004).

El nivel de CKs activa se puede reducir mediante su conjugación con carbohidratos. La *N*-glucosilación de las CKs ocurre principalmente en las posiciones *N*⁷ o *N*⁹ del anillo de la purina y se cree que es irreversible. La *O*-glucosilación, que probablemente sea reversible, ocurre en el oxígeno en las cadenas laterales de la zeatina o de la dihidrozeatina (Mok y Mok, 2001).

Si bien la ES en el cultivo *in vitro* es una herramienta muy útil y puede ayudar a la obtención de plantas en masa, así como resistentes a enfermedades; en aguacate obtener un protocolo de ES ha sido un proceso complejo hasta la fecha debido a diferentes factores como, el tipo de explante utilizado para la inducción, la composición de los medios de cultivo durante las diferentes etapas de desarrollo, el tipo y concentración de RC y las condiciones de crecimiento. Se han realizado previamente análisis proteómicos en cultivos *in vitro* de aguacate con la intención de encontrar patrones de referencia tanto en cultivos embriogénicos como no embriogénicos, que nos ayuden a elucidar el proceso de ES en este cultivo. Sugiriendo varias

proteínas que puede ser candidatas como marcadores de referencia, pero aún faltan estudios para esclarecer que es lo que determina el éxito en la formación y desarrollo de los embriones.

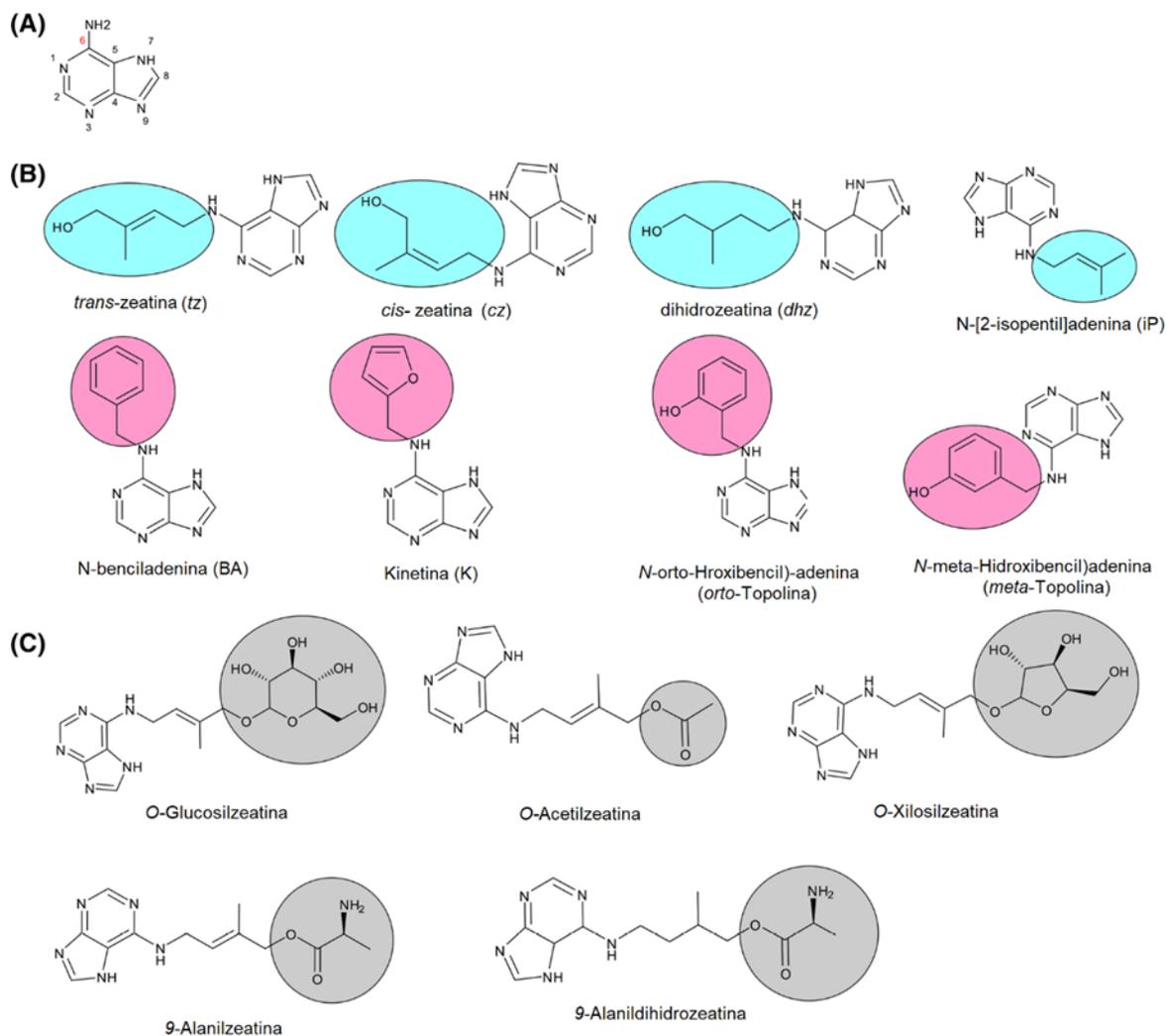


Figura 1.9. Estructuras químicas de las citocininas. a) Una estructura de adenina y el sistema de numeración para la nomenclatura de las CK. b) CK isoprenoides representativas y CK aromáticas. Se dan nombres comunes con abreviaturas de uso común entre paréntesis. Cadena lateral isoprenoide dentro de óvalo azul y cadena aromática dentro del óvalo rosa. c) Estructura de conjugados de CK. La molécula conjugada con la CK está dentro del óvalo gris. Imagen redibujada de Marqu ez-Lop ez et al., (2019).

Por tanto, en este trabajo nos hemos propuesto abordar el tema desde un enfoque distinto a lo que se ha realizado hasta ahora. Primero empleamos un método de inducción de ESD a partir de secciones de tallo y hoja en medio líquido de Yasuda, utilizando como RC BA 5 μM , se analizó mediante cortes histológicos la formación de estructuras en los explantes. Segundo, se empleó el protocolo de inducción (ESI) en aguacate clásico, que consiste en sembrar embriones cigóticos en medio MS semisólido con picloram 0.41 μM , de donde se obtuvo la formación de callo, en esta parte nos enfocamos en la caracterización del crecimiento del callo, e identificamos las etapas diferenciales de crecimiento, marcando como puntos los días en los que se observó esta diferencia. Tercero, una vez identificados los días diferenciales de crecimiento, procedimos a realizar el estudio proteómico de los días marcados, el estudio se hizo mediante geles de doble dimensión, utilizando el software Melani para determinar el volumen de abundancia de los puntos encontrados que corresponden a las proteínas presentes en los cultivos durante cada etapa. Se determinaron los puntos con volumen diferencial y mediante la base de datos SWISS 2DE-PAGE se identificaron las proteínas candidatas a las que pueden corresponder dichos puntos.

1.11. JUSTIFICACIÓN

El estudio a nivel molecular de la ES del aguacate deberá ayudar a entender mejor como se lleva a cabo este proceso. El estudio de la expresión de algunos genes ha contribuido al entendimiento de la ES, sin embargo, no ha sido suficiente. Se espera que la realización de un estudio proteómico en cultivos *in vitro* de aguacate durante el crecimiento y desarrollo de los callos, ayude a determinar cuál es el mejor momento para inducir el proceso de ES, esto con la finalidad de mejorar este proceso en el aguacate.

1.12. OBJETIVOS

1.12.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar el patrón de proteínas en cuatro puntos del ciclo de cultivo de callos de aguacate.

1.12.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Optimizar la ES mediante la vía directa en explantes de hoja y tallo de plántulas cultivadas *in vitro* de aguacate.

- Caracterizar el ciclo de crecimiento de cultivos de callo de *P. americana*.
- Enlazar el patrón proteómico diferencial entre las distintas fases de crecimiento del ciclo de cultivo de callo, tratando de predecir la capacidad de desarrollar embriones somáticos maduros, basados en el perfil de proteínas y entender mejor la ES.

1.13. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental propuesta para lograr los objetivos fue la siguiente.

1. Inducción de embriogénesis somática directa.
2. Inducción de embriogénesis somática indirecta
3. Selección del tamaño del inóculo, se realizó la caracterización de los cultivos mediante determinación de parámetros de crecimiento: peso fresco, peso seco, taza e índice de crecimiento y tiempo de duplicación.
4. Selección del protocolo de extracción: realización de ensayos mediante los métodos de extracción con TCA /acetona y el método del fenol.
- 5.- Estudio proteómico de muestras de callo de los días 16, 21, 28 y 40. Para el estudio proteómico se siguieron los siguientes pasos: extracción de proteína, cuantificación, separación por isoelectroenfoque, separación en gel de doble dimensión, digitalización de geles y análisis bioinformático.

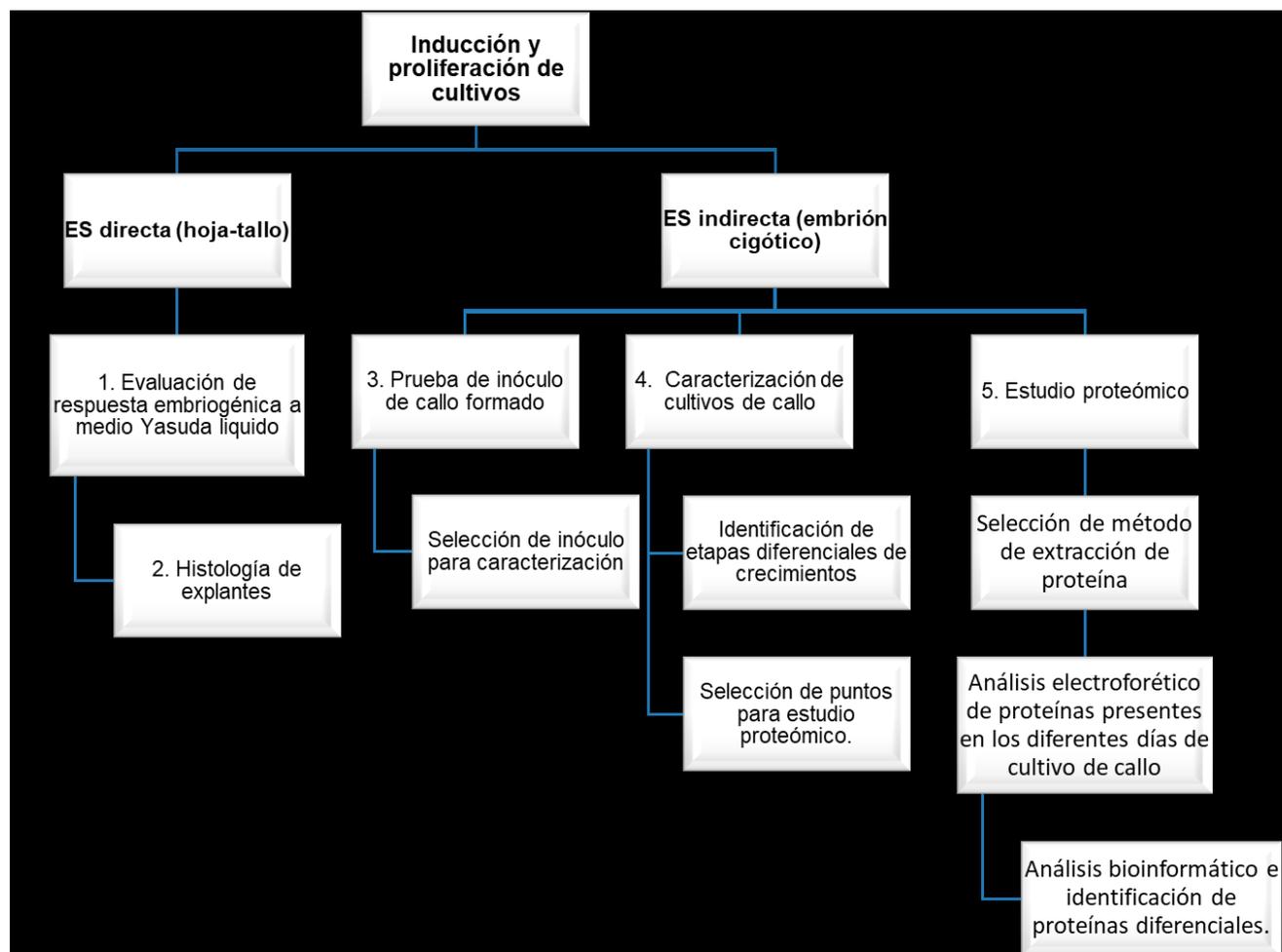


Figura 1.10. Esquema de estrategia experimental de trabajo. Inducción de la embriogénesis somática mediante las vías directa e indirecta a partir de explante de hoja y tallo de plántulas in vitro y embriones cigóticos de aguacate respectivamente.

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material biológico

El material inicial fueron embriones cigóticos extraídos a partir de frutos maduros de aguacate comercial variedad Hass de la marca JBR. Los frutos de aguacate se lavaron con agua y jabón, se les retiró la semilla. Las semillas se sometieron a los siguientes pasos de limpieza en una campana de flujo laminar: a) lavado con una solución de Extrán al 5% con agitación constante por cinco minutos, b) enjuague con agua destilada estéril hasta eliminar el exceso de Extrán, c) lavado con una solución de etanol al 70% con agitación constante por tres minutos, d) enjuague con agua destilada estéril tres veces, e) el último paso de desinfestación se llevó a cabo con una solución de cloro al 30%, manteniéndolo en agitación continua por 15 minutos, y f) las semillas se enjuagaron con agua estéril de tres a cinco veces hasta eliminar el exceso de cloro. Con ayuda de una pinza y un bisturí estéril se extrajo el embrión cigótico para ser depositado en medio MS para la obtención de plántulas *in vitro* para la inducción de embriogénesis somática directa y para la vía indirecta los embriones cigóticos obtenidos se colocaron en medio MSP para la obtención de callo.

2.2. Inducción de la embriogénesis directa

Los embriones cigóticos extraídos de frutos maduros de aguacate de acuerdo al apartado 2.1, se sembraron en medio MS hasta su desarrollo en plántulas en un tiempo aproximado de 3-5 meses de edad. Estas plántulas fueron utilizadas para la inducción de la ES directa. A partir de secciones de tallo y hoja se cortaron explantes de aproximadamente 1 cm de tallo y círculos de 0.5 cm de hoja y sembrados en medio Yasuda (1985) líquido [sales del medio de Yasuda con 5 μM BA y 100-200 mg L^{-1} de ácido ascórbico. Los matraces se incubaron en la oscuridad a 24 ± 2 °C y agitación (55 rpm) durante un tiempo de 56 d de acuerdo a las observaciones. Al final del tiempo de incubación se evaluó la respuesta embriogénica.

2.3. Inducción de la embriogénesis indirecta

Los embriones cigóticos de aguacate fueron sembrados en medio de inducción de embriogénesis MS (Murashige & Skoog Basal Salt Mixture M524 PhitoTech LABS) (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 0.41 μM de picloram, tiamina 5 mg L^{-1} , sacarosa 30 g L^{-1} y el

pH ajustado a 5.7 antes de agregar gellan gum 2.8 g L⁻¹. El medio, así preparado, fue dispensado en frascos en alícuotas de 25 mL por frasco y sellados; posteriormente los frascos se esterilizaron a 121 °C por 20 min. Los cultivos se incubaron bajo condiciones de oscuridad a 24 ± 1 °C, los cultivos fueron subcultivados cada cuatro semanas durante 2-3 meses, hasta la formación de callo.

2.3.1. Prueba de Inóculo

Después de la obtención del callo y contar con material suficiente, se realizó la prueba de inóculo usando 0.5 y 1 g de tejido, los cuales fueron sembrados en frascos con medio para crecimiento de callos MSP (composición en Cuadro S1), bajo condiciones de oscuridad a 24 ± 2 °C, la toma de muestras se realizó cada siete días por triplicado para cada inóculo, durante un periodo de 42 días. Los parámetros evaluados fueron pesos fresco y seco, y el índice y la tasa de crecimiento, y se calculó el tiempo de duplicación.

2.3.2. Caracterización de cultivo de callos

Una vez que se seleccionó el tamaño de inóculo apropiado, se procedió a realizar el ciclo de cultivo, tomando inóculos de 1.0 g de peso fresco, los cuales fueron sembrados en frascos con 25 mL de medio MSP para el crecimiento de los callos, el muestreo se realizó por triplicado cada dos días para la caracterización por un periodo de 42 d.

2.3.3. Determinación de los pesos fresco y seco de los callos

Para determinar el peso fresco, se tomaron muestras por triplicado cada séptimo día para la prueba de inóculo y cada dos días para realizar el ciclo de cultivo. Se retiró el tejido de la superficie del medio con pinzas de punta plana y se colocó en un cuadrado de papel aluminio pre-pesado en balanza. Para evitar la desecación del tejido, se abrió el frasco de cultivo solo cuando estaba listo para procesarlo. Una vez cosechados, los tejidos frescos pesados se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C, hasta el término del ciclo de cultivo. Posteriormente las muestras fueron liofilizadas a una temperatura de -40 °C y pesadas para la determinación del peso seco.

2.3.4. Parámetros de crecimiento

Los resultados de las pruebas evaluadas se graficaron en el programa R. Los parámetros de crecimiento evaluados fueron: índice de crecimiento, velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación de acuerdo con Galaz-Ávalos et al. (2012). Para evaluar los parámetros de crecimiento se utilizaron las siguientes formulas:

- **Índice de crecimiento**

$$G_I = \frac{W_f - W_o}{W_o}$$

En donde:

G_i = índice de crecimiento

W_f = peso final (g)

W_o = peso inicial (g)

- **Tasa de crecimiento específico**

$$\mu = \frac{\ln X - \ln X_0}{T}$$

En donde:

$\ln X_0$ = logaritmo natural de la biomasa inicial

$\ln X$ = logaritmo natural de la biomasa al tiempo T

T = tiempo

μ = tasa de crecimiento específico

- **Tiempo de duplicación**

- $dT = \frac{\ln 2}{\mu}$

μ = tasa de crecimiento específico

2.4. Análisis histológico

1. Los tejidos vegetales del sistema de ESD se fijaron en solución de FAA (formaldehído al 10%, ácido acético al 5% y etanol al 50%) durante 72 h en condiciones de oscuridad a 4 °C.
2. Para evitar la formación de cristales las muestras se incubaron en diferentes gradientes de sacarosa al 10, 20 y 30%, el cual funciona como crioprotector, los gradientes se prepararon en un amortiguador de fosfatos PB (fosfato de sodio dibásico 10 mM y fosfato de potasio monobásico 2 mM, pH 7.2; ajustado con NaOH 1 N).
3. Las muestras fueron incubadas en cada gradiente de sacarosa durante 1 h a 4 °C, se agregaron tres y seis gotas de medio de congelación de tejidos Leica a los gradientes de sacarosa de 20 y 30%, respectivamente.
4. Las muestras se incrustaron en un medio de congelación de tejidos Leica a -26 °C y se colocaron dentro del criostato.
5. Los bloques se seccionaron a 25 µm con un criostato con cuchillas de bajo perfil y los cortes fueron colocados en portaobjetos preparados previamente con solución de Poli-L-Lisina al 10% durante 24 h. Los cortes fueron analizados en un microscopio óptico con el objetivo 4x.
6. Las secciones fueron teñidas utilizando azul de toluidina al 0.05% el cual tiñe componentes ácidos de los tejidos, como sulfatos y radicales fosfatos, incorporados en el ADN y ARN de las células, utilizado también para teñir paredes celulares primarias.
7. Después las preparaciones se lavaron con agua destilada, y el tejido se cubrió con 20 µL de medio de montaje y un cubreobjetos, sellando la unión con esmalte de uñas. Las muestras se observaron en un microscopio Axio Lab.A1 MAT HAL 50.

2.4 Análisis proteómico

Con la finalidad de identificar las proteínas presentes en las diferentes etapas del crecimiento del callo se planteó un protocolo de análisis proteómico, basado en los siguientes pasos: selección del método de extracción de proteína, primera separación por electroenfoque, equilibrio (proceso de reducción y alquilación), separación en gel de doble dimensión 2-DE, e identificación de proteínas mediante el análisis de imágenes, identificación de proteínas y el análisis bioinformático (Figura 2.1).

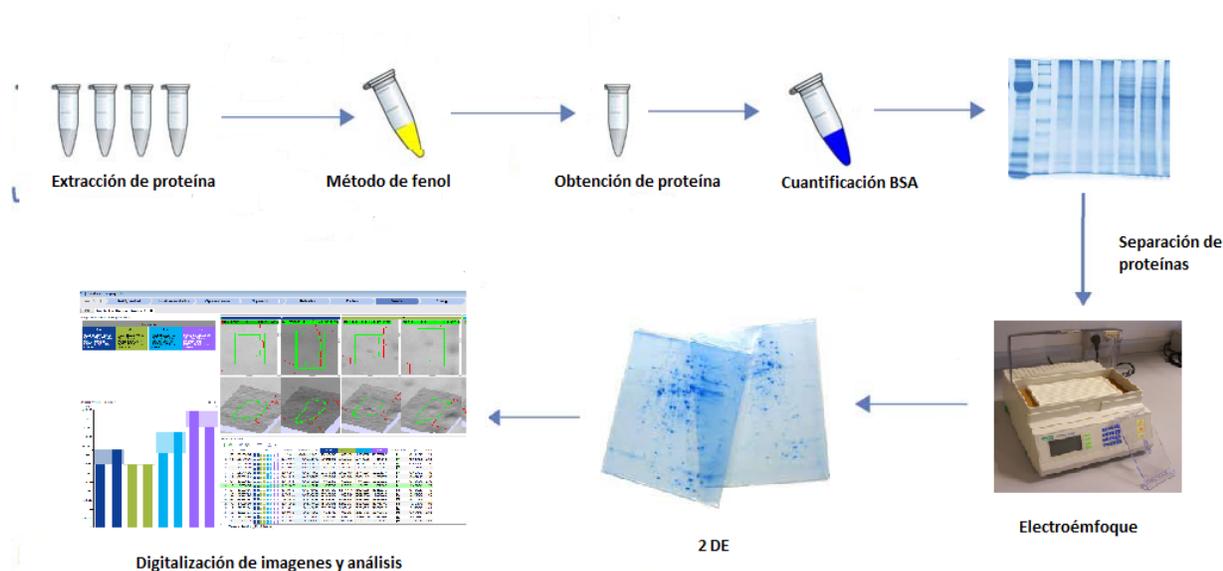


Figura 2.1. Diagrama de proceso en análisis proteómico. Muestra de forma general los pasos que se llevan a cabo en el proceso del análisis proteómico desde la extracción a partir del tejido hasta el análisis bioinformático.

2.4.1 Extracción de proteína por el método TCA/ACETONA

El método de extracción mediante TCA/acetona (Niu et al., 2018) ha demostrado ser eficiente, debido a que es un procedimiento rápido y sencillo de realizar. En el presente trabajo se comenzó a trabajar con este método, pero debido a la naturaleza del tejido y la interferencia de ciertos componentes de difícil disolución como pueden ser los carbohidratos, optamos por probar el método adaptado de extracción con fenol (Wang et al., 2016; Wu et al., 2014 b). Por lo tanto, se ensayaron dos métodos de extracción de proteína la extracción mediante TCA/acetona y el método de extracción con fenol.

Se tomaron muestras de 1 - 4 g PF de callo que posteriormente se liofilizaron, se realizó la homogenización del tejido en un mortero pre-enfriado y se adicionaron 2 mL de amortiguador de extracción [0.7 M sacarosa, 0.1 M KCl, 0.5 M Trizma base, adicionado con 50 mM EDTA, ajustado a pH 7.5, 50 mM DTT, 1 mM PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo, PMSF del inglés phenylmethylsulfonyl fluoride) y coctel de inhibidores de proteasa 1x], el homogenado se transfirió a tubos Eppendorf y se centrifugó a 15,000 x g durante cinco min. El sobrenadante se transfirió a tubos nuevos y se añadió TCA al 20% /acetona fría 80% al extracto de proteína (1:1, v/v), la mezcla se colocó en hielo durante 5 min, se centrifugó a 15,000 x g durante 3 min y se descartó el sobrenadante. El precipitado de proteína se lavó con acetona al 80%, seguido de

centrifugación como se mencionó previamente. El paso de lavado se repitió dos o más veces. Los precipitados de proteína se secaron al aire durante un período corto (1-3 min) y se disolvieron en un amortiguador de rehidratación [urea 8 M, Thiourea 1.5 M, CHAPS 1.5% (p/v), DTT 50 mM].

