



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**GENES EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE
DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS DE *Musa*
*acuminata ssp. malaccensis***

Tesis que presenta

JOSEFINA INÉS MALDONADO BORGES

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2013





Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**GENES EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE
DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS DE *Musa
acuminata* ssp. *malaccensis***

Tesis que presenta

JOSEFINA INÉS MALDONADO BORGES

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2013



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 titulado GENES EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS DE *Musa acuminata* ssp. *malaccensis* fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. Rosa María Escobedo Gracia-Medrano, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente

Dr. Felipe A. Vázquez Flota

Coordinador de Docencia

Mérida, Yucatán, México, 30 de julio de 2013.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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



M. en C. Josefina Inés Maldonado Borges

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: **Estudio de la Embriogénesis en *Musa acuminata* Colla: Un enfoque de genómica funcional**, Ciencia Básica-CONACyT (No. 0060838), bajo la dirección de la **Dra. Rosa María Escobedo Gracia-Medrano**.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al CoNaCyT por la beca otorgada no. 169880 a nombre de Josefina Inés Maldonado Borges.

Agradezco especialmente a la Dra. Rosa María Escobedo G-M, asesora de esta tesis, por su apoyo durante la realización de este trabajo.

A los miembros de mi comité tutorial, Dra. Nina Valadez, Dr. Felipe Vázquez F. Y Dr. Felipe Sánchez T., por todas sus aportaciones durante la realización de mi doctorado.

A los doctores que se incorporaron como miembros del comité predoctoral: Dr. Luis Saenz y Dra. Elizabeth de la Luz Ortiz, por sus valiosas aportaciones al mejoramiento de esta tesis.

A los doctores que se incorporaron como revisores de esta tesis de doctorado: Dra. Ruby Valdez O. y Dra. Nancy Santana B., por sus observaciones durante la revisión de la tesis.

A todos los profesores de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas especialmente a la Dra. Teresa Hernández S., Dra. Lourdes Miranda, Dr. Felipe Vázquez, Dra. Renata Rivera, Dr. Manuel Martínez, Dr. Oscar Moreno y Dr. Jose Juan Zuñiga, por su apoyo y consejo; así como a los profesores de la distintas unidades del CICY, ya que también desempeñaron una labor importante durante mi formación académica.

A los técnicos José Roberto Ku Cauich, Ángela Ku, Lucila Sánchez Cach., Yereni Minero, Elidé Avilez, Lizbeth Castro, Rosa Galaz, Miriam Monforte y el resto de los miembros de la unidad porque a todos en algún momento los necesité y estuvieron dispuestos a ayudarme.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán por permitirme formar parte de esta Comunidad Científica.

DEDICATORIAS

Este trabajo lo dedico a mi familia: mis hijos Paola Regina y Nicolás Alberto, así como a mi esposo Felipe Alberto, por su apoyo, paciencia y amor durante mis momentos estresantes del doctorado. Ellos se merecen más esta tesis. Los amo.

Mi familia es un pilar importante en mi vida y está conformada por mis 7 hermanos y mis padres, cuñados y sobrinos, que no solamente me apoyan en el cuidado de mis hijos, sino que le dan luz y alegría a mi vida. Eso no tiene precio.

También agradezco el apoyo que me brinda mi familia política; suegros y cuñados.

A mis amigos y compañeros durante el doctorado, que con su alegría han llenado de momentos felices mi corazón: Naivy, Ceci, Rocío, Martitha, Sadrak, Jorge, Elidé, Luci, Yereni, Angélica, Adrián, Emmanuel, Manuela, Susi, Carlos, Daniela, Wendy, si olvidé a alguno, por favor una disculpa,