2.4.2 Extracción de proteínas por el método del fenol

El tejido se pulverizó en un mortero de porcelana previamente enfriado hasta obtener un polvo fino, se le adicionó la solución de amortiguador de extracción [0.7 M sacarosa (Sigma, S539), 0.1 M KCl (Sigma), 0.5 M Trizma base (Sigma, T1503) adicionado con 50 mM EDTA (Sigma) ajustado a pH 7.5, 50 mM DTT (Sigma, D5545) 1 mM PMSF (Sigma, P7626) y coctel de inhibidores de proteasa 1x], el homogenado se transfirió a tubos Eppendorf de 2 mL y se agitó durante dos min; posteriormente se adicionó un mL de fenol y se homogenizó, el homogenado se centrifugó a 15,000 x g a 4 °C durante 30 min. Se recuperó la fase fenólica superior y el sobrenadante fue transferido a un tubo Eppendorf nuevo. Al sobrenadante se le adicionó una solución de acetato de amonio (5 volúmenes) y se dejó precipitar durante más de 12 h -20 °C. Los tubos se centrifugaron a 15,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, el sobrenadante se descartó y la proteína precipitada fue lavada con metanol y acetona dos veces, centrifugando en cada lavado a 7,000 rpm. La proteína precipitada fue secada al aire durante 5-10 minutos y se guardó a -80 °C para su posterior análisis. La pastilla se disolvió en amortiguador de rehidratación [urea 8 M, tiourea 1.5 M, CHAPS 1.5% (p/v), DTT 50 mM]. La integridad de la proteína obtenida se verificó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% utilizando marcadores moleculares de Thermo Fisher.

2.4.3. Cuantificación de proteína

La cuantificación de la cantidad de proteína se realizó por el método de Peterson (1977) utilizando albumina sérica bovina como estándar (1 mg mL⁻¹), en un rango de concentraciones de 10 a 100 mg y se llevó a 1 mL de volumen final con agua destilada y amortiguador de rehidratación. Se tomaron 5 µL de las alícuotas obtenidas y se llevaron a un volumen final de 1 mL con agua destilada. Después a los estándares de la curva patrón y a las muestras se les agregaron 100 µL de solución DOC [deoxicolato de sodio 0.15% (p/v)], se agitaron en vórtex y se dejaron reposar 10 min a temperatura ambiente. Después de los 10 min se adicionaron 100 µL de ácido tricloroacético (TCA) al 72% (p/v) frío, se incubó durante 20 min. La muestra se centrifugó a 3000 rpm por 15 min a 4 °C. Los tubos se dejaron secar, luego se les agregó un

mL de agua destilada y un mL del reactivo A [agua destilada, 0.8 N NaOH, CTC (cobre 0.1%, tartrato 0.2%, carbonato 10%) y SDS 10%], la mezcla se deja reposar por 10 min, y a continuación se agrega el reactivo B (reactivo de Folin-Ciocalteu:agua destilada) y se permite que se desarrolle el color por 30 min. La absorbancia se mide a 750 nm.

2.4.4. Separación en gel de doble dimensión 2-DE

El análisis de doble dimensión (2DE), es un método de prefraccionamiento antes del análisis mediante espectrometría de masas. La separación mediante electroforesis bidimensional (2DE) consta de dos fases para la separación de las proteínas. En la primera fase de separación se usa el punto isoeléctrico de la proteína (pI), a esta técnica se le denomina electroenfoque. La segunda separación se realiza en función de la masa molecular (MM) de las proteínas en un gel SDS-PAGE. En conjunto esta técnica se denomina separación de proteínas en doble dimensión.

2.4.5. Isoelectroenfoque

Una vez extraídas las proteínas, la pastilla fue resuspendida en un amortiguador de rehidratación, se realizó la cuantificación total de proteínas previamente descrita (2.4.3.). Se prepararon los tubos adicionando el volumen correspondiente a 2 mg de muestra, se aforó a 450 μ L con amortiguador de rehidratación, posteriormente se agregaron anfolitos Bio-lyte 0.2% (4.5 μ L) y azul de bromofenol 0.001% (5 μ L). La muestra preparada se colocó en dirección del cátodo al ánodo en celdas de rehidratación y sobre esta se posicionó la tira [tiras de gel de acrilamida IPG lineales de 23 cm (pH 3-10, Bio-Rad) con gradientes de pH inmovilizado], de tal forma que el gel hiciera contacto con la muestra, sobre la superficie de la tira se adicionaron 3 mL de aceite mineral para favorecer la rehidratación durante un tiempo aproximado de 16 h a 20 °C. Pasado el tiempo de rehidratación se llevó a cabo la separación de las proteínas de acuerdo con su punto isoeléctrico en el equipo de isoelectroenfoque (PROTEAN IFE Cell, BIO-RAD) bajo las condiciones siguientes: 4 h a 0 -100 V; 1 h a 250 V; 1 h a 1000 V; 2 h de 1- 10 kV, 80,000 V h.

2.4.6. Equilibrio

Terminado el proceso de isoelectroenfoque se extrajeron las tiras y se mantuvieron en congelación hasta su uso para la separación de las proteínas en la segunda dimensión. Las tiras con la muestra deben equilibrarse primero en un amortiguador que contiene DTT, un

agente reductor de puentes disulfuro y posteriormente en un amortiguador con un alquilante la iodoacetamida, para evitar la recombinación de los puentes disulfuro y evitar que se formen agregados. Este proceso se conoce como equilibrio y permite que la transferencia al segundo gel (SDS-PAGE) sea completa y el corrido sea homogéneo. Para equilibrar las tiras se sumergieron en el amortiguador de equilibrio I (6 M urea, 0.375 M Tris HCl, pH 8.8, 2% glicerol, 10% SDS y 2% DTT) a temperatura ambiente durante 15 min en agitación. A continuación, las tiras se sumergieron en el amortiguador de equilibrio II (6 M urea, 0.375 M Tris HCl, pH 8.8, 2% glicerol, 10% SDS y 2.5% iodoacetamida) a temperatura ambiente por 15 min y protegidas de la luz con agitación constante; posteriormente se colocaron en el amortiguador de corrida.

2.4.7. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Se ensambló el equipo de electroforesis (Protean plus Doedecell, Bio-Rad). Las paredes del equipo y los cristales se limpiaron con etanol al 70% y papel absorbente. Se preparó la solución para los geles de poliacrilamida SDS-PAGE de un mm de espesor (0.375M Tris HCl, 12% acrilamida-bisacrilamida, 0.1% SDS, 0.05% APS, 0.025% TEMED y agua ultra pura aforando a 450 mL). La mezcla se vertió en los cristales a una altura aproximada de 19 cm, después se agregó agua ultrapura, dejando polimerizar por 30 min. Las tiras que se encontraban en el amortiguador de corrida a pH 8.3 (25 mM Tris base, 192 mM glicina, 0.1% SDS, agua desionizada filtrada), fueron colocadas en forma horizontal sobre el gel de separación de poliacrilamida, colocando el marcador molecular en un extremo de la tira, después se llenó con solución de agarosa al 0.5 % y 0.05% de azul de bromofenol. Los cristales se colocaron en el equipo de electroforesis y se dejaron correr a 200 V por 10 h, para posteriormente ser transferidos a una solución de tinción (2.4.8).

2.4.8. Tinción con azul de Coomassie

Los geles se tiñeron durante la noche con tinción coloidal de Coomassie Brilliant Blue (CBB) seguido de decoloración con varios lavados de solución de desteñido (agua destilada 50%, metanol 40% y ácido acético 10%). Las proteínas separadas, se pudieron visualizar como "puntos" o manchas con el azul brillante de Coomassie el cual se une a los aminoácidos básicos y aromáticos de las proteínas a través de interacciones electrostáticas e hidrófobas.

2.5. Análisis de las proteínas reveladas

La imagen del gel se capturó en el equipo ChemiDoc MP Imaging system BIO-RAD (modelo No. universal hood III, serie 731BR03505). Después, con el programa CorelDraw Photopaint Graphics Suite 2022, se realizó la edición y el ajuste de las imágenes obtenidas para igualar su formato (escala de grises 16 bits, 300 dpi de resolución). Para el análisis de las proteínas del gel, se utilizó el software Melanie Image Master versión 9.0, (<http://www.genebio.com/products/melanie/>) que permite realizar análisis diferenciales de proteínas. La diferencia en los volúmenes de las manchas de gel representó la abundancia de cada de proteína detectada. El programa permite que los puntos se puedan cuantificar, calculando su densidad óptica, área y volumen. Se identificó y estimó el volumen de las proteínas presentes en el gel mediante un análisis de varianza (ANOVA). $P \leq 0.05$ y un valor ≥ 1 veces de cambio (fold change). Para la búsqueda de las proteínas candidatas de acuerdo a su pH y masa molecular de los puntos, se utilizó la base de datos SWISS-2DPAGE (actualización: noviembre de 2011) disponible en el servidor ExpASy.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DEL CULTIVO DE TEJIDOS DE AGUACATE

3.1. Inducción de embriogénesis directa

Para abordar esta investigación, primero se trabajó en la inducción del cultivo de tejidos. En este capítulo presentamos y discutimos todos los datos obtenidos durante dicho proceso. En primer lugar se decidió adicionar una concentración de 100 mg L⁻¹ de ácido ascórbico al medio de cultivo para evitar la oxidación de los explantes, extendiendo el periodo de crecimiento como sugirieron Vidales- Fernández et al. (2003) quienes observaron que la necrosis se reducía en un 100% con la inmersión de tejido nucelar en ácido ascórbico 400 mg L⁻¹ dando una respuesta favorable a la inducción de callo y masas proembriogénicas.

Los explantes de tallo y hoja obtenidos de las plantas de las semillas germinadas *in vitro*, fueron sembrados en el medio Yasuda adicionado con 5 µM de BA. En el primer experimento 100% de los cultivos sin ácido ascórbico presentaron oxidación completa a las dos semanas de sembrados (3 matraces), mientras que en los cultivos a los que se le adicionó ácido ascórbico (8 matraces) se observó el desarrollo de estructuras similares a embriones globulares a partir de la segunda y tercera semana.

El desarrollo de brotes y masas proembriogénicas a partir de explantes de tallo, se diferenció alrededor del día 35 después de la inducción; se determinó que se formaron diferentes estructuras a la vez o de forma secuencial en un mismo explante (Figuras 3.1A y 3.1B). El explante de hoja, no presentó crecimiento de estructuras en el medio con o sin antioxidante, únicamente se retrasó la oxidación de la hoja en el medio con ácido ascórbico. Basados en las observaciones consideramos que la respuesta embriogénica en los explantes de tallo fue del 81.81% para el primer ensayo. Posteriormente, debido a que los explantes que presentaban estructuras similares a embriones globulares, no se desarrollaban más allá de este estadio y presentaban una rápida oxidación, se transfirieron a medio MS sin BA o a medio de Yasuda semisólido con 5 µM de BA para inducir el desarrollo de los embriones; sin embargo, los cultivos comenzaron a desarrollar anormalidades y/o presentaron oxidación a los pocos días del trasplante, evitando el desarrollo de los embriones.

En un segundo intento de inducción de la ES por esta vía, se aumentó la concentración del antioxidante a 200 mg L^{-1} con la finalidad de extender la vida de los cultivos y evitar la oxidación, para favorecer el desarrollo de embriones. Se observó la formación de callo en 11.11 % de las secciones de hoja (1:9), mientras que en el tallo hubo la formación de brotes en el 77.77% de los explantes (7:9) (Figura 3.1C y 3.1D), entre la segunda y tercera semana, nuevamente se apreciaron estructuras con características de embriones globulares en secciones del tallo (55.55%), pero solo en esta etapa, debido a que los cultivos se podían mantener en este medio durante dos semanas más de tiempo decidimos prolongar el mantenimiento y ver si se desarrollaban a etapas posteriores de embriogénesis, sin embargo, igual que el experimento anterior los cultivos se oxidaron, pudiendo recuperar muestra únicamente para los estudios histológicos.

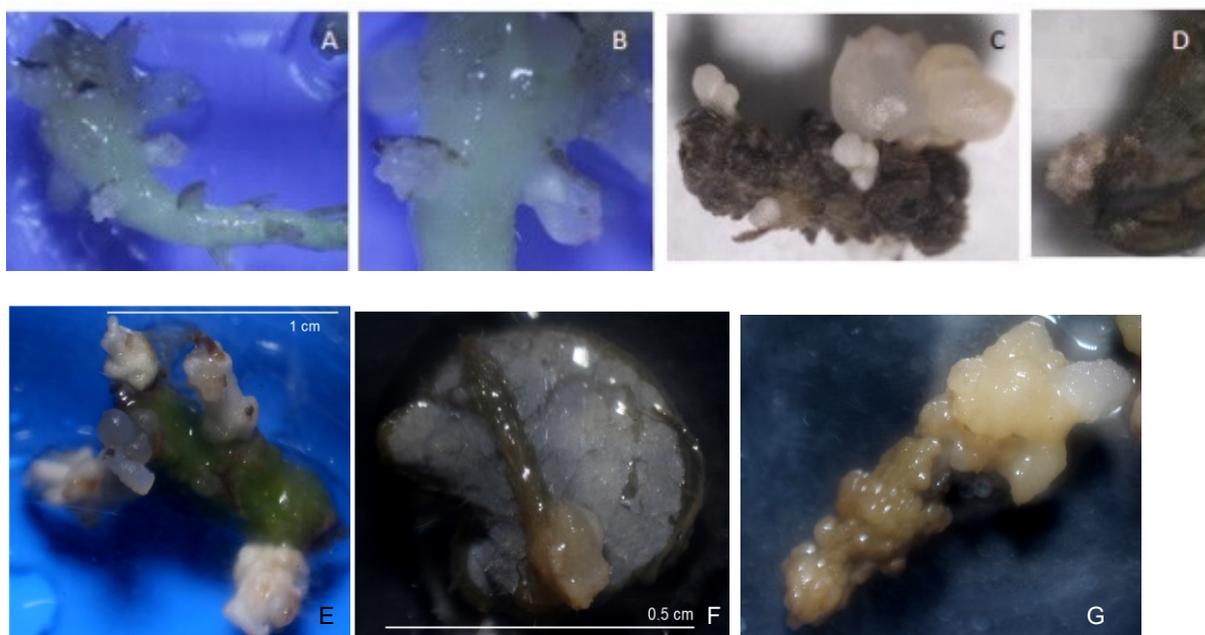


Figura 3.1. Desarrollo de embriones y brotes a partir de tallo cultivados en medio de Yasuda con ácido ascórbico. Primer experimento, A y B sección de tallo con crecimiento de estructuras embrionarias en diferentes estadios de desarrollo. Segundo ensayo, C sección de tallo oxidada con formación de brotes y embriones globulares. D, parte basal de hoja con formación de callo en la nervadura. Tercer ensayo, E explantes de tallo con formación de brotes, F formación de callo en explante de hoja, G formación de PEMs y/o callo en sección de tallo.

Posteriormente se decidió realizar un tercer experimento con el material vegetal que se tenía (plántulas de 5 meses de edad), cambiando la forma de aplicación del ácido ascórbico. Se preparó y esterilizó el medio como se indica en la parte 2.2., posteriormente se adicionó el antioxidante mediante esterilización por filtración en campana de flujo laminar y los cultivos se llevaron a las mismas condiciones que en los ensayos anteriores. Se observó una notoria

reducción de la oxidación de los cultivos, en esta ocasión se pudieron observar diferentes tipos de formaciones embrionarias, como embriones globulares, y se hizo visible la formación de masas proembriónicas (PEMs) y callo, este último no detectado anteriormente (Figura 3.1E, 3.1F y 3.1G). Se guardó muestra para los análisis histológicos, para confirmar la formación de los embriones globulares. Los cultivos se pasaron a los medios de inducción de la ES de aguacate reportados anteriormente: MSP semisólido (MS + picloram 0.41 μM) y una muestra de 3 explantes se probó en medio B5mP semisólido (composición en cuadro Anexo 2), ambos cultivos se incubaron en la oscuridad para evaluar su respuesta. Los cultivos en ambos medios desarrollaron callo en toda la estructura del explante después de 1-2 meses. Debido a lo prolongado del periodo de ESD y dificultades para la obtención de material, se ensayó la ES indirecta.

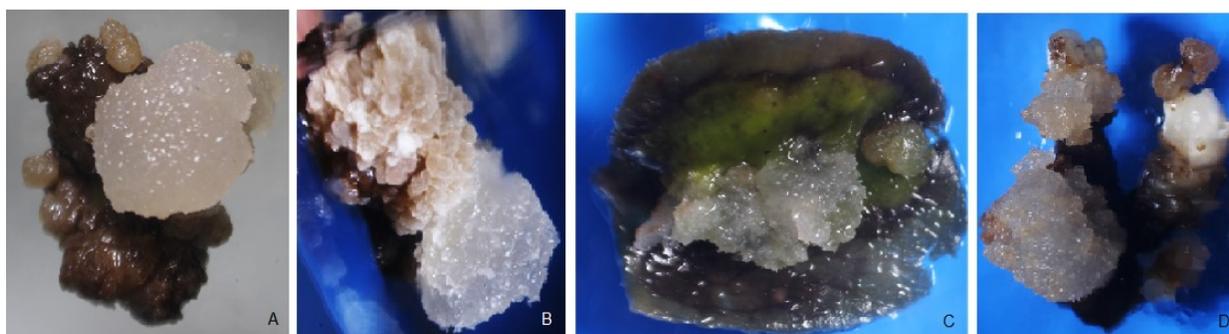


Figura 3.2. Formación de callo en diferentes medios de cultivo. Explantes de tallo y hoja provenientes de medio de inducción en medio de Yasuda líquido con BA. A y B, formación de callo friable en secciones de tallo sembrados en medio MS adicionado con picloram. C, callo formado en sección de hoja en medio semisólido B5mP. D, sección de tallo oxidado con formación de callo y brotes en medio B5mP.

A diferencia de trabajos previos utilizamos como material de inducción explantes de tallo y hoja de plántulas cultivadas *in vitro*, además se probó por primera vez la utilización de medio líquido Yasuda para la inducción de la ES en cultivos de aguacate, sabiendo que las citocininas (CKs) están relacionadas con el crecimiento celular y ayudan a la diferenciación (Konan et al., 2009) se probó la utilización de una citocinina en este caso la BA para la etapa de inducción en contraste con la utilización de auxinas que es lo que se ha empleado en la mayoría de los trabajos. Trabajos previos mencionan que una alta cantidad de CKs y auxinas estimulan la formación de brotes, mientras que un bajo contenido induce la generación de raíces y el establecimiento de meristemas en *Pisum sativum* (Kotov y Kotova, 2018). Se ha reportado además que las CKs son esenciales para mantener los niveles basales de biosíntesis de

auxinas durante el desarrollo de brotes y raíces, manteniendo una regulación homeostática entre ambos (Méndez-Hernández et al., 2019).

3.2. Análisis histológico

Se tomaron tres muestras de la sección de tallo con formación de estructuras heterogéneas como callo, brote y PEMs, las muestras fueron fijadas con solución FAA y deshidratadas en gradientes de sacarosa, posteriormente se cubrieron con medio de congelación para realizar los cortes y la tinción se realizó con azul de toluidina. En la Figura 3.3 se muestran los cortes transversales de una sección de callo.

Inicialmente fue difícil definir si la imagen observada mostraba embriones globulares de origen multicelular o bien de brotes formados por organogénesis, considerando que en la zona subepidérmica se encuentran las áreas embriogénicas y que los brotes se forman cerca del haz vascular, pero que también se pueden formar de células subepidérmicas (Lara et al., 2003). Basándonos en estos criterios, se pudieron identificar diferentes tipos de estructuras,

- ✓ Posible formación de embriones globulares y/o corazón o PEMs a partir de la zona subepidérmica del tallo (Figuras 3.3A – 3.3E). Si bien se observa lo que parece ser un embrión en estadio de corazón aun es necesario el análisis de los diferentes estadios de desarrollo de las estructuras desde su formación de globular hasta su conversión en embrión cotiledonar, para lo cual se sugiere que en experimentos futuros los cultivos se pasen a un medio de desarrollo.
- ✓ Formación de callo, identificándolo por su composición de células indiferenciadas y desorganización celular en la periferia del explante, el callo formado se pasó a medio MSP y B5mP en donde creció favorablemente. Las estructuras que más se diferenciaron en su desarrollo fueron los brotes (Figura 3.3E). El análisis histológico dio indicios de la formación de embriones somáticos globulares y/o corazón, formación de brotes, callo y PEMs mediante el tipo de corte y tinción con azul de toluidina, sin embargo, es necesario un análisis continuo más específico de las estructuras formadas durante el desarrollo de los cultivos, así como la utilización de diferentes tinciones con la finalidad de lograr identificar de forma más precisa el tipo de células presentes en los tejidos.

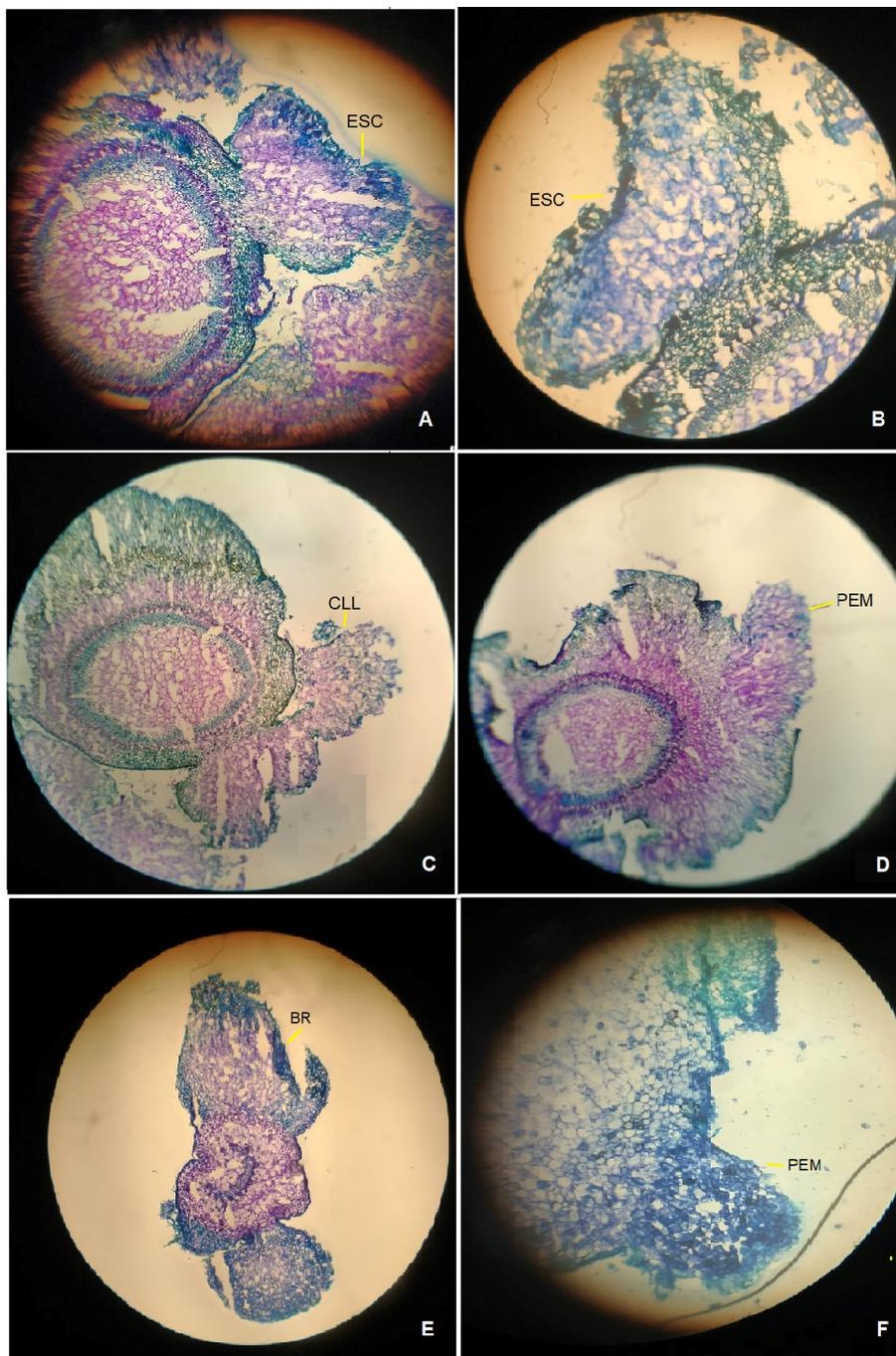


Figura 3.3. Cortes longitudinales de secciones de tallo. A y B formación de embriones somáticos en forma de corazón en la zona subepidérmica del explante, C formación de callo en zona adyacente a la ES. D y F, formación de masas proembriogénicas, E brote emergiendo de la superficie superior del tallo. Cortes de 25 μ m, objetivo 4x, tinción con azul de toluidina. Abreviaturas ESC embrión somático cotiledonar, CLL callo, PEM masa proembriogénica, BR brote.

3.3. Embriogénesis somática indirecta

3.3.1. Caracterización: prueba del inóculo

Los embriones cigóticos maduros sembrados en medio MS preparado con picloram (0.1 mg L^{-1}) para la inducción de ESI, generaron callo friable sin la formación de embriones u otros órganos.

Una parte de estos cultivos se pasaron a medio MMSE (2,4-D $1.9 \mu\text{M}$), para proliferación, sin embargo, los cultivos se oxidaron en su totalidad descartando la utilización de este medio, por lo que se decidió subcultivar el callo en el medio MS para su crecimiento, con la misma concentración de picloram ($0.41 \mu\text{M}$). Una vez que se contó con el material suficiente se procedió a realizar la prueba de inóculo para determinar qué cantidad inicial de inóculo es la mejor para realizar la caracterización del cultivo. Se tomaron fracciones de 0.5 y 1.0 g de callo, los cuales fueron sembrados en medio de cultivo con la misma composición (MSP). Cada ciclo de cultivo se muestreó por triplicado cada 7 d durante un periodo de 42 d, hasta que los callos comenzaron a presentar síntomas de muerte celular debido al agotamiento del medio. Se determinaron el peso fresco (g) y seco (mg), así como la tasa de crecimiento específico, el índice de crecimiento específico y el tiempo de duplicación.

3.3.2. Peso fresco

Se observó un mayor índice de crecimiento en los cultivos que partieron de fracciones de 1.0 g; el mayor aumento en el crecimiento del callo se observó durante la fase lineal, la cual se presentó entre el día 21 y 35 mientras que en la fracción de 0.5 g ésta se dio entre los días 28 y 42. El cultivo con un inóculo de 0.5 g registró un peso final de 12.213 g al día 42, mientras que el callo que partió de un inóculo de 1 g alcanzó un peso final de 14.426 g en el mismo tiempo (Cuadro 3.1). Para evaluar los parámetros de crecimiento se tomaron los datos de la fase exponencial entre los días 14 y 21 para el inóculo de 1 g, mientras que para el de 0.5 g se observó esta fase entre los días 21 y 28 de crecimiento (Figura 3.4). Los resultados mostraron que los callos cultivados a partir de un inóculo de 1.0 g tienen un mayor índice y velocidad de crecimiento, así como un menor tiempo de duplicación respecto al inóculo de 0.5 g.

Cuadro 3.1 Parámetros de crecimiento en peso fresco de cultivos de callo de aguacate

Parámetro/inóculo	0.5 g	1.0 g
Índice de crecimiento	1.11	2.5
Tasa de crecimiento específico	0.1	0.17
Tiempo de duplicación	6.48	3.86

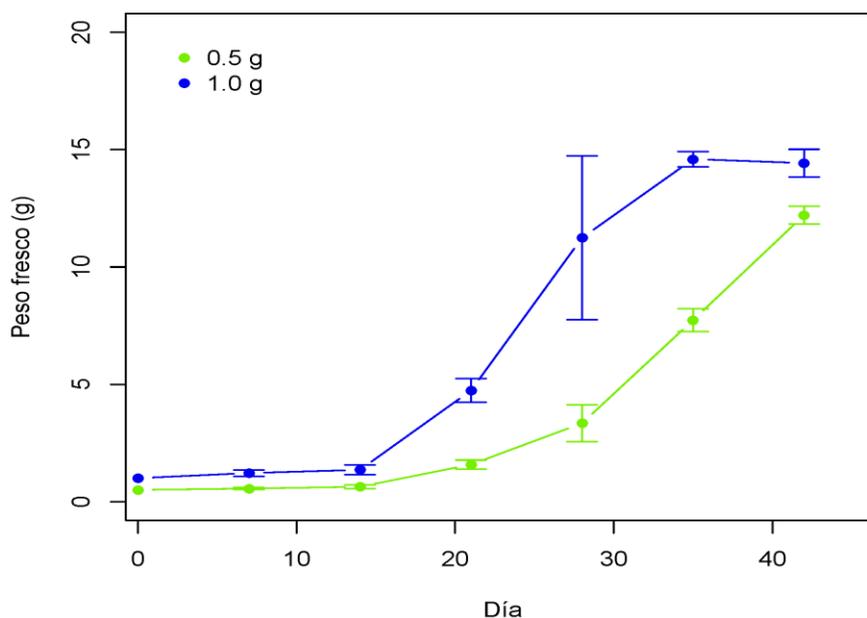


Figura 3.4. Prueba de inóculo de crecimiento en peso fresco de callo de aguacate. Determinación del peso fresco en inóculos de 0.5 y 1 g evaluados cada 7 d durante 42 días de cultivo. Los datos corresponden al promedio de tres repeticiones \pm SE.

3.3.3. Peso seco

El inóculo inicial de 0.5 g de peso fresco dio en promedio un peso seco de 13.93 mg llegando a un peso final de 349.23 mg al día 42. El inóculo inicial de 1.0 g dio 18 mg de peso seco y al día final fue de 352.03 mg. Los datos de peso seco al igual que en el caso de peso fresco indicaron que el inóculo de 1.0 g presentaba un mayor índice y tasa de crecimiento durante la fase exponencial entre los días 14 a 21. El inóculo de 0.5 g llega a la fase exponencial entre los días 28 a 42 y presentó un menor índice y velocidad de crecimiento. El tiempo de duplicación fue menor en el inóculo de 1 g (Cuadro 3.2). Después del análisis de los datos se consideró que para los fines de evaluación del crecimiento era adecuado tomar el inóculo de 1 g (Figura 3.5).

Cuadro 3.2 Parámetros de crecimiento en peso seco de cultivos de callo de aguacate

Parámetro/Inóculo	0.5 g	1.0 g
Índice de crecimiento	0.78	1.43
Tasa de crecimiento específico	0.082	0.127
Tiempo de duplicación	8.39	5.44

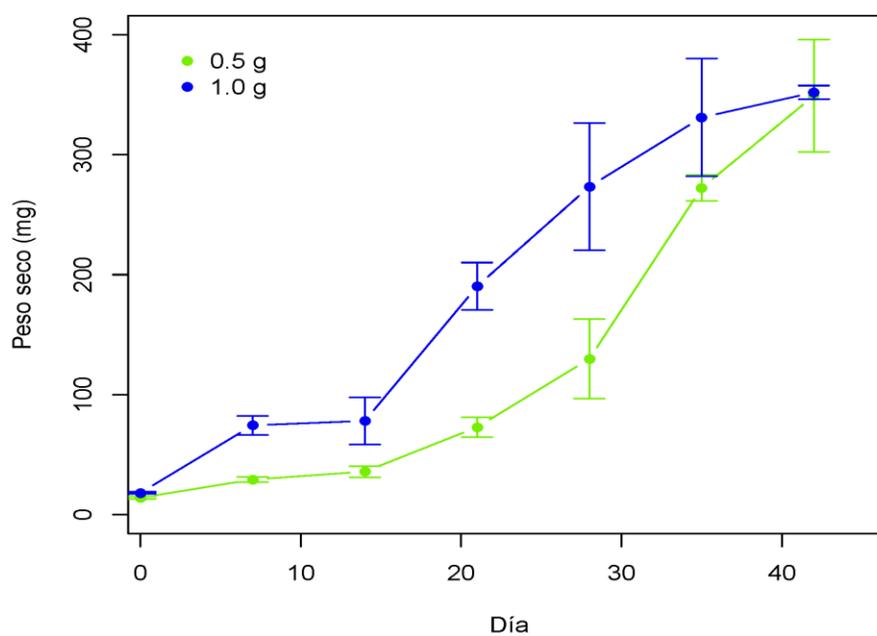


Figura 3.5. Prueba de inóculo de crecimiento en peso seco de callo de aguacate. Determinación del peso seco en inóculos de 0.5 y 1 g de peso fresco y posteriormente liofilizados; muestreo realizado cada 7 d durante 42 días de cultivo. Los datos correspondientes al promedio de tres repeticiones \pm SE.

3.4. Caracterización de crecimiento de callo de aguacate

Determinado el tamaño del inóculo de 1.0 g se procedió a realizar el ciclo de cultivo de callo de aguacate durante 42 días, las muestras se pesaron en fresco y el tiempo de muestreo se realizó cada dos días por triplicado, posteriormente las muestras fueron guardadas en congelación a -80 °C para liofilizarlas posteriormente.

3.4.1. Determinación del peso fresco

Los datos obtenidos de los muestreos realizados cada dos días fueron graficados con el programa R; el número de muestras tomadas fue de 3 - 5 para cada día. Los datos muestran una tendencia de crecimiento similar entre los muestreos (Figura 3.6). Para la evaluación de los parámetros de crecimiento se seleccionaron tres muestreos aleatorios por cada día, utilizando una tabla estadística de muestreo aleatorio. La evaluación de peso fresco indicó que la fase exponencial se presentó entre los días 16 a 26 después del inicio del cultivo, por lo que se tomó este periodo para la evaluación de los parámetros de crecimiento (Figura 3.6). En promedio se alcanzó un peso final de 13.45 g al día 42. Los parámetros de crecimiento analizados se resumen en el Cuadro 3.3 indicando un valor de índice de crecimiento de 4.03%, una tasa de crecimiento de 0.1617 g d^{-1} y un tiempo de duplicación de 4.28 d (Cuadro 3.3). De acuerdo con la tendencia observada en la curva de crecimiento se identificaron cuatro puntos diferenciales en el crecimiento del callo, que corresponden a los días 16, 22, 28 y 40. Que corresponden con las fases de retardamiento, exponencial, lineal y estacionaria del ciclo de cultivo. Estos puntos se tomaron para realizar el análisis proteómico de las etapas de crecimiento (Figura 3.7).

A

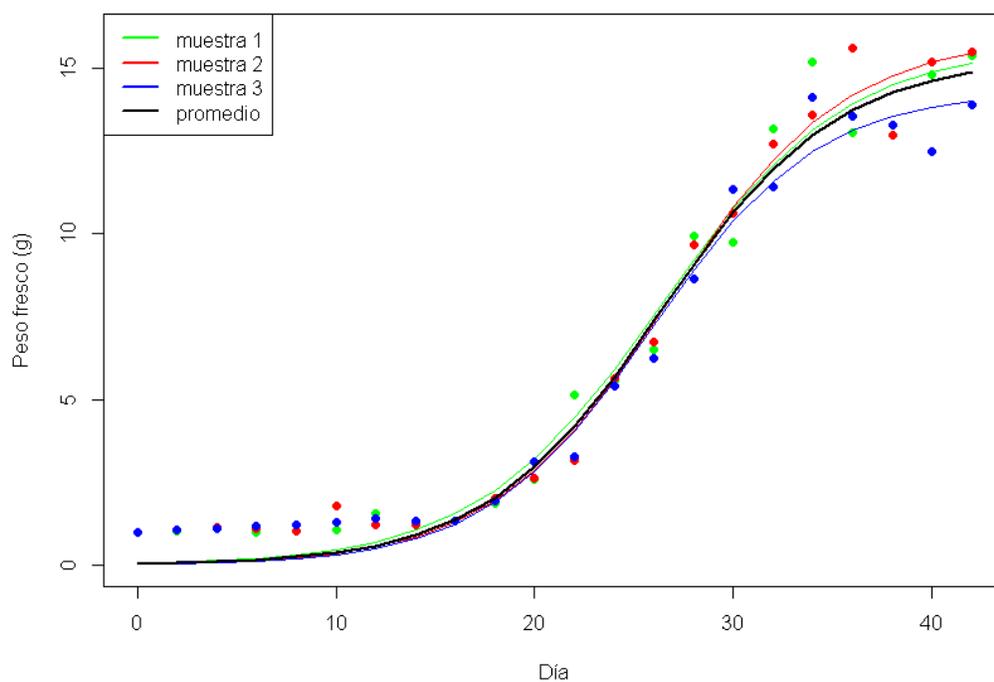
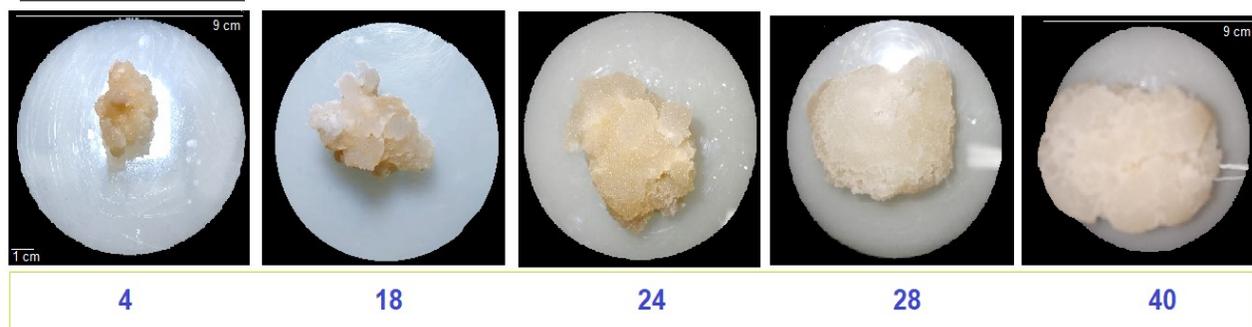


Figura 3.6. Tendencia de crecimiento de callo de aguacate análisis de peso fresco de datos totales. A) Crecimiento de los callos de aguacate en los días de muestreo correspondientes a 4, 18, 24, 28 y 40 días. B) Gráfica de tendencia del crecimiento de callo de las diferentes muestras, las líneas de colores corresponden al número de muestra tomada (de 3-5 muestras) cada 2 días (puntos verde, rojo y azul) durante 42 días de cultivo, línea negra indica el promedio de las muestras analizadas.

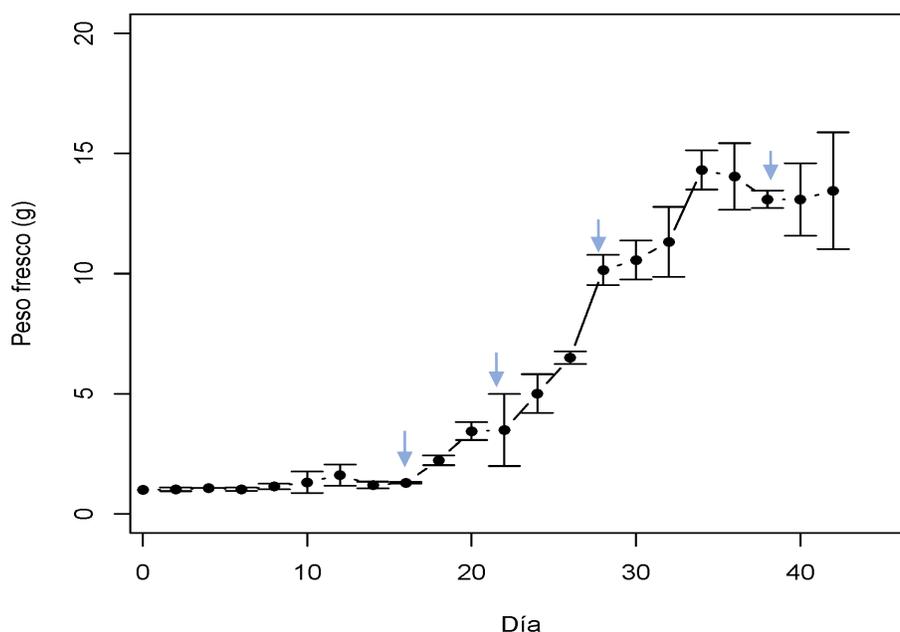


Figura 3.7. Curva de crecimiento en peso fresco del callo de aguacate. Promedio del crecimiento, muestreo del peso fresco realizado cada 2 días durante un periodo de 42 d. Las flechas azules señalan los puntos de crecimiento diferenciales que se refiere a las diferentes etapas de la curva de crecimiento. Los puntos señalados corresponden a los días 16, 22, 28 y 40, estos puntos fueron tomados posteriormente para el análisis proteómico. Datos corresponden al promedio de tres repeticiones \pm SE.

Cuadro 3.3. Valores de parámetros de crecimiento de callo de aguacate en peso fresco y peso seco.

Parámetro /muestra	Peso fresco	Peso seco
Índice de crecimiento	4.03	2.73
Tasa de crecimiento específico	0.1617	0.1380
Tiempo de duplicación	4.28	5.25

3.4.2 Determinación del peso seco

Las muestras tomadas cada dos días por triplicado fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ posteriormente se liofilizaron y los datos de peso seco fueron registrados y analizados (Figura 3.8). El análisis mostró una tendencia similar a los datos en peso fresco con un crecimiento uniforme entre los muestreos realizados y las fases del ciclo de cultivo coincidían en tiempos con lo mostrado en datos de peso fresco.

La evaluación del peso seco indicó que la fase exponencial se presentó entre los días 16 a 26 después del cultivo, por lo que se tomó este periodo para la evaluación de los parámetros de crecimiento (Figura 3.9). En promedio se comenzó con un peso de 19.16 mg y el día 42 de muestreo alcanzó un peso promedio de 311.5 mg. Los parámetros de crecimiento se resumen en el Cuadro 3.3 indicando un valor de índice de crecimiento de 2.73, velocidad de crecimiento de 0.1318 g d^{-1} y un tiempo de duplicación de 5.25 d.

De acuerdo con la tendencia observada en la curva de crecimiento se identificaron cuatro puntos diferenciales en el crecimiento del callo, que corresponden a los días 16, 22, 28 y 40. Estos puntos se tomaron para realizar el análisis proteómico de las etapas de crecimiento

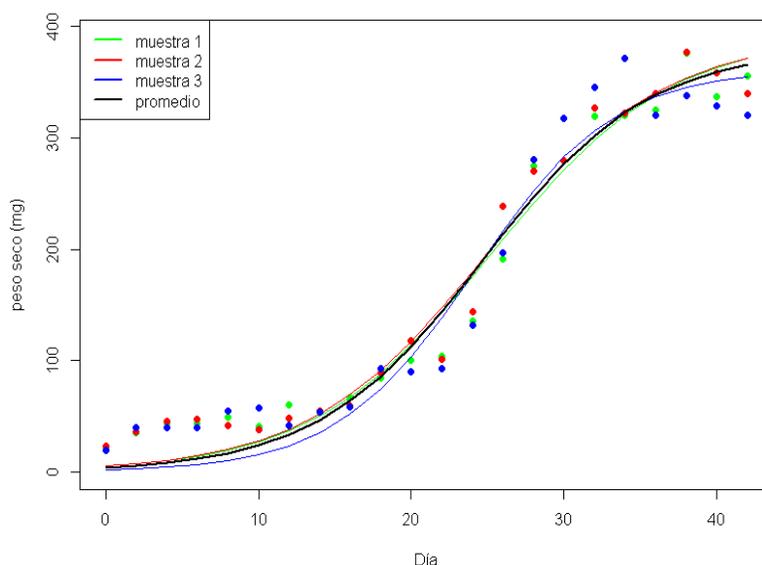


Figura 3.8. Tendencia de crecimiento en peso seco del callo de aguacate. Las líneas de colores corresponden al número de muestra tomada cada dos días (puntos verde, rojo y azul) durante 42 días de cultivo, la línea negra indica el promedio de las muestras analizadas.

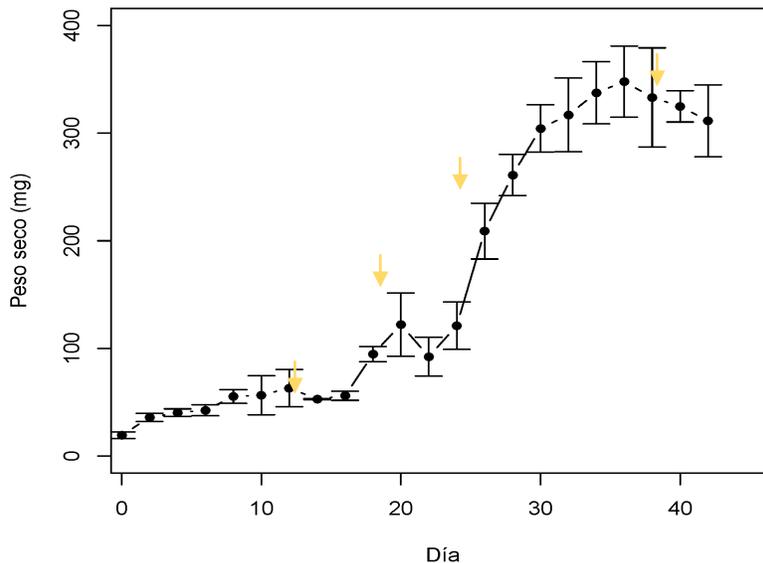


Figura 3.9. Curva de crecimiento midiendo el peso seco de los callos de aguacate. Promedio del crecimiento, muestreo del peso seco realizado cada dos días durante un periodo de 42 d. Las flechas amarillas señalan los puntos de crecimiento diferenciales que se refiere a las diferentes etapas de la curva de crecimiento. Los puntos señalados corresponden a los días 16, 22, 28 y 40, estos puntos fueron tomados posteriormente para el análisis proteómico. Los datos corresponden al promedio de tres repeticiones \pm SE.

3.5 Discusión de los resultados del cultivo de tejidos de aguacate.

Hasta ahora solo se había intentado inducir embriogénesis con tejido de frutos inmaduros de aguacate, utilizando auxinas como RC y un medio semisólido. En el presente trabajo utilizamos embriones cigóticos de frutos maduros, teniendo en cuenta que la diferenciación de callo embriogénico también depende del tipo de explante y de su estadio fisiológico, atribuimos parte de los obstáculos en la formación de embriones a este hecho. Ya que estudios previos han mostrado que el tamaño óptimo de respuesta embriogénica de los embriones inmaduros es de 0.6 a 0.08 mm y aproximadamente 21 a 28 días después de la polinización (Pliego-Alfaro y Murashige, 1988).

Anteriormente se había reportado que el medio óptimo de inducción de para la ES en aguacate era el medio con las sales mayores del medio B₅ debido a que se obtenía una mejor respuesta (Witjaksono y Litz, 1999a). En nuestro laboratorio se probaron diferentes medios de inducción mostrando respuestas negativas de desarrollo, siendo el medio MS con picloram 0.41 μ M el único que daba callo, lo que podía ser la vía más viable para el desarrollo de embriones. En el

presente trabajo analizamos el crecimiento del callo formado a partir de embriones cigóticos de frutos maduros de aguacate, sembrados en medio de inducción con auxina (picloram 0.41 μM) durante un ciclo de cultivo de 42 días. Inicialmente el callo obtenido se transfirió a medio de inducción de la ES para mango MMSE 1.9 mM (Pateña et al., 2002), el cual había sido reportado por Witjaksono y Litz (1999b) en donde se menciona que es adecuado para el mantenimiento y proliferación de masas proembriogénicas y embriones somáticos en aguacate. Sin embargo, el efecto de este medio de cultivo tanto semisólido como líquido, no favoreció el desarrollo de los cultivos, ocasionando su oxidación y muerte. Por lo que decidimos realizar el análisis de crecimiento en medio MS con picloram. En los resultados mostrados un inóculo de menor tamaño permite la evaluación del ciclo de crecimiento de forma más detallada, debido a su lento crecimiento, lo que permite evaluar las diferentes fases del crecimiento durante un tiempo prolongado, además de que un inóculo pequeño puede favorecer el desarrollo de los embriones.

En el presente trabajo decidimos utilizar el inóculo de un g debido a que en peso seco se determinó que el contenido de agua equivalía a más del 90%, reduciendo la cantidad de tejido seco disponible para los ensayos proteómicos. El análisis mostró elevados índices y tasas de crecimiento con el inóculo de un g de peso fresco, alcanzando un peso final de hasta 15 g, valores superiores a otros datos reportados de crecimiento de callo en aguacate. Si bien la respuesta de los embriones cigóticos fue diferente a lo reportado en trabajos anteriores respecto a la respuesta al medio de cultivo para la inducción y proliferación, cabe señalar que nuestro material de partida fue tomado de frutos maduros de aguacate "Hass" comercial y no de frutos maduros de árboles monitoreados en fructificación, por lo que atribuimos que esta respuesta puede ser derivada de esta diferencia en el material utilizado. Se sabe que, durante el crecimiento del cultivo, la proteína, el ARN y los contenidos de ADN puede no mostrar la misma correlación con el peso seco, los cuales se atribuyen a cambios en la fisiología celular a lo largo del ciclo de crecimiento, lo que puede resultar en amplias variaciones (Godoy-Hernández y Vázquez-Flota, 2006).

Para lograr la obtención y germinación de embriones somáticos viables, se necesita la exposición a diferentes concentraciones de los reguladores de crecimiento ya sean auxinas y/o citocininas (Ardiyani et al., 2020). Dependiendo del regulador de crecimiento en el medio será el tipo de callo formado en la vía indirecta, así como la multiplicación y frecuencia de embriones somáticos. Yang y Zhang (2010) mencionan que las auxinas son necesarias para la proliferación de las de masas proembriogénicas (siglas en inglés PEMs), pero inhiben el

desarrollo de los embriones somáticos; además la aplicación de auxina exógena al medio de cultivo puede desequilibrar el contenido de auxina endógena y modificar el metabolismo del AIA en el interior de la célula, el incremento de auxina endógena es necesario para cambiar el programa genético de las células preparándolas para la fase de inducción; aunado a esto se ha observado que en la mayoría de los cultivos la eliminación de la auxina exógena del medio de cultivo promueve la formación de estructuras embriogénicas (Nic-Can y Loyola-Vargas, 2016). Ayil- Gutiérrez et al., (2013), mencionan que la presencia de la auxina exógena aumenta el AIA libre, así como de los conjugados amida del AIA durante el período de preincubación en cultivos embriogénicos de *Coffea canephora*. Atribuyendo el aumento a la síntesis *de novo*.

CAPÍTULO IV

4. ANÁLISIS PROTEÓMICO

4.1 Establecimiento y estandarización de las condiciones para la extracción de las proteínas y su separación electroforética.

La extracción de proteínas de plantas es difícil. Esta dificultad se debe a la elevada concentración de taninos y fenoles presentes en los tejidos vegetales, sobre todo en los tejidos fotosintéticos. También la gran concentración de proteasas dificulta la extracción de proteínas, sobre todo si el extracto proteico se va a utilizar para análisis proteómicos. Por ello, la primera tarea para esta parte del proyecto fue estandarizar un protocolo de extracción de proteínas de los tejidos de aguacate que fuera confiable y repetitivo.

Se realizaron los ensayos de extracción de proteína mediante el método del TCA/acetona, comenzando con muestras aleatorias de tejido fresco (200 mg) de callo, las cuales mostraban un perfil de proteínas similar colocando diferentes volúmenes de 10, 15 y 20 μ l del extracto (Figuras 4.1A y 4.1B). Sin embargo, al medir la concentración de proteínas los valores obtenidos no permitían calcular con precisión la cantidad de proteína extraída. También se notó que los perfiles de proteínas no variaban de acuerdo con la cantidad de proteína. Por lo anterior se consideró que, dado que se estaba partiendo de tejido fresco, que podría contener diferentes cantidades de agua, optar por realizar la extracción de tejido de callo liofilizado. Para ello se liofilizó el tejido de callo y se determinó que un gramo de material fresco equivale a 20 - 40 mg de peso seco. Con ello se logró cuantificar la proteína y los perfiles electroforéticos en geles SDS- PAGE de las proteínas extraídas ya mostraron perfiles similares (Figura 4.1C). Cuando se aumentó el tamaño de la muestra a 120 y 180 mg de peso seco los perfiles electroforéticos en SDS-PAGE mejoraron de manera importante, ya que se pudieron ver bandas de proteínas que con concentraciones más bajas no se podían observar (Figura 4.1D 4.1E).

La pastilla obtenida no era homogénea, indicando que todavía tenía contaminantes, particularmente carbohidratos ya que se formaban un tipo de hebra, por lo que se procedió a nuevos ensayos. Se cambió a utilizar un homogeneizador eléctrico de tejidos para lograr que el tejido se disgregara en el amortiguador de extracción. También se introdujo un aumento de la concentración de CHAPS al 4% (originalmente 1.5%) en el amortiguador de rehidratación con la finalidad de disolver cualquier partícula que quedara resuspendida para que no interfiriera en el enfoque. Debido a que los cambios indicados no produjeron los resultados esperados para

conseguir un extracto limpio por completo, se optó por probar un segundo método para la extracción de las proteínas, el método de extracción de proteínas con fenol (Wang et al., 2016; Wu et al., 2014 b). Este método nos permitió obtener una pastilla de proteínas limpia y su perfil electroforético en geles SDS- PAGE fue el mejor de todos los obtenidos (Figura 4.1F).

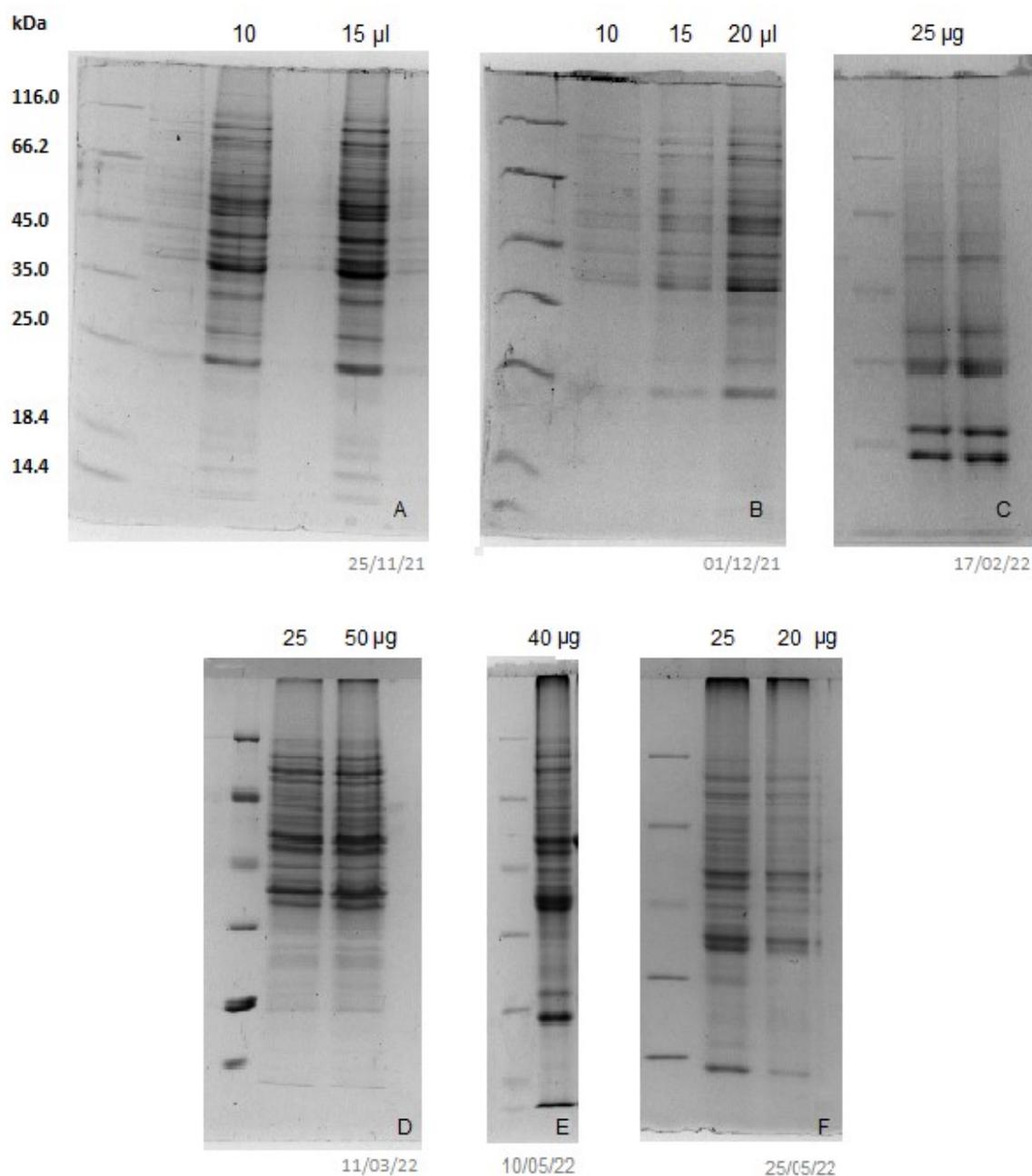


Figura 4.1. Separación electroforética de extractos de proteína de cultivos *in vitro* de aguacate, obtenidos por el método de TCA/acetona y fenol. A y B extracción

mediante la técnica TCA/acetona a partir de 200 mg de PF (peso fresco) de callo en muestras aleatorias, colocando 10, 15 y 20 μL , C extracción TCA/acetona a partir de 1 g de PF de material liofilizado, 25 μg de proteína en gel, D muestra de día 32 utilizando material liofilizado a partir de 4 g de PF (180 mg de PS) colocando 25 y 50 μg en cada carril, E método de extracción fenólica 4 g de PF muestra liofilizada día 24 , 40 μg de proteína en gel y F extracción fenólica de muestra liofilizada de 4 g PF días 20 y 36 de muestreo colocando 25 y 20 μg de proteína respectivamente en 10 μL de muestra.

Se procedió a realizar el análisis de doble dimensión, evaluando los dos métodos de extracción, utilizando las muestras liofilizadas de los días 40 y 28 de 5 g de PF. De la muestra del día 40 se realizó la extracción por el método del fenol de todo el tejido, mientras que para la muestra del día 28 el extracto crudo se dividió en dos partes, probando cada método fenol y TCA/acetona. En el gel SDS- PAGE los resultados del perfil corroboraron que efectivamente la extracción separando la muestra con fenol y precipitando con acetato de amonio, daba un bandeo más marcado que el método de TCA/acetona, por lo que se procedió a realizar el análisis en doble dimensión únicamente de la muestra del día 40 extraída por el método del fenol colocando en la tira 1800 μg de proteína (Figura 4.2).

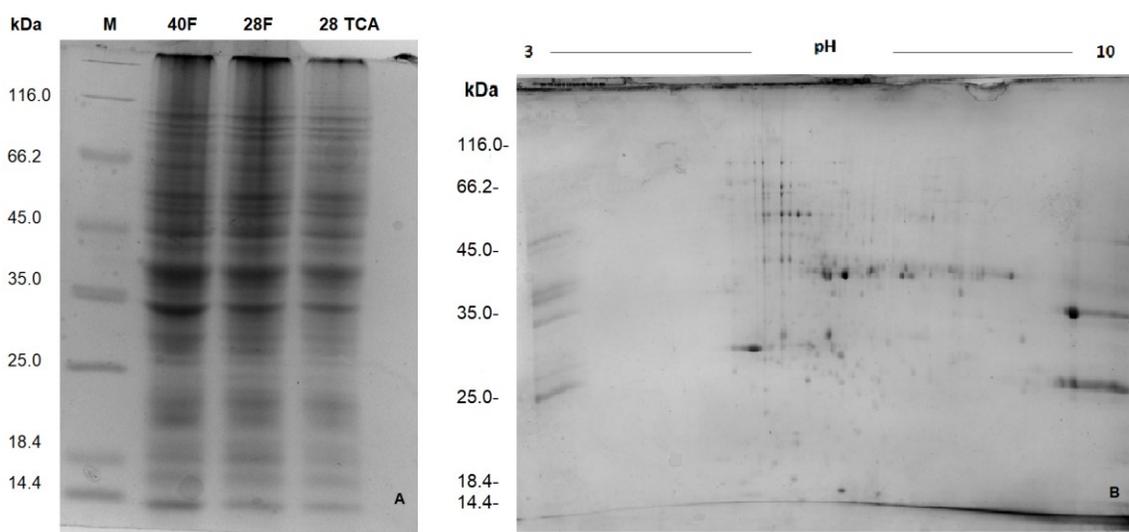


Figura 4.2. A, Comparación del perfil de proteínas con diferente método de extracción. Carril 1, método del fenol extracción de 4 g de PF día 40; carril 2, método del fenol mitad de muestra de tejido (2 g) día 28; carril 3, método de TCA/acetona con 2 g de tejido de tejido día 28. B Gel de segunda dimensión método de extracción con fenol día 40.

4.2. Cuantificación de proteína

Seleccionados los días de muestreo del ciclo de cultivo y el método de extracción de proteína, se continuó con el análisis proteómico en electroforesis en doble dimensión de los puntos marcados correspondientes a los días 16, 21, 28 y 40. Se cuantificó la cantidad de proteína de los callos, utilizando el método de Peterson. La cantidad promedio de proteína en el día 16 fue de $6.22 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ mientras que para los días 21 y 28 fue de 7.56 y $6.85 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ respectivamente, finalmente en el día 40 se tuvieron $6.16 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ (Figura 4.3). Estos datos sugieren que el aumento en la concentración de proteína durante los días de mayor crecimiento, podría ser un factor determinante para el inicio durante estas etapas de cultivos o suspensiones celulares con potencial embriogénico, el cual puede estar enlazado a la presencia de diferentes proteínas presentes en la etapa, sin embargo, el análisis estadístico no mostró diferencias significativa en la cuantificación de proteína extraída de los cuatro días analizados.

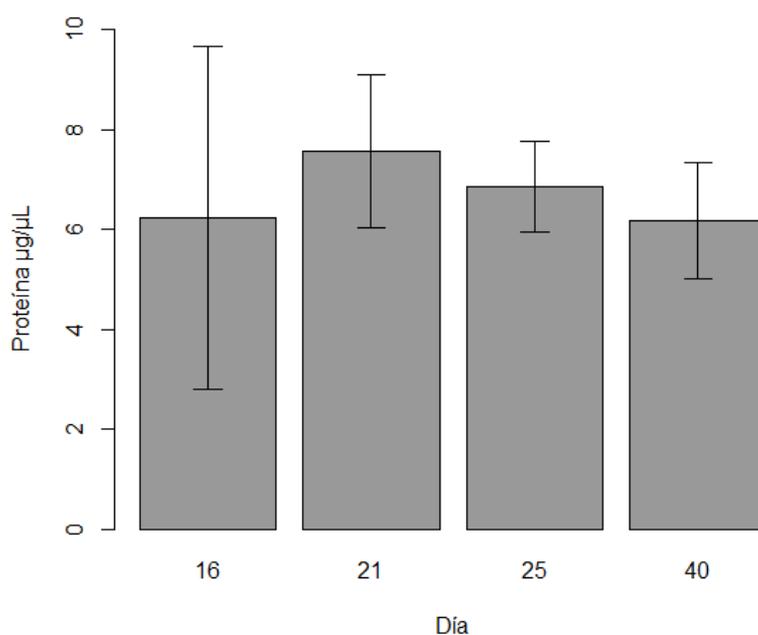


Figura 4.3. Cuantificación de proteína en las diferentes fases de crecimiento de callo de aguacate en medio de proliferación. Se muestrearon los días 16, 21, 28 y 40 del ciclo de cultivo para la determinación de la cantidad de proteína. Las barras indican el promedio de proteína extraída en $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ de dos replicas en los días 16 y 40 y de tres en os en los días 21 y 28 \pm SE.

La Figura 4.4 se muestra la separación del extracto por SDS-PAGE, correspondientes a la segunda y cuarta extracción de proteína cargando en todos los carriles 50 y 30 μg de proteína

para la figura A y B respectivamente, en donde se aprecia mayor cantidad de proteína en el día 21 en la segunda extracción, contrario a lo observado en la cuarta extracción (Figura 4.4).

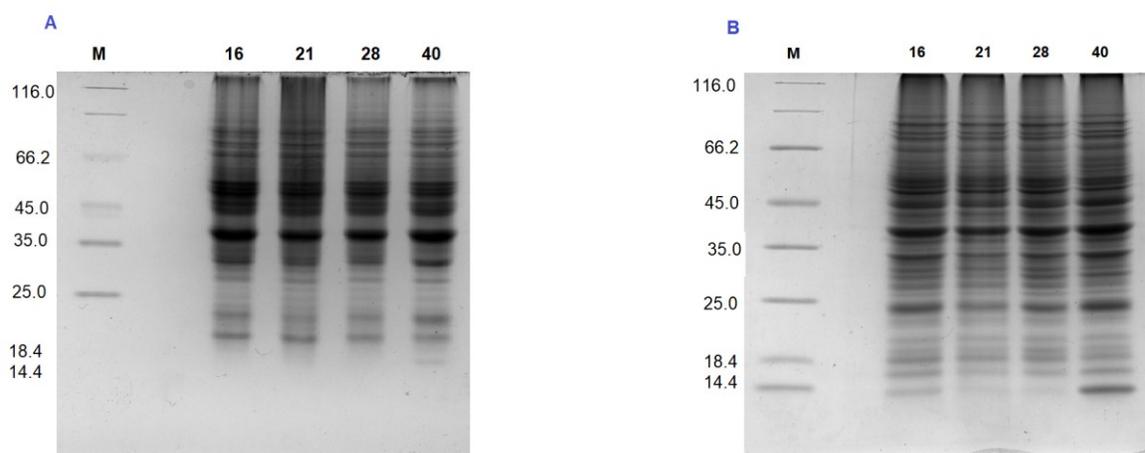


Figura 4.4. Geles de una dimensión de proteínas presentes en callo de *P. americana*. Extracciones de 16, 21, 28 y 40 días de crecimiento en el medio de proliferación. La electroforesis en gel SDS-PAGE para la proteína de la segunda extracción se realizó cargando 50 μg de proteína de cada muestra por carril. B para la proteína de la cuarta extracción, se colocaron 30 μg de proteína.

4.3. Análisis electroforético de proteínas presentes en callo de *P. americana* en medio de proliferación

Se prepararon extractos de proteínas de los cuatro puntos de muestreo (16, 21, 28 y 40 días de cultivo) y se resolvieron 1100 μg de proteínas en los geles de doble dimensión (experimento 1 y 2). Esta cantidad de proteína resultó en pocas manchas por lo que se optó por aumentar la cantidad de proteína a 2000 μg en los siguientes análisis (experimento 3 y 4) y en caso de faltar muestra se completó con las muestras obtenidas en la extracción previa. La extracción de proteína se realizó de tejido liofilizado de callo de aguacate (5 g PF), de los días 16, 21, 28 y 40 del ciclo de cultivo. Posteriormente se prepararon las tiras de electroenfoque con gradiente de pH de 3-10, en cada una de las tiras se colocaron 2 mg de proteína, de acuerdo con la concentración estimada por el método de Peterson y a la cantidad requerida para la tinción con azul de Coomassie. Posteriormente la tira se colocó sobre un gel de acrilamida al 12.5% para llevar a cabo la segunda separación de acuerdo con su masa molecular, utilizando marcadores de 14.5 a 116.0 kDa. Los geles fueron teñidos con Azul de Coomassie y lavados. Los geles se digitalizaron y las imágenes fueron procesadas para su análisis con el software Melani.

En el análisis digital de las imágenes de geles, se utilizó el diseño experimental de un factor y se agruparon por columnas los geles de cada punto, la alineación se realizó de forma semiautomática con un ancho de banda de 5. Al obtener las imágenes se vio que los geles del mismo día variaban en cierto punto y al no contar con una tercera replica, se dificultaba procesar los datos debido a la variación entre los dos geles de cada experimento (Figuras 4.5 y 4.6). Por lo que para continuar con el análisis se seleccionó un conjunto de proteínas representativas presentes de los ocho geles (cuatro geles de cada experimento 3er y 4to correspondientes a los días 16, 21, 28 y 40) dependiendo de cada muestra, ya fuera que estuviera presente o ausente en uno de los dos geles por punto y se procedió a analizar el volumen de las (manchas) proteínas seleccionadas (Figuras S1 y S2).

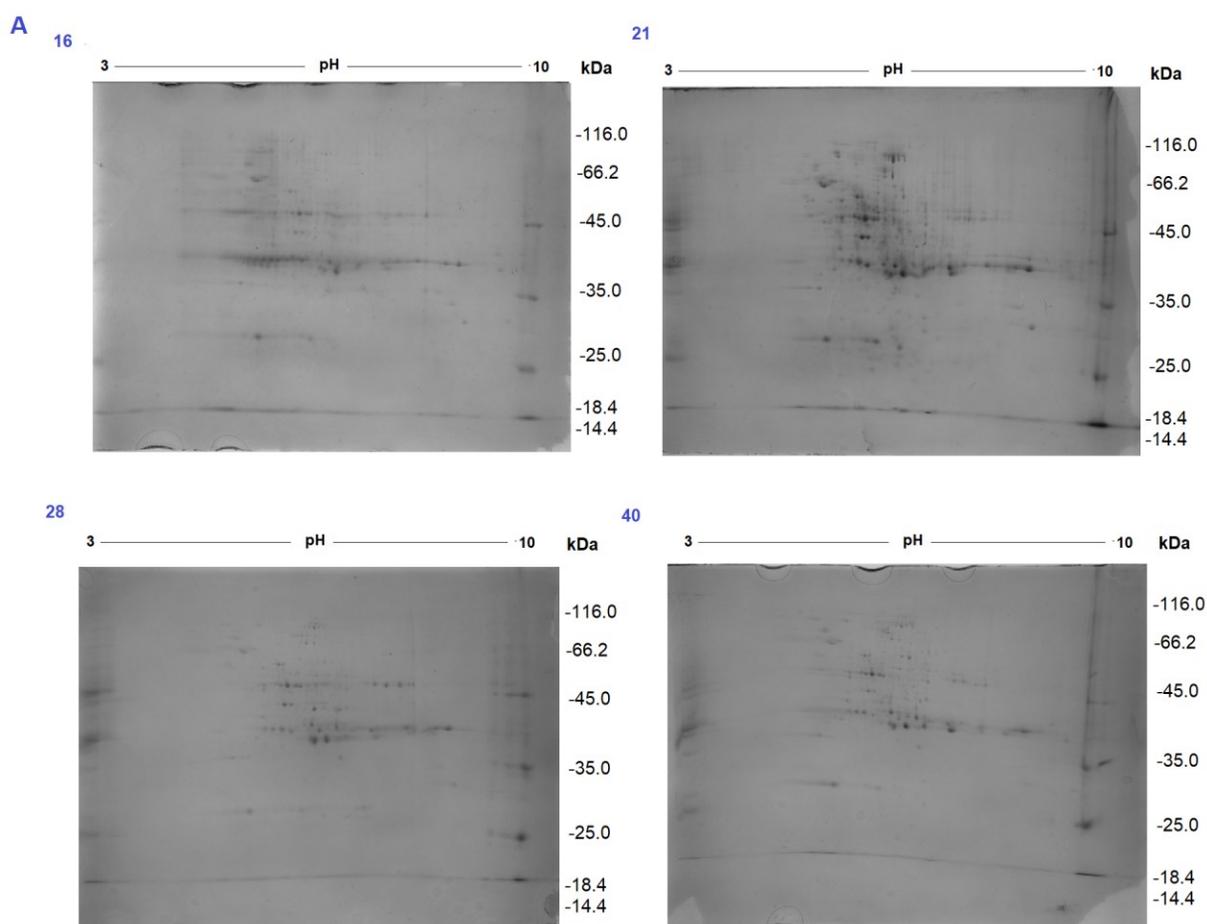


Figura 4.5. Comparación de los patrones electroforéticos en geles de poliacrilamida en doble dimensión. Tercer experimento. A) Se corrieron las proteínas del tercer experimento. Las muestras se obtuvieron de diferentes fases de crecimiento de callo de aguacate en medio de proliferación a los 16, 21, 28 y 40 días de cultivo. Los geles fueron preparados con 2 mg de proteína y teñidos con azul de Coomassie.

Se identificaron 97 proteínas; de éstas 97 proteínas se seleccionaron 69 (Figuras 4.7 y 4.8) y posteriormente se eligieron de 48 a 57 marcadores dependiendo de cada muestra punto para la normalización de acuerdo con su volumen medio (Cuadro 4.1). La normalización se realiza para mejorar el contraste de las proteínas basado en un histograma para realizar la normalización de la imagen.

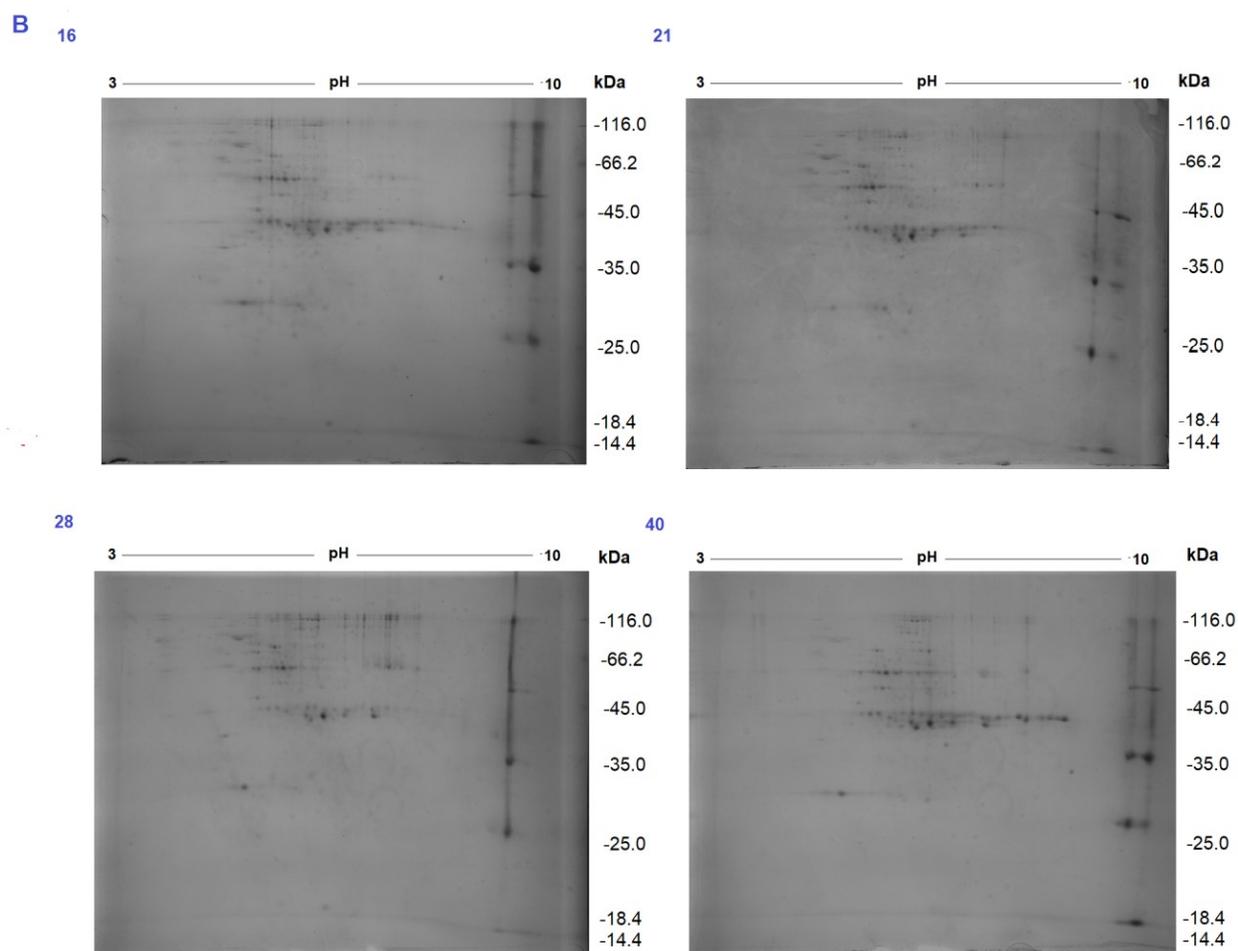


Figura 4.6. Comparación de los patrones electroforéticos en geles de poliacrilamida en segunda dimensión. Cuarto experimento. B) Se corrieron las proteínas del cuarto experimento. Las muestras se obtuvieron de diferentes fases de crecimiento de callo de aguacate en medio de proliferación a los 16, 21, 28 y 40 días de cultivo. Los geles fueron preparados con 2 mg de proteína y teñidos con azul de Coomassie.

Cuadro 4.1. Número de marcadores seleccionados de cada punto para la normalización

No. Experimento	Número de marcadores para normalización			
	Día de muestreo			
	16	21	28	40
3	56	56	56	57
4	56	48	56	57

4.4 Proteínas diferenciales en los diferentes días de cultivo de callo de aguacate.

Los puntos seleccionados para el análisis se encontraban en el rango de pH de 4.00617 a 8.56051 con una masa molecular de entre 26 y 121 kDa. Cada proteína se caracteriza por su posición en la imagen del gel de doble dimensión, así como por su tamaño e intensidad. Después de la normalización, se obtuvieron los valores de volumen para cada una de las proteínas seleccionadas para el análisis. Posteriormente los datos se filtraron de acuerdo con su ANOVA, especificando un grado de error ≤ 0.05 y veces de cambio ≥ 1 (Cuadro S3). El programa seleccionó de acuerdo con los criterios especificados únicamente 8 proteínas diferenciales para el análisis, que correspondían a las proteínas etiquetadas como 5, 9, 25, 39, 40, 48, 49 y 67 (Cuadro 4.2), estas proteínas se encontraban en los rangos de pH de 4.03 a 6.9 y con masa molecular de 35 a 53 kDa. En las figuras 4.7 y 4.8 se puede observar la localización de las proteínas diferenciales encontradas en los geles del experimento 4 y en las Figuras S1 y S2 se presentan todas las imágenes obtenidas.

Cuadro 4.2. Lista de proteínas diferencialmente detectadas durante el crecimiento de callo de aguacate. Proteínas con volumen diferencial de acuerdo con ANOVA ≤ 0.05 y veces de cambio ≥ 1 en los diferentes puntos de muestreo con el punto isoeléctrico (pI) y masa molecular (MM) correspondiente. Los valores para cada punto representan el volumen de las proteínas analizadas, las sombreadas con gris ligero son las de menor volumen y las sombreadas en gris oscuro son las que tenían mayor volumen. El ID corresponde al número de identificación asignado por el programa para cada uno de los puntos.

ID	d 16	d 21	d 28	d 40	pI	MM
5	1780020	1509738	1850888	2964611	6.07595	35
9	2174680	2028496	1440302	1155554	6.05063	38
25	2613685	1806173	1459830	2087030	6.41139	42
39	813301	1109095	874471	1236943	5.13836	43
40	387793	345591	468570	595685	4.03086	43
48	1086861	1629922	2147903	689175	6.93038	53
49	1764299	1864206	3035414	1267672	5.35849	51
67	843958	952025	843200	1386016	6.40506	63

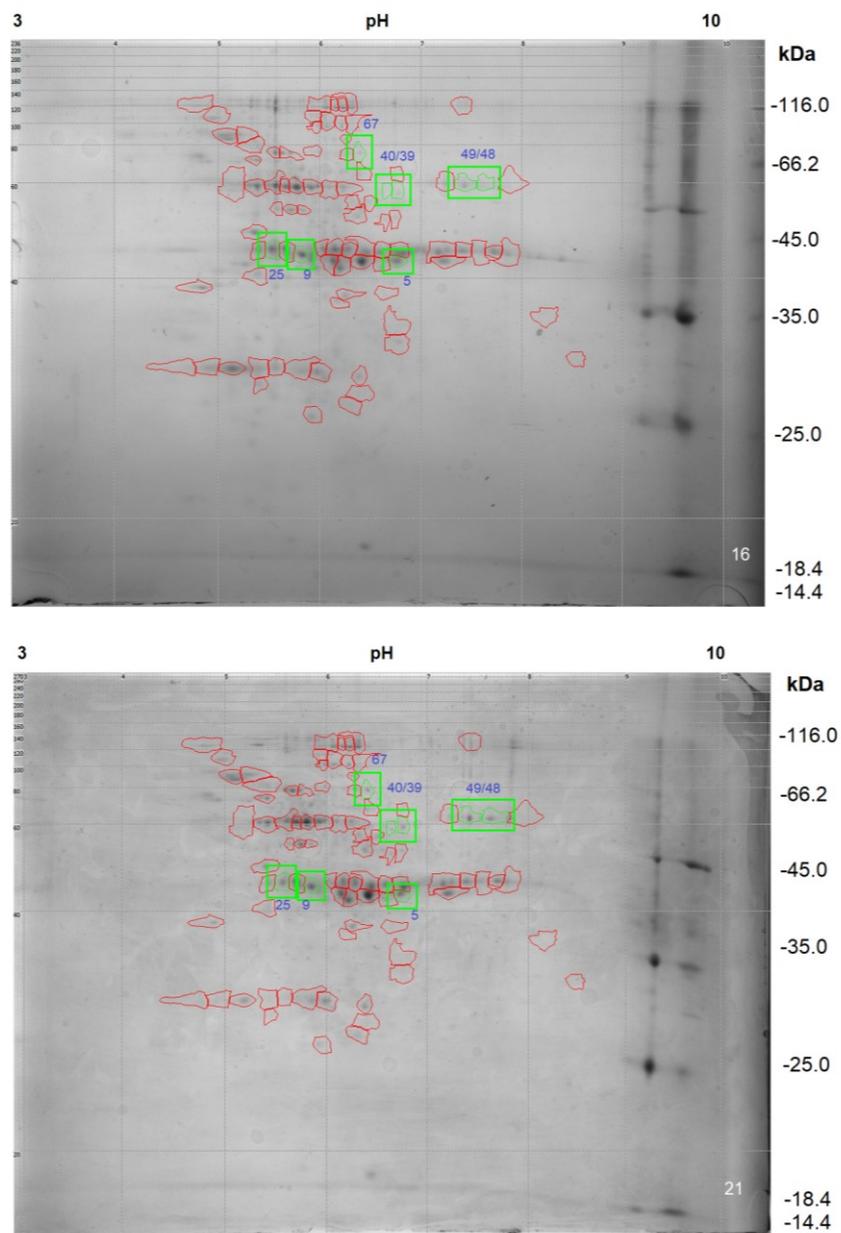


Figura 4.7. Análisis comparativo de las proteínas diferenciales en los días 16 y 21 de los cultivos de callo de *Persea americana*. Los recuadros verdes señalan las proteínas diferenciales derivadas de ANOVA, en azul se muestra el número de la proteína. Los puntos encerrados en rojo son las proteínas analizadas

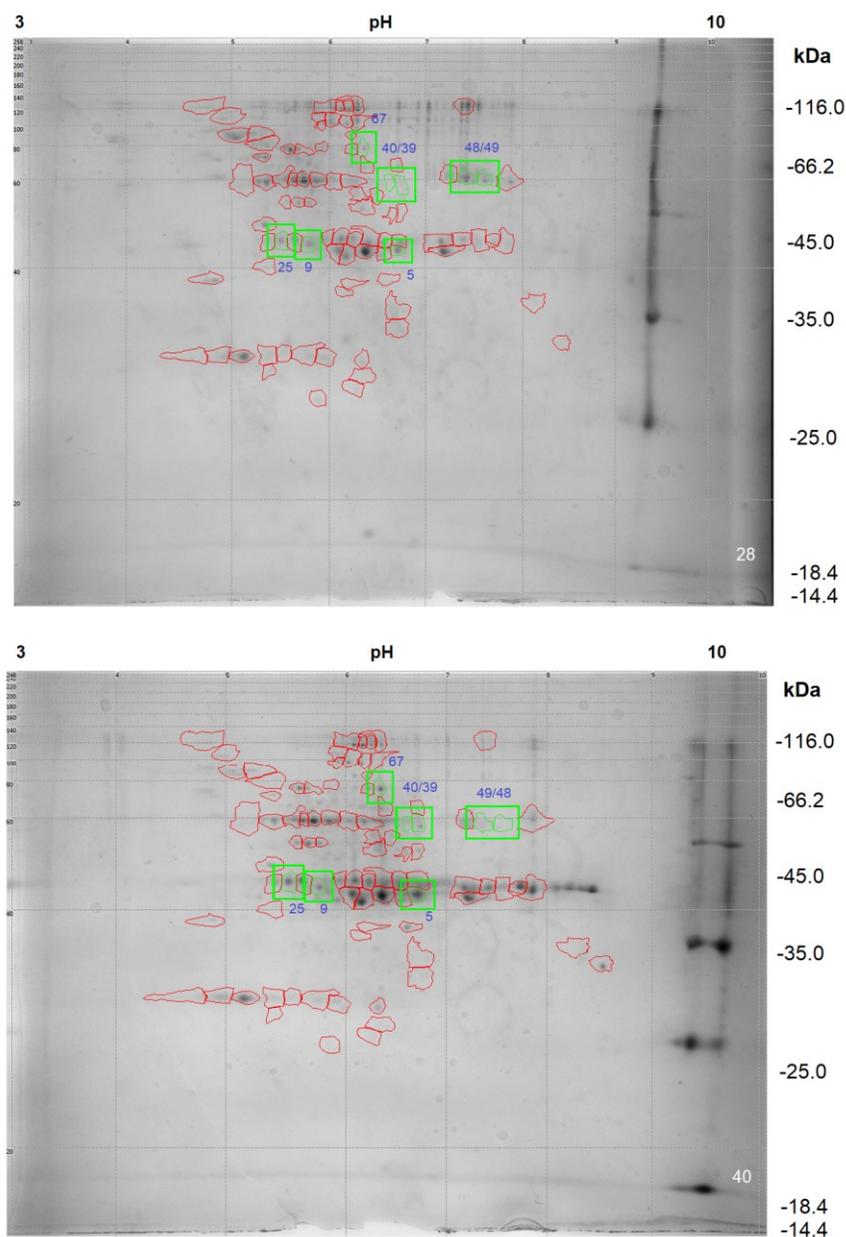


Figura 4.8. Análisis comparativo de las proteínas diferenciales en los días 28 y 40 de cultivo de callo de *Persea americana*. Los recuadros verdes señalan las proteínas diferenciales derivadas de ANOVA, en azul se muestra el número de la proteína. Los puntos encerrados en rojo son las proteínas analizadas

Se obtuvo el volumen de cada uno de los puntos seleccionados para el análisis, en el presente trabajo solo se muestran los gráficos de los puntos diferenciales. De forma general se vio un

aumento en volumen ($6.5e5$) de la proteína 40 en todos los días evaluados respecto a las otras proteínas, mientras que los puntos 39 y 67 con volumen de $1.4e5$ y $1.6e5$ son los que presentaron menor volumen en relación con los otros puntos. El resto de las proteínas se mantuvieron en valores de entre $2.4e5$ y $3.4e5$. (Figuras 4.9, 4.10, 4.11 y 4.12). Los gráficos mostraron que durante la fase de retardamiento hay un aumento en el volumen de los puntos 9 y 25, respecto a este punto los otros puntos bajan su abundancia en esta etapa, Para el día 16 que marcamos como inicio de la fase exponencial se encontró un aumento para la proteína 9; también hubo un aumento de la proteína 48 en los días 16 y 40. La proteína 39 fue más abundante en los días 16 y 28. En los mismos días las proteínas 5 y 40 fueron las menos abundantes. Para la fase lineal correspondiente al día 28 hubo un aumento en las proteínas 40, 48 y 49 y una reducción de volumen de las otras proteínas en este día. Para la fase final o estacionaria de nuestro cultivo hubo un aumento de las proteínas 5, 39, 40 y 67 y una notable reducción en las proteínas 48 y 49 (Figuras 4.9-4.12).

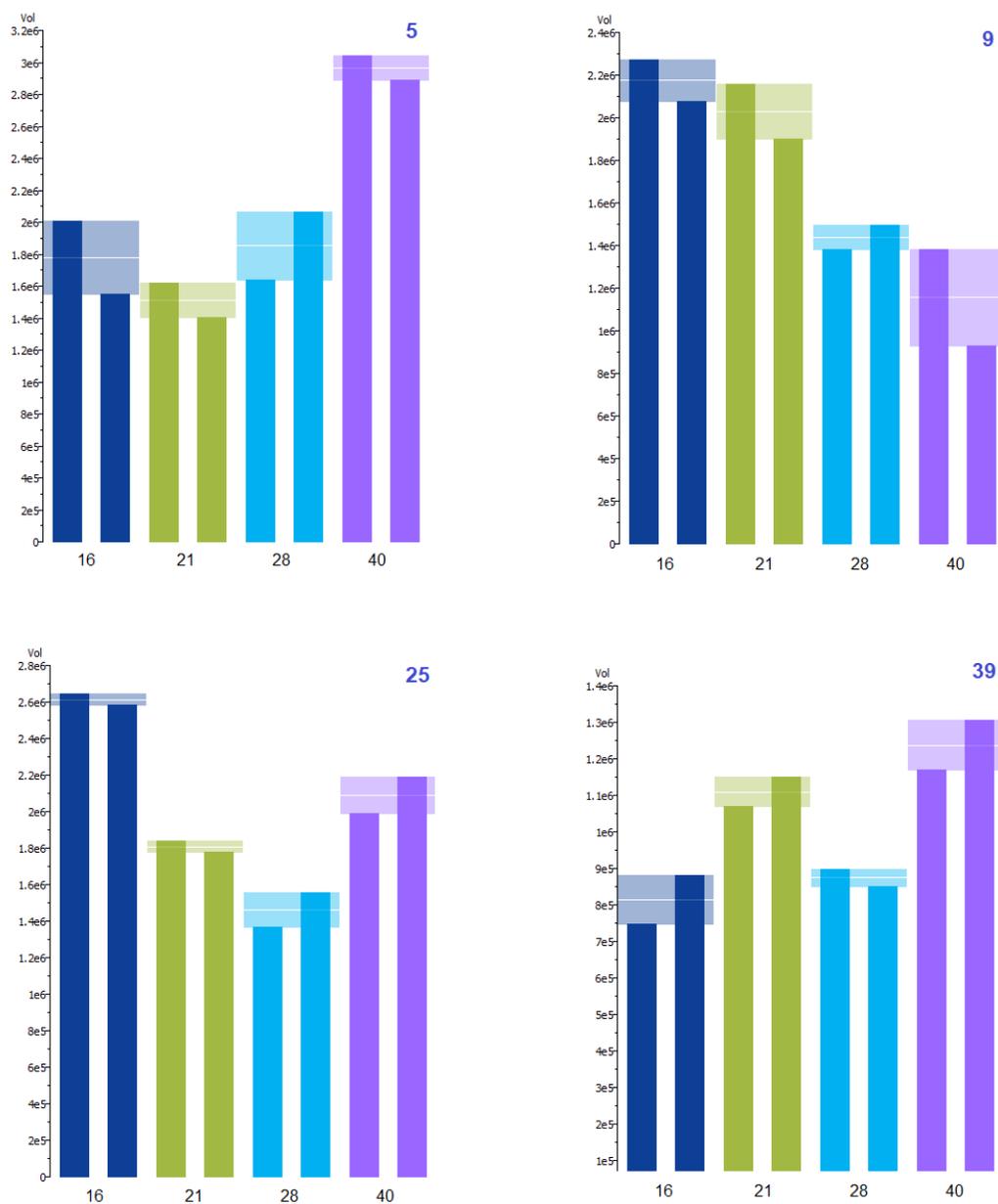


Figura 4.9. Gráficas de volumen de los puntos 5, 9 25 y 39, durante los días 16, 21, 28 y 40 del ciclo de cultivo de callo de aguacate en medio MSP de mantenimiento y proliferación. Probabilidad de ANOVA < 0,05 y un fold change ≥ 1

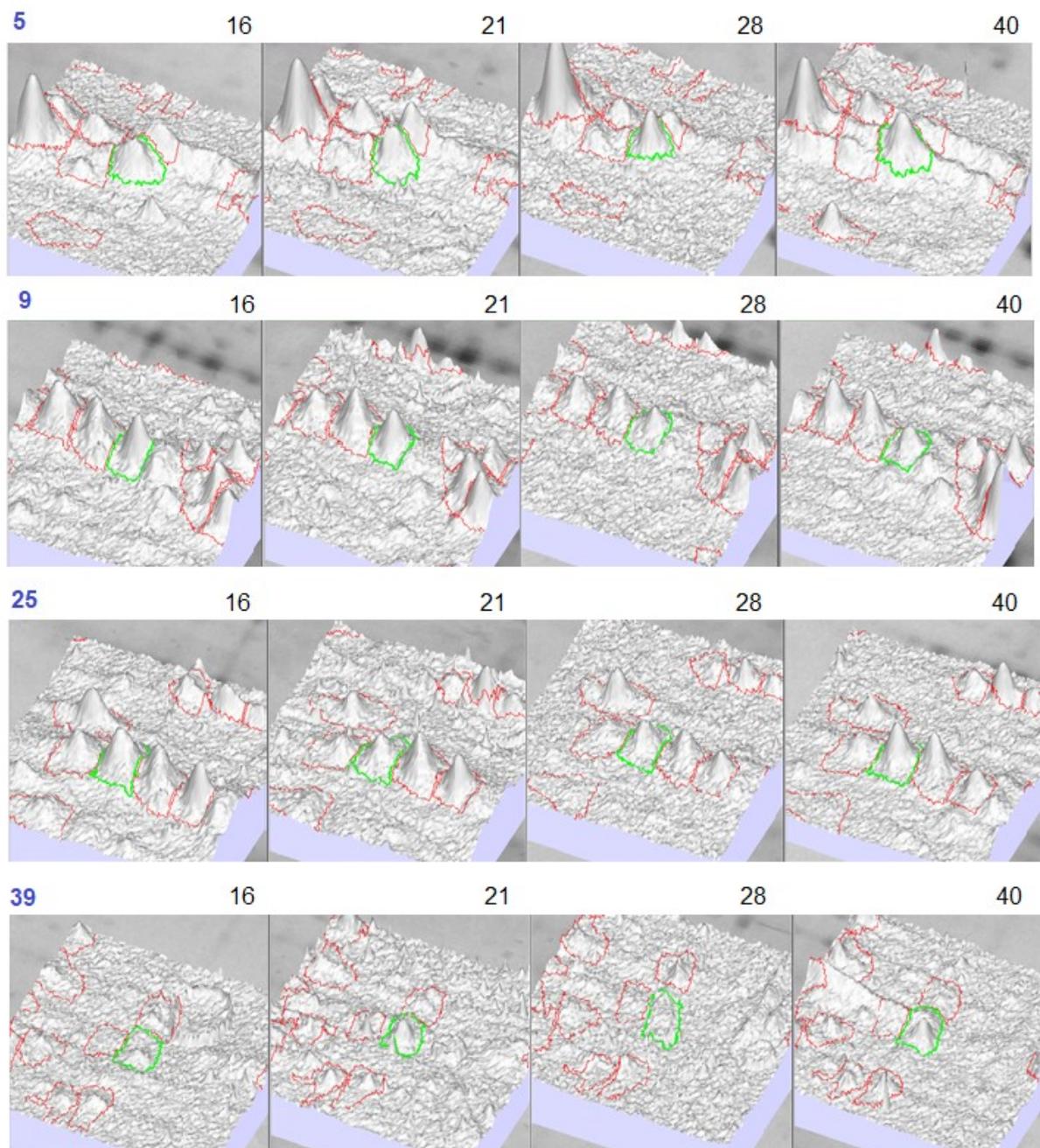


Figura 4.10. Análisis en 3D del volumen de las proteínas 5,9, 25 y 39 presentes en callo de *Persea americana* durante los días 16, 21, 28 y 40 de cultivo en medio MSP.

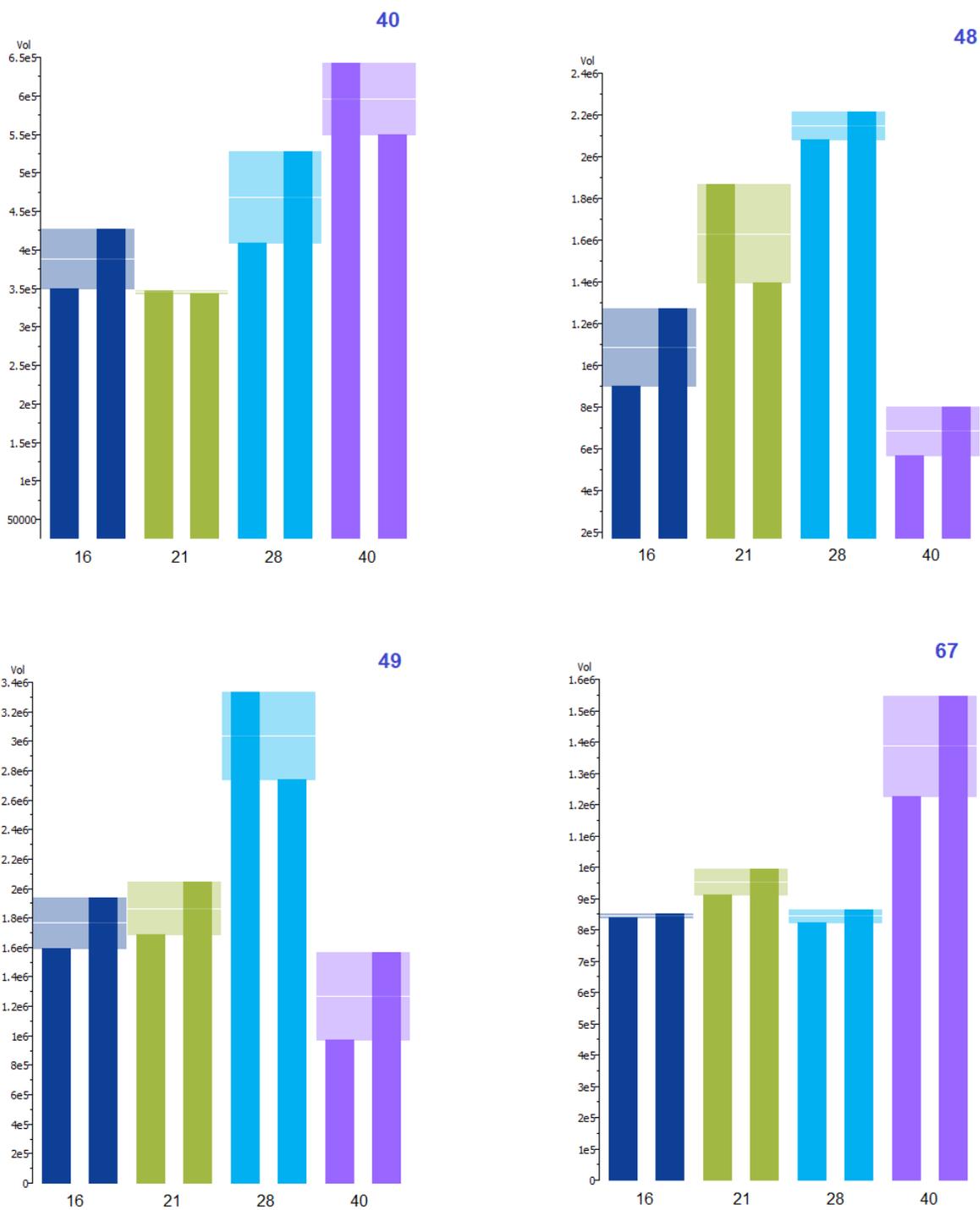


Figura 4.11. Gráficas de volumen de los puntos 40, 48, 49 y 67, durante los días 16, 21, 28 y 40 del ciclo de cultivo de callo de aguacate en medio MSP de mantenimiento y proliferación. Probabilidad de ANOVA < 0,05 y un fold change \geq 1.

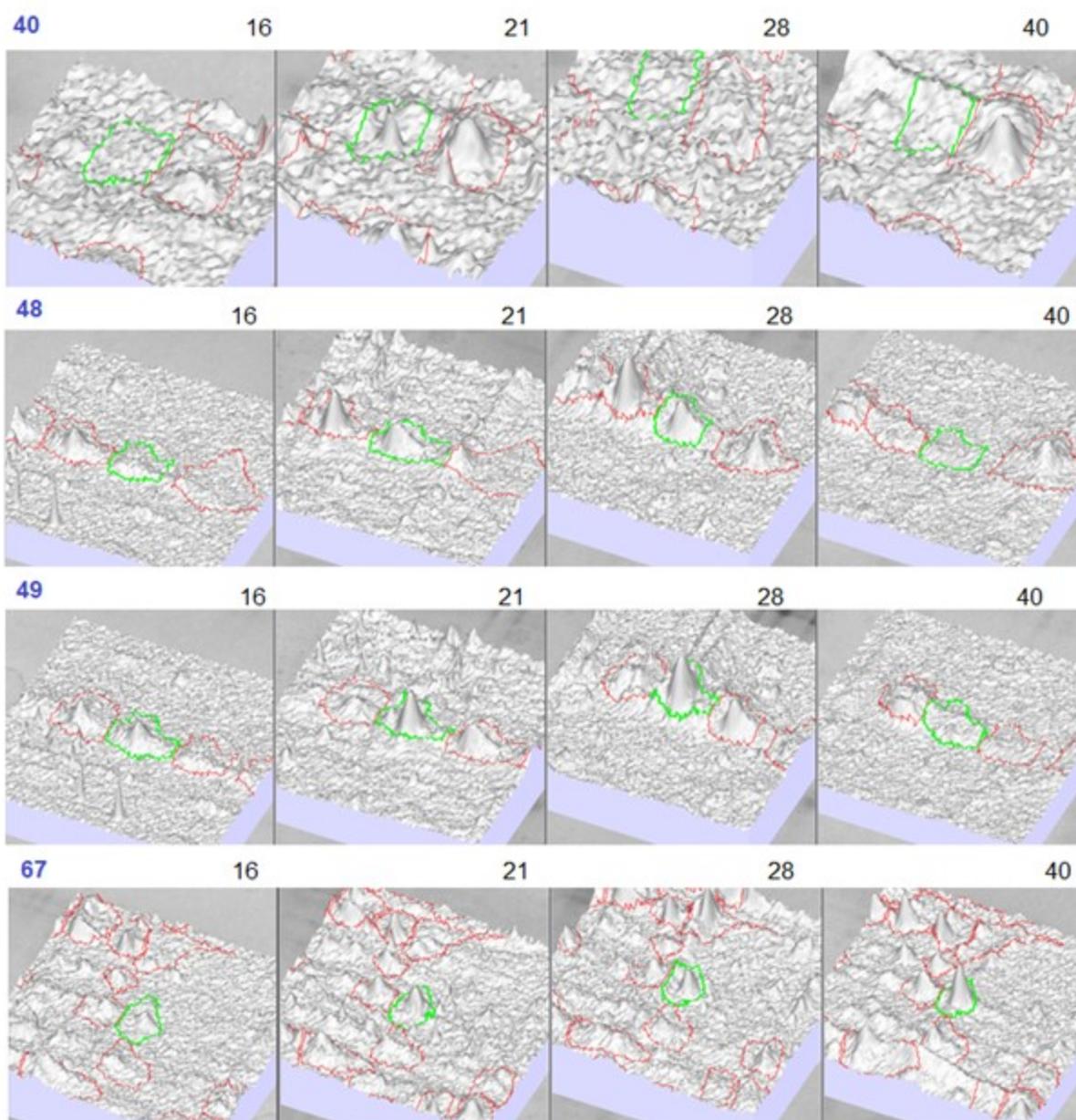


Figura 4.12. Análisis en 3D del volumen de las proteínas 5, 9, 25 y 39 presentes en callo de *Persea* durante los días 16, 21, 28 y 40 de cultivo en medio MSP.

De las proteínas seleccionadas para el análisis estas se encontraban en un rango de pH de 4.03 a 6.93 con masa molecular de 35 a 63 kDa. Con el objetivo de identificar mediante los datos de pI y MM a que proteína corresponde por similitud de valores, utilizamos la base de datos de ExPASy tomando los valores de referencia para *Arabidopsis thaliana* (Cuadro 4.3).

La búsqueda indicó que el punto 5 probablemente se refiere a la proteína malato deshidrogenasa 1, mitocondrial, esto coincide con lo encontrado en líneas embriogénicas por Guzmán García et al., (2013), ellos determinaron que la malato deshidrogenasa se encontraba en baja abundancia y se le consideró como un marcador de la etapa de desarrollo embriogénico. Nuestro análisis mostró un aumento de volumen de este punto en el día 40 (fase estacionaria), de forma similar la proteína 9 podría estarse refiriendo a una malato deshidrogenasa pero citoplasmática, con una disminución constante del día 16 al 40.

Para la proteína 25 que presentó un mayor volumen el día 16 se encontraron varios candidatos, la proteína disulfuro-isomerasa la cual cataliza la formación y ruptura de enlaces disulfuro entre residuos de cisteína en el plegado de proteínas; el segundo candidato fue la amino-metil-transferasa mitocondrial, como se mencionó anteriormente en la biosíntesis del AIA por la vía del triptófano a través del indol-3-piruvato hay una reacción de dos pasos catalizada por una TRIPTÓFANO AMINOTRANSFERASA de *Arabidopsis* (TAA) y por enzimas de la familia YUCCA.

Para la proteína 39, la cual presentó un mayor volumen en el día 40 también se tuvieron varios candidatos, como la S-adenosilmetionina sintasa 1 (SAM 1), la metionina sintasa también fue encontrada con diferentes isoformas en líneas PEM y ES de *Persea americana* (Guzmán-García et al., 2013), o bien podría referirse a la actina 8, esta es una proteína que forma el citoesqueleto de las células, participa en la elongación celular, el tráfico de proteínas a membrana o el movimiento de los orgánulos. De las proteínas 40 y 48 no se encontraron proteínas candidatas para *A. thaliana* en la base de datos consultada. En cuanto a la proteína 49 que tuvo un aumento el día 28 las candidatas fueron la subunidad β de la ATP sintasa, cloroplástica y la enolasa 2 bifuncional/activador transcripcional y finalmente la proteína 67 coincide con la β -glucosidasa 18.

Cuadro 4.3. Lista de probables *proteínas candidatas*, identificadas diferencialmente en etapas de crecimiento de callo de *Persea americana*. Identificación de puntos por valores de pI punto isoeléctrico y MM masa molecular en base de datos SWISS 2DE-PAGE. Fecha de integración en SWISS-2DPAGE. Fecha de liberación uno de diciembre de 2000 (release 13)

No. De spot (pI/MM)	ID SWISS 2DE-PAGE/ # ACCESO	Ultima modificación	Gen / Ordered locus name	pI/MM	Nombre de proteína
5 (6.07/35)	MDHM1_ARATH (Q9ZP06)	May 19, 2011 (version 9)	At1g53240	5.95 / 34390	Malato deshidrogenasa 1, mitocondrial
9 (6.05/38)	MDHC1_ARATH (P93819)	/May 19, 2011 (version 6)	At1g04410	5.90 / 38674	Malato deshidrogenasa, citoplasmática 1
25 (6.41/42)	PDIL2_ARATH (O22263)	May 19, 2011 (version 6)	PDIL2 -1/ At2g47470	6.12 / 39236	Proteína disulfuro- isomerasa como 2-1
	GCST_ARATH (O65396)	May 19, 2011 (version 7)	GDCST At1g11860	6.83 / 42694	Aminometiltransferasa, mitocondrial
39 (5.13/43)	METK1_ARATH (P99056)	May 19, 2011 (version 7)	SAM1 At1g02500	4.96 / 45509	S-adenosilmetionina sintasa 1
	ACT8_ARATH (P99055)	May 19, 2011 (version 6)	ACT8 At1g49240	5.13/ 43852	Actina-8
40 (4.03/43)	No se encontraron datos				
48 (6.93/53)	No encontrado				
49 (5.35/51)	ATPB_ARATH (P19366)	May 19, 2011 (version 7)	atpB AtCg00480	5.35 / 52568	subunidad beta de la ATP sintasa, cloroplástico
	ENO2_ARATH (P25696)	May 19, 2011 (version 6)	ENO2 At2g36530	5.45 / 52029	Enolasa 2 bifuncional/activador transcripcional
67 (6.40 / 63)	BGL18_ARATH (Q9SE50)	May 19, 2011 (version 7)	BGLU18 At1g52400	6.60 / 58901	Beta-glucosidasa 18

4. 5. Discusión

4.5.1 Protocolo de extracción de proteína

Los extractos de células o tejidos por lo general requieren la eliminación de sustancias que interfieren en la preparación de las muestras de proteínas de alta calidad que se requieren para los análisis proteómicos. Para ello se han desarrollado diferentes métodos de extracción de proteínas en muestras biológicas. Comúnmente se utilizan la precipitación mediante TCA/acetona y la extracción con fenol ya que se estima que se minimiza la degradación de las

proteínas y la actividad de las proteasas, así como también se reduce los contaminantes como las sales y los polifenoles. No obstante, la precipitación con TCA/acetona mediante una incubación prolongada puede provocar que las proteínas precipitadas sean más difíciles de volver a disolver llevando a su modificación o degradación después de una exposición prolongada en esta solución (Simpson y Beynon, 2010).

Revisando diferentes trabajos se encontró una modificación del método de extracción TCA/acetona de Niu et al., (2018), el cual simplifica el método comúnmente usado, dando resultados más eficientes en menor tiempo, motivo por el cual se decidió utilizar este método en el presente trabajo. Basados en la información mencionada por dichos autores, sabemos que anteriormente se ha probado la precipitación con TCA acuoso pero la disolución de las proteínas es difícil, también se a probado la precipitación con acetona sola, pero se debe agregar en relación 4:1 acetona/solución acuosa de la proteína, por lo que se menciona no conviene para para grandes volúmenes de extractos manejados en tubos Eppendorf. En el método TCA 20%/acetona la disolución de la pastilla de proteínas es más fácil; además de que se utiliza el mismo volumen para precipitar las proteínas permitiendo manejar mayores volúmenes de extracto. Como el método utilizado en el presente trabajo precipita proteínas en extractos acuosos, se esperaba que fuera universalmente aplicable para varios tejidos vegetales en análisis proteómico; sin embargo, para nuestro trabajo, y probablemente debido a la naturaleza del tejido calloso, el método de TCA/acetona no fue el más exitoso, debido probablemente a la presencia de abundantes carbohidratos que dificultan el electroenfoco y/o obstruyen los poros del gel, la presencia de compuestos fenólicos, que ocasionan manchas artificiales en los geles o bien lípidos que impiden la visualización de los puntos (Wu et al., 2014 a). Por lo tanto, se optó por probar el método de extracción fenólica, el cual permite eliminar sustancias interferentes como los polisacáridos, los lípidos y los compuestos fenólicos de la muestra, favoreciendo a la separación de proteínas. Al utilizar este último método para la extracción de las proteínas de las muestras de callo se pudo determinar, mediante electroforesis SDS-PAGE, que la calidad de la proteína extraída fue muy buena (Figura 4.1f). En general la cantidad óptima de proteína que se puede colocar en los geles 2D y que se van a teñir con azul de Comassie va de los 800 a los 2000 μg . En nuestro caso la concentración óptima para ver las proteínas en los geles 2D fue de 2000 μg (Figuras 4.5 y 4.6).

4.5.2. Estudio proteómico

En el presente trabajo se evaluó el ciclo de crecimiento de cultivo de callo de aguacate con características no embriogénicas, siguiendo las etapas de crecimiento a través del análisis de las proteínas que se pueden visualizar en electroforesis de doble dimensión. Esta parte del estudio se realizó con la finalidad de encontrar proteínas candidatas que nos permitan identificar claramente el momento del ciclo de cultivo en el que se encuentran las células de los callos y que permitan el establecimiento de suspensiones celulares con potencial embriogénico.

Mediante el programa Melani se realizó un filtrado de las proteínas en dos geles (replicas) de cada punto de muestreo (días 16, 21, 28 y 40) bajo las mismas condiciones de cultivo. El filtrado se realizó seleccionando puntos con una probabilidad de ANOVA menor a 0.05 y un cambio en la abundancia diferencial en más de una vez (fold-change); las proteínas que se ajustaron a estos parámetros fueron solo ocho, entre los días de muestreo (Cuadro 4.3). Se observó que las proteínas seleccionadas, se encontraban en rangos de pH de 4.00 a 8.56 y su masa molecular entre 26 y 121 kDa. Se puso atención especial en buscar y analizar proteínas que se presentaban de forma constante en los puntos de muestreo, pero al mismo tiempo eran diferentes durante las fases de cultivo. Para poder predecir la probable identidad de las proteínas diferencialmente observadas, se utilizaron los puntos isoelectricos y las masas moleculares determinadas en los geles. Con estos dos datos para cada proteína se realizó una búsqueda en la base de datos de geles de poli(acrilamida) SWISS-2DPAGE. La búsqueda nos permitió asignarles una probable identidad a seis de las ocho proteínas buscadas. La proteína 5 dio como probable identidad la malato deshidrogenasa 1 mitocondrial; la proteína 9 a la malato deshidrogenasa citoplásmica; la proteína 25 nos indicó dos posibles candidatas, la disulfuro isomerasa y la aminometiltransferasa; la proteína 39 la adenosilmetionina sintasa 1 y la actina 8; la proteína 49 a la subunidad β de ATPasa cloroplástica y a la enolasa 2 bifuncional/activador transcripcional y la proteína 67 a la β -glucosidasa 18. Las proteínas identificadas en las manchas 5 y 9 han sido reportadas previamente por Guzmán García et al., (2013) en cultivos embriogénicos de aguacate.

Los estudios proteómicos realizados hasta ahora en callos embriogénicos y no embriogénicos sugieren que existe una alta correlación entre la presencia de proteínas relacionadas con el estrés y la capacidad embriogénica de los cultivos (Borges Araujo et al., 2022; Mujib et al., 2022; Juárez-Escobar et al., 2021; 2020; Kumaravel et al., 2017; 2020).

Una de las principales diferencias, a nivel de patrones de proteínas, entre el CE y el CNE es la forma en la que hacen frente al estrés, ejemplo de ello es la vía de los fenilpropanoides, la cual

está asociada con la respuesta a estrés y el reforzamiento de la pared celular, así como la producción de flavonoides en CE (Olivares-García et al., 2020). Reportando la acumulación en CE de aguacates Hass y criollo, de enzimas fenilpropanoides (PP), además de una mayor proporción de proteínas asociadas con el proceso de biosíntesis de flavonoides en CE que en CNE. En CNE se cuantificó una mayor acumulación de una cinamilalcohol deshidrogenasa 9.

Aguilar Hernández y Loyola Vargas (2018) indican que las clases de proteínas más reiterativas, identificadas en los proteomas de cultivos embriogénicos son las asociadas con la glucólisis, la biosíntesis de los ácidos grasos, los depuradores de especies reactivas de oxígeno y las chaperonas moleculares.

En CE de *Vitis vinifera* se identificó a una proteína sensible a la deficiencia de hierro, la ascorbato peroxidasa ácida y a una proteína similar a la isoflavona reductasa. Mientras que las proteínas predominantes en CNE fueron la ascorbato peroxidasa básica, una catalasa, una proteína similar a la calcineurina B, una 1,3- β -glucanasa y una quinasa A1 dependiente de ciclina; estos resultados muestran la activación de diferentes vías de respuesta al estrés en CE en comparación con los CNE (Zhang et al., 2009).

En otro trabajo en *Crocus sativus* también se caracterizaron las proteínas acumuladas diferencialmente durante el proceso de ES en callo embriogénico y no embriogénico. Se observó la acumulación de proteínas involucradas en el estrés oxidativo, en diversos procesos metabólicos, y en la síntesis y degradación de proteínas. Entre las proteínas que aumentaron está la proteína de choque térmico de 70 kDa, así como la de choque térmico mitocondrial. Mientras que las proteínas que disminuyeron en los CE en comparación con los CNE fueron la glutatión *S*-transferasa, el factor de iniciación, eIF-4 γ , la cafeoil-CoA *O*-metiltransferasa y la enzima dependiente de PLP del metabolismo de Cys/Met (Sharifi et al., 2012). En un tercer estudio en *Cyphomandra betacea*, la misma comparación arrojó que 150 proteínas se expresan diferencialmente (Correia et al., 2012). Las proteínas expresadas predominantemente en los EC eran proteínas relacionadas con el metabolismo, como enolasas o treonina sintasas, proteínas ribosómicas y de choque térmico, mientras que las proteínas relacionadas con la patogénesis (STH-21) se encontraban principalmente en los NEC.

Los resultados del análisis proteómico de callos embriogénicos de *Zea mays*, sugirieron que el aumento en la abundancia de proteínas asociadas con la biosíntesis de piruvato y la supresión de genes involucrados en la inducción de la ES, podrían ser los responsables de las diferencias entre las células de CE y CNE. Se determinó que la mayor abundancia de una lipoxigenasa en las células de CNE ocasionaba cambios en los niveles de moléculas relacionadas con la

señalización responsable de la reprogramación de las células somáticas durante la inducción de la ES (Varhaníková et al., 2014).

En caña de azúcar, durante la inducción de los embriones somáticos se identificaron proteínas expresadas diferencialmente en CE y NEC (Heringer et al., 2015). Los autores de este estudio determinaron que los CE tenían diferentes proteínas exclusivas sintetizadas a lo largo del proceso de maduración de los embriones somáticos. Por ejemplo, en el día cero, había 65 proteínas exclusivas, entre estas proteínas se encontraban deshidrogenasas, proteínas relacionadas con la desecación, la callosa sintetasa 1 y la óxido nítrico sintasa. Después de 21 días había 14 proteínas únicas de los CE, entre las que se encontraba una catalasa y proteínas de excreción. Por otro lado, los NEC mostraron en los días cero, 21 y 23 diez proteínas únicas, respectivamente, estas proteínas incluían diversas proteínas relacionadas con la degradación de proteínas.

En un análisis proteómico comparativo basado en iTRAQ de tejidos embriogénicos y no embriogénicos de *Larix principis-rupprechtii* Mayr se encontraron 71 proteínas diferenciales, varias de ellas involucradas en procesos metabólicos de desarrollo, como las proteínas activadoras de la GTPasa del factor de ribosilación ADP, la trifosfato isomerasa y el antígeno nuclear de células en proliferación, reguladas significativamente en CE, señalándolos como marcadores de proteínas candidata de ES en esta especie (Zhao et al., 2015). En *Musa* spp., un análisis de proteómica comparativa en 2DE mostró que en CE había una sobreacumulación de proteínas depuradoras de especies reactivas de oxígeno, proteínas de choque térmico y proteínas relacionadas con reguladores del crecimiento como la indol-3-piruvato monooxigenasa y la adenilato isopenteniltransferasa (Kumaravel et al., 2017).

De acuerdo con lo encontrado por diferentes autores los péptidos y proteínas identificadas en cultivos tipo ES se relacionan a una gran variedad de procesos celulares, principalmente de respuesta a estímulos de estrés, chaperonas, cazadores de especies reactivas de oxígeno, transducción de señales, entre muchas otras. Si bien la comprensión del proceso de ES en aguacate aún está en proceso, cada vez nos acercamos más en la elucidación de los factores y mecanismos que regulan la inducción y el desarrollo de embriones somáticos en los cultivos *in vitro* de aguacate.

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 Conclusiones

En el presente trabajo se determinó que es posible inducir la ES del aguacate a partir de explantes diferentes a los reportados hasta ahora. El proceso aún no es eficiente, pero abre muchas oportunidades para mejorar un proceso que hasta ahora ha sido muy difícil de implementar a partir del único tejido que se había explorado como fuente de explante, los embriones inmaduros. Otra ventaja que tiene el uso de hojas es que se pueden disponer de ellas todo el año, ya que el proceso de obtención de plántulas *in vitro* de donde se obtienen los tallos y hojas para la inducción de ES es relativamente rápido en el laboratorio, sin tener que esperar el periodo de floración para la obtención de embriones cigóticos inmaduros desde la huerta. Adicionalmente, si las hojas provienen de plántulas cultivadas *in vitro*, se pueden tener algunas ventajas adicionales, como el hecho de que este tipo de material es más responsivo a las condiciones de inducción de la ES. Por último, pero igualmente importante, es el hecho de que se deja de depender de la estacionalidad en la producción de los embriones cigóticos.

Esperamos que la identificación de las ocho proteínas a lo largo del ciclo de cultivo de los callos permita tomar decisiones informadas sobre en qué momento es mejor iniciar la inducción de la ES, si bien hace falta secuenciar las proteínas identificadas, podemos ver que algunas de las proteínas candidatas como la malato deshidrogenasa (proteína 5), aumenta su volumen (cantidad) en el día 40 y ha sido reportada previamente en baja abundancia en cultivos ES (Guzmán-García et al., 2013), la metionina sintasa (proteína 39) aumenta durante el día 21 y 40 del ciclo, Guzmán-García et al. 2013, han determinado que existen isoformas de esta proteína (proteína 5) en PEM y durante la inducción de la ES en *P. americana*.

Finalmente, también es importante mencionar que el análisis de la literatura sobre la ES del aguacate no muestra aún un consenso. No se ve aún que emerja un patrón sobre que proteínas pudieran estar participando en el proceso de la inducción de la ES. Esto se puede deber a diversos factores, entre otros, las condiciones fisiológicas de las plantas de las que se han tomado los explantes, la diversidad de variedades de aguacate empleadas, las condiciones de cultivo de las plantas fuentes de los explantes, las diferentes condiciones empleadas para la inducción de la ES, entre varias más. Es importante hacer una revisión de la literatura de forma exhaustiva y realizar un análisis que le dé orden al caos que ahora se observa.

5.2 Perspectivas

El proceso de embriogénesis somática involucra una gran cantidad de factores desde la selección del tipo y edad del explante a inducir, la composición del medio de cultivo y el tipo de regulador del crecimiento usado. Con base en los resultados obtenidos hasta ahora es posible pensar en varias perspectivas.

1. Usar los callos como fuente para producir suspensiones celulares con capacidad embriogénica. Experimentos realizados en paralelo en nuestro laboratorio sugieren que se puede obtener este tipo de cultivo, que hasta ahora ha sido muy difícil.
2. Los cultivos de callos obtenidos también se pueden usar para la inducción de la ES. Dada la abundancia de material, es posible realizar una gran cantidad de combinaciones para inducir la ES. Esto estaba limitado antes por la poca disponibilidad de material a partir de cultivos provenientes de embriones cigóticos inmaduros.
3. Profundizar en el análisis de las proteínas candidatas encontradas y corroborar los resultados por análisis de MS.
4. Aún quedan muchas proteínas por identificar a lo largo del ciclo de cultivo. Es importante hacerlo, para que cuando se generen los callos embriogénicos y/o las suspensiones celulares se tenga una base de la cual partir para los análisis proteómicos de los cultivos embriogénicos. Esto desde luego en paralelo con los estudios transcriptómicos que se están realizando en nuestro laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA

- Agboola, D. A., O. G. Ogunyale, O. O. Fawibe y A. A. Ajiboye (2019). A review of plant growth substances: Their forms, structures, synthesis and functions. *Journal of Advanced Laboratory Research in Biology*, 5, 152-168.
- Aguilar-Hernández, V. y V. M. Loyola-Vargas (2018). Advanced proteomic approaches to elucidate somatic embryogenesis. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1658.
- Ammirato, P. V., (1987). Organizational events during somatic embryogenesis, en: *Plant biology vol. 3. Plant tissue and cell culture*, Green, C. E., D. A. Somers, W. P. Hackett y D. D. Biesboer, (eds). Alan R. Liss, Co. New York. pp. 57-81.
- Araújo, R. G., R. M. Rodríguez-Jasso, H. A. Ruiz, M. M. Pintado y C. N. Aguilar (2018). Avocado by-products: Nutritional and functional properties. *Trends in Food Science & Technology*, 80, 51-60.
- Ardiyani, F., E. S. Wida Utami, H. Purnobasuki y S. A. PARAMITA (2020). Development and regeneration of somatic embryos from leaves-derived calli of *Coffea liberica*. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 21, 5829-5834.
- Avilez-Montalvo, J., A. O. Quintana-Escobar, H. A. Méndez-Hernández, M. Á. Uc-Chuc, L. Brito-Argáez, V. Aguilar-Hernández, R. M. Galaz-Ávalos y V. M. Loyola-Vargas (2022). Auxin-cytokinin cross talk in somatic embryogenesis of *Coffea canephora*. *Plants*, 11, 2013.
- Ayil-Gutiérrez, B. A., R. M. Galaz-Ávalos, E. Peña-Cabrera y V. M. Loyola-Vargas (2013). Dynamics of the concentration of IAA and some of its conjugates during the induction of somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plant Signaling & Behavior*, 8, e26998.
- Barrientos, A. F., E. García y E. Avitia (1996). Anatomía del fruto de aguacate. Drupa o Baya? *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 2, 189-198.
- Bergh, B. y E. Lahav, (1996). Avocado, en: *Fruit Breeding. Tree and Tropical Fruits Vol. 1*, Janick, J. y J. N. Moore, (eds). John Wiley & Sons Inc. New York. pp. 113-166.
- Bergh, B. O. (1992). The origin, nature, and genetic improvement of the avocado. *California Avocado Society Yearbook*, 76, 61-75.
- Besnard, F., Y. Refahi, V. Morin, B. Marteaux, G. Brunoud, P. Chambrier, F. Rozier, V. Mirabet, J. Legrand, S. Lainé, E. Thévenon, E. Farcot, C. Cellier, P. Das, A. Bishopp, R. Dumas, F. Parcy, Y. Helariutta, A. Boudaoud, C. Godin, J. Traas, Y. Guédon y T. Vernoux (2014). Cytokinin signalling inhibitory fields provide robustness to phyllotaxis. *Nature*, 505, 417-421.

-
- Borges Araujo, A. J., G. V. Cerruti, R. Zuccarelli, M. Rodriguez Ruiz, L. Freschi, R. Singh, B. M. Moerschbacher, E. I. S. Floh y A. L. Wendt dos Santos (2022). Proteomic analysis of S-nitrosation sites during somatic embryogenesis in Brazilian pine, *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze. *Frontiers in Plant Science*, 13, 902068.
- Bufler, G. y J. Fiedler (1996). Avocado genetic resources. Giara, 1-50.
- Carrillo, D., R. E. Duncan y J. E. Peña (2012). Ambrosia beetles (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) that breed in avocado wood in Florida. *Florida Entomologist*, 95, 573-579.
- Chanderbali, A. S., D. E. Soltis, P. S. Soltis y B. N. Wolstenholme, (2013). Taxonomy and botany, en: *The Avocado: Botany, Production and Uses*, Schaffer, B., B. N. Wolstenholme y A. W. Whiley, (eds). CABI. Oxfordshire. pp. 31-50.
- Chanderbali, A. S., V. A. Albert, V. E. T. M. Ashworth, M. T. Clegg, R. E. Litz, D. E. Soltis y P. S. Soltis (2008). *Persea americana* (avocado): bringing ancient flowers to fruit in the genomics era. *BioEssays*, 30, 386-396.
- Chang, L., E. Ramireddy y T. Schmülling (2015). Cytokinin as a positional cue regulating lateral root spacing in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 66, 4759-4768.
- Correia, S., R. Vinhas, B. Manadas, A. S. Lourenço, P. Veríssimo y J. M. Canhoto (2012). Comparative proteomic analysis of auxin-induced embryogenic and nonembryogenic tissues of the Solanaceous tree *Cyphomandra betacea* (Tamarillo). *Journal of Proteome Research*, 11, 1666-1675.
- Cronquist, A. (1981). *The New York botanical garden. An integrated system of classification of flowering plants*, Columbia University, New York. 428 p.
- Cruz-Hernández, A., Witjaksono, R. E. Litz y M. A. Gómez-Lim (1998). *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation of embryogenic avocado cultures and regeneration of somatic embryos. *Plant Cell Reports*, 17, 497-503.
- Dandekar, T. y M. Naseem (2017). *Auxins and cytokinins in plant biology*, Humana Press, New York. 204 p.
- Davies, P. J., (2010). Regulatory factors in hormone action: Level, location and signal transduction, en: *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!*, Davies, P. J., (ed). Springer. Dordrecht. pp. 16-35.
- Dreher, M. L. y A. J. Davenport (2013). Hass avocado composition and potential health effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53, 738-750.

-
- Fajardo Rosabal, L., M. Freire-Seijo, Y. Garcia Rodríguez y L. Argente Martínez (2005). Formación de embriones somáticos en *Persea americana* Mill var. Catalina a partir de embriones cigóticos inmaduros. *Biotecnología Vegetal*, 5, 103-107.
- FAOSTAT (2022). <https://www.fao.org/faostat/en/#search/AVOCADO>. FAO,
- Fujimura, T. y A. Komamine (1980). The serial observation of embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *New Phytologist*, 86, 213-218.
- Fukui, K., K. Arai, Y. Tanaka, Y. Aoi, V. Kukshal, J. M. Jez, M. F. Kubes, R. Napier, Y. Zhao, H. Kasahara y K. i. Hayashi (2022). Chemical inhibition of the auxin inactivation pathway uncovers the roles of metabolic turnover in auxin homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119, e2206869119.
- Furnier, G. R., M. P. Cummings y M. T. Clegg (1990). Evolution of the avocados as revealed by DNA restriction fragment variation. *Journal of Heredity*, 81, 183-188.
- Galaz-Ávalos, R. M., S. Aguilar-Díaz, P. A. Xool-González, S. M. M. Huchín-May y V. M. Loyola-Vargas, (2012). Callus, suspension culture, and hairy roots. Induction, maintenance and characterization, en: *Plant Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology*. Vol. 877, Loyola-Vargas, V. M. y N. Ochoa-Alejo, (eds). Humana Press. Heidelberg. pp. 29-40.
- Gamborg, O. L., R. A. Miller y K. Ojima (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.*, 50, 151-158.
- Garay-Arroyo, A., M. de la Paz Sánchez, B. García-Ponce, E. R. Álvarez-Buylla y C. Gutiérrez (2014). La homeostasis de las auxinas y su importancia en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. *Revista de Educación Bioquímica*, 33, 13-22.
- García, C., A.-A. F. de Almeida, M. Costa, D. Britto, R. Valle, S. Royaert y J. P. Marelli (2019). Abnormalities in somatic embryogenesis caused by 2, 4-D: an overview. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 137, 193-212.
- Garner, L. C. y C. J. Lovatt (2016). Physiological factors affecting flower and fruit abscission of 'Hass' avocado. *Scientia Horticulturae*, 199, 32-40.
- George, E. F., M. A. Hall y G. J. D. Klerk, (2008). The anatomy and morphology of tissue cultured plants, en: *Plant Propagation by Tissue Culture: Volume 1. The Background*, George, E. F., M. A. Hall y G. J. D. Klerk, (eds). Springer. Dordrecht. pp. 465-477.
- Godoy-Hernández, G. y F. A. Vázquez-Flota, (2006). Growth measurements, en: *Plant Cell Culture Protocols*, Loyola-Vargas, V. M. y F. Vázquez-Flota, (eds). Humana Press. Totowa, NJ. pp. 51-58.

-
- Guzmán-García, E., C. Sánchez-Romero, B. Panis y S. C. Carpentier (2013). The use of 2D-DIGE to understand the regeneration of somatic embryos in avocado. *Proteomics*, 13, 3498-3507.
- Hayashi, K. i. (2021). Chemical biology in auxin research. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 13, a040105.
- Heringer, A. S., T. Barroso, A. F. Macedo, C. Santa-Catarina, G. H. M. F. Souza, E. I. S. Floh, G. A. de Souza-Filho y V. Silveira (2015). Label-free quantitative proteomics of embryogenic and non-embryogenic callus during sugarcane somatic embryogenesis. *PLoS ONE*, 10, e0127803.
- Hernández Amasifuen, A. D. y H. B. Díaz Pillasca (2019). Inducción in vitro de callo embriogénico a partir del cultivo de anteras en " papa amarilla" *Solanum goniocaly* x Juz. & Bukasov (Solanaceae). *Arnaldoa*, 26, 277-286.
- Herrera-González, J. A., S. Bautista-Baños, S. Salazar-García y P. Gutiérrez-Martínez (2020). Situación actual del manejo poscosecha y de enfermedades fungosas del aguacate 'Hass para exportación en Michoacán. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11, 1647-1660.
- Jorrín-Novo, J. V., (2020). What is new in (plant) proteomics methods and protocols: The 2015-2019 quinquennium, en: *Plant Proteomics: Methods and Protocols*, Jorrín-Novo, J. V., L. Villedor, M. A. Castillejo y M. D. Rey, (eds). Springer. New York, NY. pp. 1-10.
- Jorrín-Novo, J. V. (2021). Proteomics and plant biology: contributions to date and a look towards the next decade. *Expert Review of Proteomics*, 93-103.
- Juárez-Escobar, J., E. Bojorquez-Velázquez, J. M. Iizalde-Contreras, J. A. Guerrero-Analco, V. M. Loyola-Vargas, M. Mata-Rosas y E. Ruíz-May (2021). Current proteomic and metabolomic knowledge of zygotic and somatic embryogenesis in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 11807.
- Kamada-Nobusada, T. y H. Sakakibara (2009). Molecular basis for cytokinin biosynthesis. *Phytochemistry*, 70, 444-449.
- Konan, K. E., T. Durand-Gasselin, Y. J. Kouadio, A. Flori, A. Rival, Y. Duval y C. Pannetier (2009). In vitro conservation of oil palm somatic embryos for 20-years on a hormone-free culture medium: characteristics of the embryogenic cultures, derived plantlets and adult palms. *Plant Cell Reports*, 29, 1.
- Korasick, D. A., T. A. Enders y L. C. Strader (2013). Auxin biosynthesis and storage forms. *Journal of Experimental Botany*, 64, 2541-2555.
- Kotov, A. A. y L. M. Kotova (2018). Auxin-cytokinin interactions in regulating correlative inhibition in two-branched pea seedlings. *Journal of Experimental Botany*, 69, 2967-2978.

-
- Kudo, T., T. Kiba y H. Sakakibara (2010). Metabolism and long-distance translocation of cytokinins. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52, 53-60.
- Kumaravel, M., S. Uma, S. Backiyarani, M. S. 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, 163-178.
- Kumaravel, M., S. Uma, S. Backiyarani y M. S. Saraswathi (2020). Proteomic analysis of somatic embryo development in *Musa* spp. cv. Grand Naine (AAA). *Scientific Reports*, 10, 4501.
- Lara, A., R. Valverde y L. Gómez (2003). Histología de embriones somáticos y brotes adventicios inducidos en hojas de *Psychotria acuminata*. *Agronomía Costarricense*, 27, 37-48.
- Lavi, U., E. Lahav, A. Genizi, C. Degani, S. Gazit y J. Hillel (1991). Quantitative genetic analysis of traits in avocado cultivars. *Plant Breeding*, 106, 149-160.
- Litz, R. E., D. Efendi, S. H. T. Raharjo y I. Suarez (2005). Genetic transformation of avocado (*Persea americana* Mill.): A coordinated strategy for crop improvement. *Acta Horticulturae*, 692, 131.
- Litz, R. E., S. H. T. Raharjo y M. A. Gómez-Lim, (2007). Avocado, en: *Transgenic Crops V*, Pua, E. C. y M. R. Davey, (eds). Springer. Berlin, Heidelberg. pp. 167-187.
- López Encina, C., A. Parisi, C. O'Brien y N. Mitter (2014). Enhancing somatic embryogenesis in avocado (*Persea americana* Mill.) using a two-step culture system and including glutamine in the culture medium. *Scientia Horticulturae*, 165, 44-50.
- Loyola-Vargas, V. M. y N. Ochoa-Alejo, (2016). Somatic embryogenesis. An overview, en: *Somatic Embryogenesis. Fundamental Aspects and Applications*, Loyola-Vargas, V. M. y N. Ochoa-Alejo, (eds). Springer. Switzerland. pp. 1-10.
- Márquez-López, R. E., A. O. Quintana-Escobar y V. M. Loyola-Vargas (2019). Cytokinins, the Cinderella of plant growth regulators. *Phytochemistry Reviews*, 18, 1387-1408.
- Márquez-Martín, B., C. Sánchez-Romero, R. Perán-Quesada, A. Barceló-Muñoz y F. Pliego-Alfaro (2003). Factores que afectan a la obtención de embriones somáticos blanco-opacos de aguacate. *Proceedings V World Avocado Congress*, 97-102.
- Márquez-Martín, B., R. Sesmero, M. A. Quesada, F. Pliego-Alfaro y C. Sánchez-Romero (2011). Water relations in culture media influence maturation of avocado somatic embryos. *Journal of Plant Physiology*, 168, 2028-2034.

-
- Márquez-Martín, B., A. Barceló-Muñoz, F. Pliego-Alfaro y C. Sánchez-Romero (2012). Somatic embryogenesis and plant regeneration in avocado (*Persea americana* Mill.): influence of embryogenic culture type. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 21, 180-188.
- Mateo-Bonmatí, E., R. Casanova-Sáez y K. Ljung (2019). Epigenetic regulation of auxin homeostasis. *Biomolecules*, 9, 623.
- Méndez-Hernández, H. A., M. Ledezma-Rodríguez, R. N. Avilez-Montalvo, Y. L. Juárez-Gómez, A. Skeete, J. Avilez-Montalvo, C. De-la-Peña y V. M. Loyola-Vargas (2019). Signaling overview of plant somatic embryogenesis. *Frontiers in Plant Science*, 10, 77.
- Michalczuk, L., D. M. Ribnicky, T. J. Cooke y J. D. Cohen (1992). Regulation of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in carrot cell cultures. *Plant Physiology*, 100, 1346-1353.
- Mok, D. W. S. y M. C. Mok (2001). Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52, 89-118.
- Mooney, P. A. y J. v. Staden (1987). Induction of embryogenesis in callus from immature embryos of *Persea americana*. *Canadian Journal of Botany*, 65, 622-626.
- Morffy, N. y L. C. Strader (2020). Old town roads: routes of auxin biosynthesis across kingdoms. *Current Opinion in Plant Biology*, 55, 21-27.
- Mujib, A., M. Q. Malik, Y. Bansal, R. Syeed, B. Ejaz y J. Mamgain, (2022). Somatic embryogenesis in *Catharanthus Roseus*: Proteomics of embryogenic and non-embryogenic tissues; and genome size analysis of regenerated plant, en: *The Catharanthus Genome*, Kole, C., (ed). Springer. Cham. pp. 85-100.
- Murashige, T. y F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- Nic-Can, G. I. y V. M. Loyola-Vargas, (2016). The role of the auxins during somatic embryogenesis, en: *Somatic Embryogenesis. Fundamental Aspects and Applications*, Loyola-Vargas, V. M. y N. Ochoa-Alejo, (eds). Springer. Switzerland. pp. 171-181.
- Nieminen, K., J. Immanen, M. Laxell, L. Kauppinen, P. Tarkowski, K. Dolezal, S. Tähtiharju, A. Elo, M. Decourteix, K. Ljung, R. Bhalerao, K. Keinonen, V. A. Albert y Y. Helariutta (2008). Cytokinin signaling regulates cambial development in poplar. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 20032-20037.

-
- Niu, L., H. Zhang, Z. Wu, Y. Wang, H. Liu, X. Wu y W. Wang (2018). Modified TCA/acetone precipitation of plant proteins for proteomic analysis. PLoS ONE, 13, e0202238.
- Nomura, K. y A. Komamine (1985). Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at a high frequency in a carrot suspension culture. Plant Physiology, 79, 988-991.
- O'Brien, C., M. Constantin, A. Walia, J. L. Y. Yiing y N. Mitter (2016a). Cryopreservation of somatic embryos for avocado germplasm conservation. Scientia Horticulturae, 211, 328-335.
- O'Brien, C., A. Parisi, J. Lim Yiing Yuan, M. Constantin y N. Mitter (2016b). Cryopreservation of avocado (*Persea americana* Mill.) using somatic embryos. Acta Horticulturae, 1113, 265-270.
- O'Brien, C., J. C. A. Hiti-Bandaralage, A. Hayward y N. Mitter, (2018). Avocado (*Persea americana* Mill.), en: Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants: Volume II, Jain, S. M. y P. Gupta, (eds). Springer. Cham. pp. 305-328.
- Olivares-García, C., J. L. Monribot-Villanueva, M. Ramírez-Vázquez, J. M. Elizalde-Contreras, E. Ibarra-Laclette, C. Peña, F. Quiroz-Figueroa, A. Segura-Cabrera, J. A. Guerrero-Analco, L. M. Shannon, V. M. Loyola-Vargas, M. Mata-Rosas y E. Ruiz-May (2020). Phenylpropanoids connected to the cell wall fortification and stress regulation in avocado somatic embryogenesis. International Journal of Molecular Sciences, 21, 5679.
- Palomo-Ríos, E., A. Barceló-Muñoz, J. Mercado y F. Pliego-Alfaro (2012). Evaluation of key factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos of avocado (*Persea americana* Mill.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 109, 201-211.
- Palomo-Ríos, E., C. Pérez, J. A. Mercado y F. Pliego-Alfaro (2013). Enhancing frequency of regeneration of somatic embryos of avocado (*Persea americana* Mill.) using semi-permeable cellulose acetate membranes. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 115, 199-207.
- Palomo-Ríos, E., S. Cerezo, J. A. Mercado y F. Pliego-Alfaro (2017). *Agrobacterium*-mediated transformation of avocado (*Persea americana* Mill.) somatic embryos with fluorescent marker genes and optimization of transgenic plant recovery. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 128, 447-455.
- Pan, Z., R. Guan, S. Zhu y X. Deng (2009). Proteomic analysis of somatic embryogenesis in Valencia sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck). Plant Cell Reports, 28, 281-289.

-
- Pasternak, T. P., E. Prinsen, F. Ayaydin, P. Miskolczi, G. Potters, H. Asard, H. A. Van Onckelen, D. Dudits y A. Fehér (2002). The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant Physiology*, 129, 1807-1819.
- Pateña, L. F., L. R. Carlos-Refuerzo y R. C. Barba (2002). Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in mango (*Mangifera indica* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 38, 173-177.
- Perán-Quesada, R., C. Sánchez-Romero, A. Barceló-Muñoz y F. Pliego-Alfaro (2004). Factors affecting maturation of avocado somatic embryos. *Scientia Horticulturae*, 102, 61-73.
- Pérez Álvarez, S., G. Ávila Quezada y O. Coto Arbelo (2015). Avocado (*Persea americana* Mill). *Cultivos Tropicales*, 36, 111-123.
- Peterson, G. L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, 83, 346-356.
- Pierce, H. F. (1959). The nutritional value of the avocado. *California Avocado Society Yearbook*, 43, 83-85.
- Pliego-Alfaro, F. y T. Murashige (1988). Somatic embryogenesis in avocado (*Persea americana* Mill.) *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 12, 61-66.
- Pliego-Alfaro, F., A. Barceló-Muñoz, E. Simón-Pérez, G. de la Viña-Nieto, C. Sánchez-Romero y R. Perán-Quesada (1999). La micropropagación en la mejora de patrones de aguacate (*Persea americana* Mill.): problemas y limitaciones. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 5, 239-244.
- Quintero-Jiménez, A., E. Heredia-García, C. L. Aguirre-Mancilla, J. C. Raya-Pérez, J. G. Ramírez-Pimentel y G. Iturriaga (2020). Embriogénesis y organogénesis de aguacate criollo mexicano. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11, 1525-1536.
- Raharjo, S. H. y R. E. Litz (2005). Micrografting and *ex vitro* grafting for somatic embryo rescue and plant recovery in avocado (*Persea americana*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82, 1-9.
- Raharjo, S. H., M. A. Gomez-Lim, G. Padilla y R. E. Litz (2008). Recovery of avocado (*Persea americana* Mill.) plants transformed with the antifungal plant defensin gene PDF1.2. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 44, 254.
- Rivera Páez, F. A., V. González Salazar, J. G. Gozález Acosta y P. A. Ossa López (2016). Caracterización molecular, análisis morfológico y colonización micorrízica en la rizósfera del aguacate (*Persea americana* Mill) en Caldas, Colombia. *Acta Agronómica*, 65, 398-405.

-
- Rohwer, J. G., (1993). Lauraceae, en: Flowering Plants -À Dicotyledons: Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid Families, Kubitzki, K., J. G. Rohwer y V. Bittrich, (eds). Springer. Berlin, Heidelberg. pp. 366-391.
- Sakakibara, H. (2006). Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. Annual Review of Plant Biology, 57, 431-449.
- Sánchez-Romero, C., B. Márquez-Martín y F. Pliego-Alfaro, (2006). Somatic and zygotic embryogenesis in avocado, en: Somatic Embryogenesis, Mujib, A. y J. Samaj, (eds). Springer. Berlin Heidelberg. pp. 271-284.
- Schaller, G. E., A. Bishopp y J. J. Kieber (2015). The Yin-Yang of hormones: Cytokinin and auxin interactions in plant development. The Plant Cell, 27, 44-63.
- Schroeder, C. A. (1952). Floral development, sporogenesis, and embryology in the avocado, *Persea americana*. Botanical Gazette, 113, 270-278.
- Sehra, B. y R. G. Franks (2015). Auxin and cytokinin act during gynoecial patterning and the development of ovules from the meristematic medial domain. Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology, 4, 555-571.
- Sharifi, G., H. Ebrahimzadeh, B. Ghareyazie, J. Gharechahi y E. Vatankhah (2012). Identification of differentially accumulated proteins associated with embryogenic and non-embryogenic calli in saffron (*Crocus sativus* L.). Proteome Science, 10, 3.
- Simpson, D. M. y R. J. Beynon (2010). Acetone precipitation of proteins and the modification of peptides. Journal of Proteome Research, 9, 444-450.
- Smith, C. E. (1966). Archeological evidence for selection in avocado. Economic Botany, 20, 169-175.
- Smith, M., F. Gomez, A. Beaver, J. Hulcr y I. Cognato (2019). Reassessment of the species in the *Euwallacea fornicatus* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) complex after the rediscovery of the "lost" type specimen. Insects, 10, 261.
- Storey, W. B., B. Bergh y G. A. Zentmyer (1986). The origin, indigenous range and dissemination of the avocado. California Avocado Society Yearbook, 70, 127-133.
- Suarez, I. E., R. A. Schnell, D. N. Kuhn y R. E. Litz (2006). Recovery and indexing of avocado plants (*Persea americana*) from embryogenic nucellar cultures of an avocado sunblotch viroid-infected tree. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 84, 27-37.
- Takei, K., T. Yamaya y H. Sakakibara (2004). Arabidopsis *CYP735A1* and *CYP735A2* encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of trans-zeatin. Journal of Biological Chemistry, 279, 41866-41872.

-
- Tillmann, M., Q. Tang, G. Gardner y J. D. Cohen (2022). Complexity of the auxin biosynthetic network in *Arabidopsis* hypocotyls is revealed by multiple stable-labeled precursors. *Phytochemistry*, 200, 113219.
- Varhaníková, M., L. Uvackova, L. Skultety, A. Pretova, B. Obert y M. Hajduch (2014). Comparative quantitative proteomic analysis of embryogenic and non-embryogenic calli in maize suggests the role of oxylipins in plant totipotency. *Journal of Proteomics*, 104, 57-65.
- Vidales-Fernandez, I., R. Salgado-Garciglia, M. A. Gomez-Lim, E. Angel-Palomares y H. Guillen-Andrade (2003). Embriogénesis somática de aguacate (*Persea americana* Mill. cv. Hass). Proceedings V World Avocado Congress, 89-95.
- Wang, N., Wu, X., Ku, L., Chen, Y. y Wang, W. (2016). Evaluación de tres métodos de extracción de proteínas para el análisis del proteoma de la nervadura central de la hoja de maíz, un tejido compuesto rico en células de esclerénquima. *Fronteras en la ciencia de las plantas*, 7, 856.
- Williams, L. O. (1977). The avocados, a synopsis of the genus *Persea*, subg. *Persea*. *Economic Botany*, 31, 315-320.
- Witjaksono y R. E. Litz (1999a). Induction and growth characteristics of embryogenic avocado cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 58, 19-29.
- Witjaksono y R. E. Litz (1999b). Maturation of avocado somatic embryos and plant recovery. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 58, 141-148.
- Witjaksono, R. E. Litz y F. Pliego-Alfaro, (1999). Somatic embryogenesis of avocado (*Persea americana* Mill.), en: *Somatic Embryogenesis in Woody Plants: Volume 5*, Jain, S. M., P. K. Gupta y R. J. Newton, (eds). Springer. Dordrecht. pp. 197-214.
- Witjaksono y R. E. Litz (2004). Effect of gamma irradiation on embryogenic avocado cultures and somatic embryo development. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 77, 139-147.
- Wu, X., F. Gong y W. Wang (2014a). Protein extraction from plant tissues for 2DE and its application in proteomic analysis. *Proteomics*, 14, 645-658.
- Wu, XL, Xiong, EH, Wang, W., Scali, M. y Cresti, M. (2014b). Método universal de preparación de muestras que integra precipitación con ácido tricloroacético/acetona con extracción con fenol para el análisis proteómico de cultivos. *Nat. Protocolo* 9, 362–374. doi: 10.1038/nprot.2014.022
- Yang, X. y X. Zhang (2010). Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 29, 36-57.

-
- Yasuda, T., Y. Fujii y T. Yamaguchi (1985). Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. *Plant and Cell Physiology*, 26, 595-597.
- Zapata Guzmán, J. E., J. D. Tobón Acevedo, H. I. Patiño Tiria, E. H. Palacios, C. A. Mejía Córdoba, H. D. Marín Zapata, C. Alcaraz Machado y E. Alcaraz Guzmán (2018). El cultivo de aguacate *Persea americana* en el occidente de Antioquia, Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA),
- Zhang, J., H. Ma, S. Chen, M. Ji, A. Perl, L. Kovacs y S. Chen (2009). Stress response proteins' differential expression in embryogenic and non-embryogenic callus of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon- A proteomic approach. *Plant Science*, 177, 103-113.
- Zhao, J., B. Wang, X. Wang, Y. Zhang, M. Dong y J. Zhang (2015). iTRAQ-based comparative proteomic analysis of embryogenic and non-embryogenic tissues of Prince Rupprecht's larch (*Larix principis-rupprechtii* Mayr). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 120, 655-669.

ANEXOS

Cuadro S1. Composición de los medios de cultivo.

MS (Murashige y Skoog, 1962) mg/L		B ₅ (Gamborg et al., 1968)	MMSE (Pateña et al., 2002)	Medio MSP p/ crecimiento de callo
NH ₄ NO ₃	1650	-		1650
KNO ₃	1900	2500	2500	1900
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	250	250	370
CaCl ₂ . 2H ₂ O	440	150	150	440
KH ₂ PO ₄	170	-		170
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	-	150	150	
(NH ₄) ₂ SO ₄		134	134	
KI	0.83	0.75	0.83	0.83
H ₃ BO ₃	6.2	3.0	6.2	6.183
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3	10	22.3	15.10
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	2.0	8.6	8.62
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.25	0.25	0.24915
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.025	0.025	0.024
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.025	0.025	0.02379
Na ₂ .EDTA	37.3	37.3	37.3	47.5
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8	27.8		27.8
Tiamina			0.10	5
Piridoxina			0.50	
Acido nicotínico			0.50	
Glycina			2	
Glutamina			400	
Myo-inositol				100

Sacarosa			60 g/l	30 g/l
Agua de coco			100 ml	
Picloram				0.1
2,4-D			0.5 (1.9)	

Cuadro S2. Resumen de trabajos realizados en embriogénesis somática de aguacate y los diferentes tratamientos utilizados.

Cultivar	Explante	Inducción	Mantenimiento	Maduración-desarrollo	Germinación	Resultados	Referencia
Fuerte Duke	ECI 0.1-0.5 mm	-MSP +carbón activado	Sales Dixon + IPA +BTOA	Sales Dixon		-callo friable y proembriones globulares -2-3% desarrollaron hojas - contenido de almidón, indicador de señal embriogénica -Picloram 0.01 a 0.001 mg/ L no induce callo embriogénico Adición de IPA y BTOA al medio incrementa friabilidad del callo	(Mooney y Staden, 1987)
Hass	ECI 0.6-0.8 mm	-MS, 2,4-D (0.01-0.1-1 mg /L) o Picloram (0.001-0.01- 0.1 mg/L)	MS,	-sacarosa [3, 6, 9 %] -- caseína hidrolizada 1 a 3 g/L -carbón activado 0.1% -ABA 10 mg/L	BA, GA3 y baja temperatura 12°C	No hubo éxito en tratamiento de germinación y/o a diferentes concentraciones de sacarosa y/o caseína hidrolizada - 30% de cultivos señales embriogénicas -70% señales embriogénicas en callo con picloram 0.01-0.1 g/L -Adición de 0.1 mg/L picloram para iniciación del callo , a concentraciones menores (0.01-0.1-1mg/L) produce desorganización. Medio basal con 1g/L de carbón activado desarrolla callos vigorosos en presencia de 2,4-D a 10mg/L	(Pliego-Alfaro y Murashige, 1988)
Isham	ECI	MSP	L-MSP	Transformantes a partir de PEMs		Primera recuperación de cultivo embriogénico de aguacate transformados con <i>Agrobacterium</i> , 5% conversión a	(Cruz-Hernández et al., 1998)

					plantas	
M25864 Esther Booth7 Booth 8 'T362',Yon Thomas Isham	ECI 0.1-7 mm	MSP, MS- ,MSNa, MSK , B5m+pic	L-MSP (8-10d) S-MSP			<p>-0-25% frecuencia de desarrollo de ES (Witjaksono y Litz, 1999a)</p> <p>-Medio óptimo de inducción B5+0.41µM pic</p> <p>- Identificación de cultivos tipo PEM y tipo SE</p> <p>- Estándar de sacarosa de 30g/L</p> <p>-MSP mayor número de PEMs</p> <p>-Ácido ascórbico sin efecto</p> <p>-Máxima proliferación de PEMs en medio MS con TC agar.</p>
Isham, T362, Booth 8, 'M25864'	ECI	B5m	MSP semisólido y líquido	Desarrollo: MS sin pic, sac 30 g desarrollo de cotiledonares, 90 g globulares y corazón	-MS+BA+GA3 -MS sin NH4NO3 +BA -ASP (MS+800 mg NH4+ 2200 mg KNO3+ BA	<p>- 60% multiplicación brote- raíz en ASP (Witjaksono y Litz, 1999b)</p> <p>-mayor [] gelificante aumenta número de ES y necrosis.</p> <p>-Maduración con NH4:NO3 2:1</p> <p>-Conversión de embriones de 0-5%</p> <p>- Recuperación de plántulas 2.5-5%</p> <p>- mayor número y calidad de opacos secundarios y ES de PEMs en suspensión</p>
Hass	Tejido nucelar	MS 1X, 0.5X, 2,4-D, 0-1 mg/L, pic+AIB	MS sin RC	ABA [] Agar 20 g/L Multiplicación BA+AG3+Pic diferentes []	-BA-AG3 -BA-AIB -Ac. ascórbico -Inmersión temporal sales minerales Anderson - 2 fases medio bajo en nitratos sin RC	<p>-Ac. Ascórbico 400 mg/ L reduce necrosis- oxidación (Vidales-Fernandez et al., 2003)</p> <p>- caseína hidrolizada aumenta # de ES</p> <p>-20% desarrollo callo en MS+ 2,4-D</p> <p>-mayor [] de agar acelera maduración con embriones de menor tamaño</p> <p>-Manitol necrosis 90%</p> <p>-10% germinación con sales Anderson</p>

					seguido de MS-BA	sin RC y en MS +BA	
Duke 7	ECI	MSP	S-MSP L-MSP	B5, ABA diferentes [] PEG, sorbitol -Diferentes fuentes de Nitrógeno: aminoácidos Jensen, glutamina, caseína hidrolizada y extracto de levadura		-ABA mostro efecto negativo - PEG y sorbitol reducen # de WOSEs -aminoácidos Jensen mejoran maduración con 40% regeneración de WOSEs - Todas las otras fuentes de N se redujo maduración	(Márquez-Martín et al., 2003)
Fuerte, Hass, Lima Late and 'T362'	ECI	B5m+pic	MSP L-MSP con modificación f NH4, NO3-	Transferencia papel filtro MSP rayos gamma Transferencia a L-MSP MS+ AC	MS modif NH4NO3+BA+GA3	-Irradiación de 10 Gy incrementa el # de embriones maduros -más de 25 Gy estimula la etapa corazón -desarrollo de brotes 2-10%'T362', y Fuerte' 16-37%. -Germinación 5-23% 'T362' y 0-3%'Fuerte'	(Witjaksono y Litz, 2004)
Anaheim	ECI	MSP	MSP L-MSP	B5+AC (agua de coco) MS, ABA	M1 (MS 0.5X+BA)	-B5+AC esencial para germinación de WOSEs 10-20% -B5m-AC 11-11% germinación -multiplicación brotes en BA sobrevivencia 90% -Enraizamiento de 80% con AIB	(Perán-Quesada et al., 2004)
	ECI	B5m+pic	MS3:1P (MSP modificado NH4NO3) suspensión – transformación con <i>Agrobacterium</i>	PEMs en MS sin RC		-Recuperación de ES transgénicos pero sin germinación -Cultivos modificados con AFP no presentan regeneración	(Litz et al., 2005)
Catalina	ECI	B5m + diferentes [] pic				-Mejores resultados de desarrollo en 0.6 µM pic y tamaño de fruto de 0.71 x 0.65 mm, desarrollo de embriones 66% a la 5ta semana	(Fajardo Rosabal et al., 2005)
Hass	ECI	B5mP	S-B5m+P y en	MS + AC	MS- BA+GA3	- menos del 2% produjo embriones	(Raharjo y Litz, 2005)

			suspensión		Medio multiplicación brotes: MS sin NH ₄ NO ₃ +BA	bipolares normales	
					-micro injerto en MS + carbón activado	- rescate de re generantes por hendidura superior de injerto lateral 68-72% - Recuperación depende de vástago 59-100% -Recuperación de planta ex vitro 52-76%	
Vero	Nucelos de frutos inmaduros infectados con ASBVd	B5mP	MSP- inóculo en medio líquido MS3: 1N y subcultivo en MS + 12 mg NH ₄ NO ₃ + 30.3 mg KNO ₃ +PIC+45 g sac	MS sin RC	MS+ BA+GA3	-Embriones blancos opacos hiperhídricos 56.4%	(Suarez et al., 2006)
Beach		+45g sac				-65% de germinación	
Hass						- El tejido nucelar estimula la variación del virus	
'Suardia' 'Hass	ECI	B5mP	L-MS3: 1N+ pic-Transformación de cultivos con <i>Agrobacterium</i>	MS+AC	MS+BA+GA3- micro injerto	-Éxito de microinjerto de 66-100% -Ex vitro 51-74% -Germinación 3 semanas en medio basal MS	(Litz et al., 2007)
Hass	ECI	B5mP	MSP Suspensión de PEMs en MS + NH ₄ 12mg + NO ₃ 30 mg (línea de protoplastos aislados de cultivos embriogénicos)- transformación	MS + AC+ 45 g sac	MS+ BA+ GA3	-Baja recuperación de plántulas , no desarrollaron brote y raíz -Brotes bipolares menos de 0.001 % de ES -Botes transformados de Hass, rescatados por micro injerto 83.6% - en vivero 74.5%	(Raharjo et al., 2008)
Duke 7	ECI	MSP	MSP Callo friable en L-MSP	B5m	M1	-Callos con sorbitol pierden competencia embriogénica -mayor producción de ES maduros a [] más altas de gelificante -PEG y sorbitol sin efecto -10g de agar mejora germinación de WOSEs 17 %	(Márquez-Martín et al., 2011)
Anaheim	ECI	MSP	L-MSP	B5m	M1	-Histología. Cultivos ES- Citoplasma denso, nucléolo voluminoso, acumulación	(Márquez-Martín et al., 2012)

						de amiloplastos, células poco vacuoladas y pequeñas. -Cultivos PEM- células grandes muy vacuoladas, actividad mitótica desigual y epidermis discontinua. -En cultivos tipo SE, el número más alto de ES se observó en cultivos que crecieron en suspensión por 9 días y 0.4 g inóculo. -En cultivos tipo PEM incremento de ES con un inóculo de 0.5 g el cual llevo hasta 5-6g en 29 días	
Duke 7	ECI	MSP	MSP- transformación 3 líneas	B5m -Etapa intermedia en medio líquido MS por 3 d seguido de medio sólido 1 mes y luego (1) líquido MS 0.3X + AIB, (2) brotes en B5 + BA	MS + BA+GA3	-ES más sensibles a kanamicina que PEMs, restringe proliferación igual que cefotaxima. -Mejora de tasa de germinación en medio L-MS+BA+ GA3 previo a tratamiento intermedio líquido a semisólido. -Germinación de 0.5-2%	(Palomo-Ríos et al., 2012)
Duke 7	ECI	MSP	MSP L-MSP inóculo callo	Cultivo de ES en membranas de acetato de celulosa en medio B5m10A Subcultivo a diferentes tiempos con AC+ 45 g sac B5m10A-S-AC	MS +BA + GA3	-La membrana de celulosa mejora el aspecto y el número de WOSEs pero no el tamaño -WOSEs en medio B5m10A por 5sem + 5sem en B5m10A-S-AC redujo necrosis y favoreció maduración en membrana de celulosa 45%	(Palomo-Ríos et al., 2013)
'Reed', 'Hass', 'Duke 7' 'A10'	ECI	MSP	MSP	Tipo PEM y SE 100 mg en B5m+ AC -Sistema S-SED con aminoácidos		-Identificación de proteínas relacionadas con el estrés y en el metabolismo en cultivos tipo PEM y tipo ES	(López Encina et al., 2014)
'Reed', 'Hass', 'Duke	ECI	B5mP sin NH4NO3	-MSP -MMSE (B5m +vit	WOESs DE MMSES-S-SED (MS 4 mg /L, 0.5 mg, BA, 1 mg GA3, 45 g	MS + BA + GA3 + 45 g	-ES viables durante 11 meses en MMSE	(López Encina et al., 2014)

7'A10'			MS+ EDTA +2,4-D + glutamine+ AC+ 60 g sac)	sacarosa, 100 ml AC. glutamina (0,5, 1, 2 o 4 g) o prolina (0,1, 0,2 o 0,4 g). -sistema de dos pasos con y sin prolina (0,4 g /L) o glutamina (1 g /L) L-SED (12-15d), S-SED (6s)	sac+ AC -Crecimiento de plántulas en S-SED + carbón activado sin RC - Brotes en MS sin NH4NO3+IBA 3d- transferidos MS sin NH4NO3 sin IBA +carbón activado	- Prolina y glutamina mejoran regeneración de 0-17.5% y 10.5% y la recuperación de brote/planta en 0-12.5% y 5% -Prolina 0.4 g/L incrementa regeneración 35% y recuperación de brotes 20% -Regeneración más alta con glutamina 1g/L en sistema de 2 pasos (58.3% y 43.3% regeneración bipolar), recuperación de brotes 36.7% Recuperación de plantas de 5-7.5%	
'Duke-7' 'Reed'	ECI	B5P	-MMSE -B5m (vit. MS, 0.4g glutamina, 2,4-D, agua de coco, 60 g sac.	Embriones globulares 3-4 semanas para criopreservación		40% de viabilidad celular requerida para establecer cultivo embriogénico	(O'Brien et al., 2016a)
'A10, 'Reed', 'Velvick' y 'Duke-7'	ECI	B5P	MMSE			- Vitricación Droplet viabilidad 100, 85 y 93%. - Vitricación Cryovial 91, 73.86 y 80% -Recuperación de ES viables 65-100% a 3 meses y 67 y 59% a 12 meses.	(O'Brien et al., 2016b)
Duke 7	ECI	MSP	L-MSP- transformación callo	B5m10A sobre membrana de celulosa (5+5 semanas) WOSEs en B5m10A + AC + 45g sac sin membrana 5 s	MS + BA+ GA3 Los que no germinaron brotes en MS+BA+TDZ- 4 s, luego 4 sem en MS+BA -Injerto	-Frecuencia de maduración de 4-15% -Medio con TDZ mejora respuesta de explantes, desarrollo de brotes en 40-50%. -Micro injerto en MS+BA, éxito de 60-80%	(Palomo-Ríos et al., 2017)

var. Drymifolia e híbrido Zutano acesione s, Celaya 79, Comonfort 53, San Miguel, BG24, BG181 y Zutano	ECI	E. directa: B5+ +ANA (2, 5 o 10 mg/ L) 2,4- D (5 o 10 mg/ L), picloram (0.05, 0.1 o 0.2 mg). E. Indirecta: sales B5+1 g/ L de c. activado, 0.2 mg /L de picloram	-Directa: ES -Indirecta: Callo en B5 mismo medio	B5+carbon activado + 0.2 mg picloram	B5+vitaminas+ 50 g sacarosa + 0.5 BAP + 1mg AG3 Enraizamiento B5 + AIB +30 g sac	-Germinación de embriones maduros con 0.5 BAP y GA3 - Solo variedad San Miguel respondió al proceso de embriogénesis. -Inducción de embriogénesis indirecta con 0. 2 mg de picloram, regeneración de 46% y 10 mg de ANA 40% - San Miguel 45% con picloram - Formación de ES 66.6% con 10 mg ANA y 46.6% con 0.2 mg de picloram -E. indirecta germinación 66 y 60% y plántulas 45 y 44%	(Quintero-Jiménez et al., 2020)
“Hass” “Criollo”	ECI	MSP (formación de callo- 7 meses)				-Identificación de diferencias entre CE y CNE. - Identificación de proteínas en CE y CNE -Vía de fenilpropanoidse activa en CE asociada con la tolerancia de respuestas al estrés, mediante el refuerzo de la pared celular y la producción de flavonoides.	(Olivares-García et al., 2020)

Cuadro S3. Análisis de las proteínas diferenciales en cultivos de callo de *Persea*, en los distintos días de cultivo, en medio de proliferación, indicando la masa molecular (MM), el punto isoelectrico (pI) y el volumen de dicha proteína para cada punto, las proteínas diferenciales en su volumen se encuentran sombreadas en azul.

ID proteína	Fold	Anova (p)	d 16	d 21	d 28	d 40	pI	MM
0	1.4337	0.644053	1726576	2081957	1861005	2475392	5.91824	26
2	1.81245	0.269462	2531151	2876148	2397311	4344994	6.39873	28
3	1.62829	0.38374	2611007	1908513	2262092	3107614	6.66456	28
4	1.20487	0.360564	3807474	4296438	4568302	4587510	5.83648	30
5	1.96366	0.0132953	1780020	1509738	1850888	2964611	6.07595	35
9	1.88194	0.0197899	2174680	2028496	1440302	1155554	6.05063	38
10	1.5935	0.545268	2731674	2264976	2283967	3609237	7.01266	38
11	1.62299	0.645237	2864835	2242198	1948039	3161655	5.22013	38
12	1.15229	0.938373	3094101	2859633	3029266	3295121	5.57233	38
13	1.47048	0.831068	1923563	1480088	1308119	1711737	6.31013	39
14	1.48066	0.547519	2237980	1895189	1799215	1511477	7.85443	39
16	1.70511	0.072629	3719305	4809716	2820765	4200519	5.54088	40
17	1.73632	0.562139	2059646	1922590	2266783	3338239	5.01258	41
18	1.17941	0.814797	2136900	2081181	1811834	2000777	5.97484	41
20	2.32151	0.300792	2466677	1062532	1375527	1527820	6.60127	41
22	1.38666	0.337235	2762879	1992472	2155114	2445591	5.1761	42
23	1.95267	0.438555	1362401	697710	919501	1020303	7.23418	42
24	1.39653	0.366635	2977474	2793846	2232152	2132052	6.12658	42
25	1.7904	0.00154023	2613685	1806173	1459830	2087030	6.41139	42
27	1.43847	0.0549998	1769435	1274478	1833303	1811269	8.40127	42
29	1.5131	0.0841891	2026626	1339382	1532797	1588612	8.07006	42
30	2.37723	0.52314	281560	669334	552269	665703	8.56051	43
31	1.39454	0.775316	508932	709725	568361	700739	5.81761	43
32	1.57351	0.222025	1956848	1414859	1243621	1392748	7.85443	43
33	1.4649	0.651288	582763	785422	634218	536161	6.81013	43
34	1.41898	0.810153	809033	1112050	1148003	972834	6.4557	43
35	1.15872	0.906055	670180	578380	595778	632810	7.73418	43
37	1.43012	0.568288	691754	827273	578463	593459	7.41772	43
38	1.69366	0.454046	1060456	1160877	685423	713029	5.40881	43
39	1.52089	0.0135744	813301	1109095	874471	1236943	5.13836	43
40	1.72367	0.048341	387793	345591	468570	595685	4.03086	43
41	1.37745	0.4702	1798706	1921279	1523013	2097870	5.36478	46
42	1.34191	0.114065	1499700	1289864	1730884	1642778	5.6478	48
43	1.27544	0.539576	2691057	2300180	2933743	2357896	6.05696	49

44	1.23241	0.325476	2433526	2999111	2897302	2634878	6.64557	50
45	1.27807	0.766524	1073694	1372258	1268632	1160337	6.74684	50
46	1.41209	0.239421	2647361	2407420	2215305	1874783	5.71698	52
47	1.49694	0.163028	3743901	3203404	2501037	2658015	5.57862	52
48	3.11663	0.0123573	1086861	1629922	2147903	689175	6.93038	53
49	2.39448	0.027047	1764299	1864206	3035414	1267672	5.35849	51
50	1.33056	0.776745	2200077	2076954	1653493	1794297	6.75949	54
51	1.27696	0.541231	1679131	1450478	1845214	1852204	5	54
52	1.58822	0.609874	2311070	1647757	2105198	2617004	6.5	54
54	1.54919	0.248055	639899	812800	991325	837673	6.66456	58
57	1.13416	0.943559	713988	629533	678328	658890	5.7673	59
64	2.06568	0.300482	633263	853004	888397	430075	4.03086	60
66	1.23155	0.82655	779288	724008	855996	695058	4.90123	60
67	1.64376	0.0275165	843958	952025	843200	1386016	6.40506	63
68	1.11309	0.622835	596975	597580	664490	663595	6.92405	63
69	1.27014	0.241482	982616	1248062	1220963	1044733	6.06962	63
70	1.50347	0.501472	639248	718811	530934	478103	6.77215	63
71	1.42775	0.738379	1800343	1777382	1885742	1320776	5.80503	64
72	1.35196	0.654362	285346	307791	227663	284710	5.67925	66
73	1.70823	0.248823	3315394	2959780	3384895	1981525	4.00617	70
74	1.38753	0.836188	1600737	2022902	1457911	1921319	6.1519	74
75	1.30401	0.376232	506009	411637	409311	533748	7.23418	73
76	1.65014	0.754747	619829	1022801	828270	720789	6.51899	74
77	1.29282	0.913205	1141025	1475137	1366190	1382630	4.14815	79
78	1.89038	0.1842	661646	908982	1250764	1041759	6.89241	80
81	1.50326	0.692805	2019580	1343471	1904691	1672553	4.85185	93
82	2.06329	0.546091	800916	743551	885440	1534163	6.21519	98
83	2.23461	0.37125	454592	826812	794951	1015837	7.40506	102
84	2.47222	0.392901	777480	1922098	886925	879034	7.03165	103
85	1.43038	0.645255	2662669	1878986	1861517	2315796	4.7037	104
87	2.48588	0.627236	1151242	1189411	2665258	1072158	5.93082	108
88	1.28349	0.692367	1776622	2095178	2153734	2280268	6.1519	119
90	1.51151	0.609484	1651381	2431997	2206000	1608981	6.44304	121
96	1.91583	0.256851	2465410	2632546	3783870	4723303	-	-
97	1.3185	0.853757	1753316	1329778	1519210	1449599	-	-

Figura S1. Geles de electroforesis de doble dimensión mostrando la selección de proteínas para análisis de los dos experimentos. En rojo se muestra las proteínas que se seleccionaron para el análisis y en morado las proteínas excluidas.

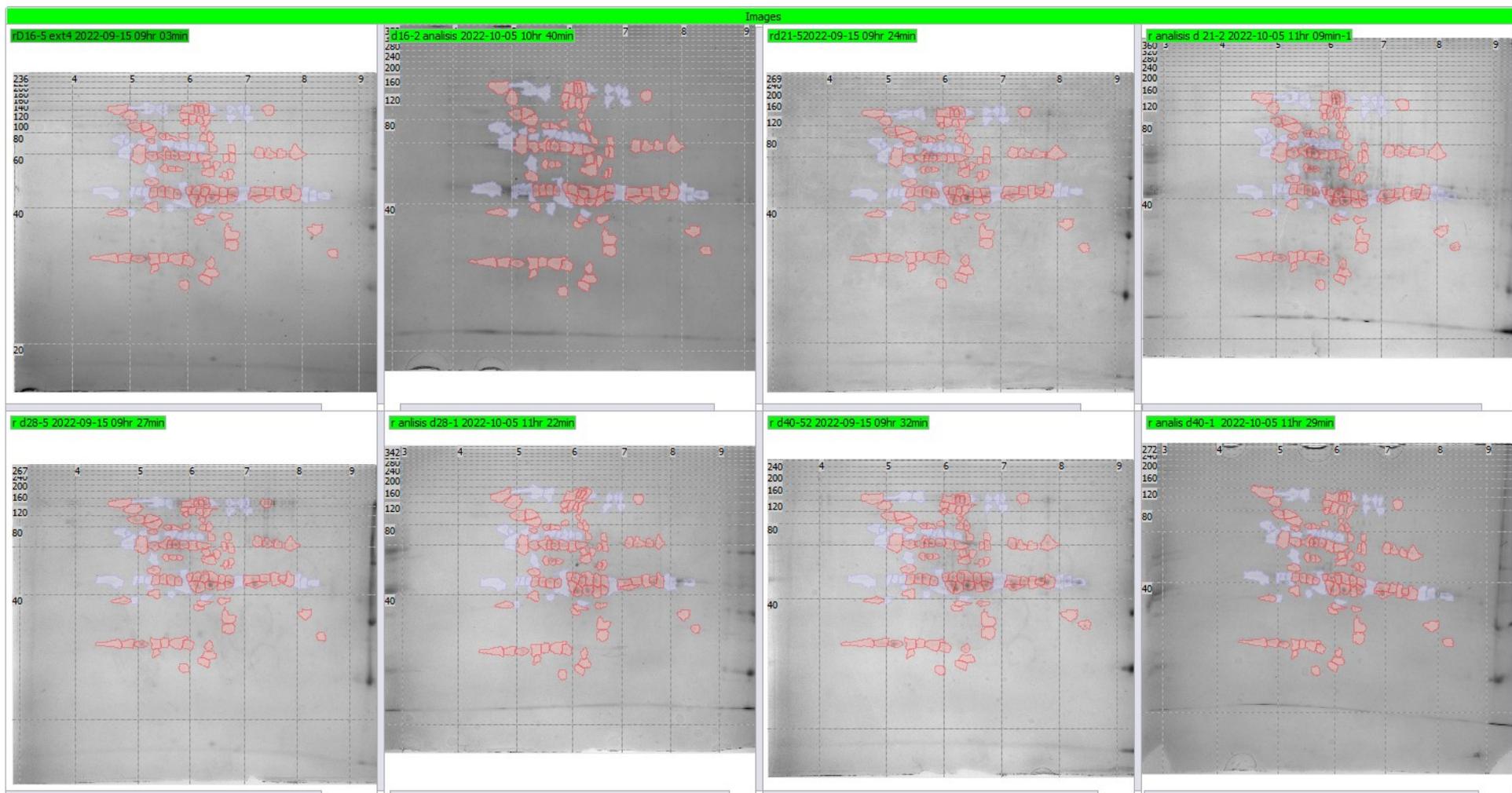


Figura S2. Geles de electroforesis de doble dimensión mostrando las proteínas seleccionadas para su identificación, en rojo se muestran el total de proteínas seleccionadas para análisis y en verde las que se filtraron por ANOVA