A Dios, que me permite levantarme cada día y que me da la fuerza para enfrentar la vida.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	7
ANTECEDENTES.....	7
1.1 EL GÉNERO <i>MUSA</i>	7
1.2 CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES.....	13
1.3 EXPRESIÓN DE GENES DURANTE EMBRIOGÉNESIS.....	16
1.4 TÉCNICA cDNA-AFLP.	25
HIPÓTESIS.....	28
OBJETIVO GENERAL.	28
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	28
JUSTIFICACIÓN.....	28
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	29
CAPÍTULO II	39
IMPROVE MATURATION AND GERMINATION OF <i>MUSA ACUMINATA</i> COLLA (AA) SSP., <i>MALACCENSIS</i> SOMATIC EMBRYOS BY TEMPORARY CHANGES IN THE CULTURE MILIEU.....	38
2.1.ABSTRACT.....	39
2.2. INTRODUCCION.....	40
2.3. MATERIALS AND METHODS	41
2.3.1. PLANT MATERIAL	41

2.3.2. CULTURE CONDITIONS, FOR IZE GROWTH, MATURATION AND GERMINATION, AND INDUCTION OF SOMATIC EMBRYOGENESIS	41
2.3.3.LIGHT AND SCANNING ELECTRON MICROSCOPY (SEM).	43
2.3.4. STATISTICAL ANALYSIS.....	43
2.4. RESULTS AND DISCUSSION.	44
2.4.1. EFFECT OF ZEATIN ON THE DEVELOPMENT OF IZE, AS REVEALED BY THE PERCENTAGE OF GERMINATION	44
2.4.2. EFFECT OF AUXIN AND ZEATIN ON SOMATIC EMBRYOGENESIS OF IZE.....	45
2.4.3. EMBRYOGENIC CALLUS PROLIFERATION AND INITIATION OF SUSPENSION CULTURES.....	46
2.4.4. INFLUENCE OF SUGAR AND WATER AVAILABILITY ON SOMATIC EMBRYO MATURATION AND GERMINATION.....	48
CAPÍTULO III	59
GENES EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS DE MUSA	59
3.1.RESUMEN	59
3.2. INTRODUCCIÓN	60
3.3. MATERIALES Y METODOS	62
3.3.1. MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CULTIVO	62
3.3.2 EXTRACCIÓN DE RNA	63
3.3.3 SÍNTESIS DE cDNA-AFLP DE CADENA SENCILLA	64
3.3.4 LA TÉCNICA cDNA-AFLP	65

3.3.5 OBTENCIÓN DE SECUENCIAS DE TDFs .	66
3.4. RESULTADOS	67
3.5. DISCUSIÓN.	82
CAPÍTULO IV	99
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	99
4.1. CONCLUSIONES.	99
4.2. PERSPECTIVAS.	99
ANEXOS.	101

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Origen hipotético del surgimiento de los bananos y plátanos comestibles actuales..	9
Figura 1.2 Características botánicas sobresalientes de los bananos y plátanos...	10
Figura 1.3 Principales países productores de banano en el periodo de 1997 a 2007 según los datos de la FAO, 2008 (Food and Agriculture Organization of the United Nations).....	12
Figura 1.4 Modelo que esquematiza la formación del embrión cigótico y somático en angiospermas. La embriogénesis somática es similar en morfología y desarrollo a la embriogénesis cigótica..	13
Figura 1.5 Tipos de genes expresados durante el desarrollo de la semilla...	17
Figura 1.6 Representación esquemática de varios tipos de genes relacionados con la ES en plantas superiores.....	18
Figura 1.7 Diagrama de la técnica cDNA-AFLP. Eco RI, Mse I: enzimas de restricción. ..	26
Figura 1.8 Estrategia experimental planteada para este trabajo.	29
Figure 2.1 Different stages of <i>M.a.m.</i> somatic embryogenesis... ..	47
Figure 2.2 Evolution of <i>M.a.m.</i> somatic embryos formed after 60 days of plating aliquots of embryogenic suspension on PGR-free MS medium showing the effect of sucrose concentration and filter paper (FP) on water availability to embryo maturation.....	50
Figure 2.3 Percentage germination of <i>M.a.m.</i> somatic embryos under MS media with different PGR concentrations.....	53
Figura 3.1 Electroforesis en gel de agarosa al 1% del RNA total extraído con un protocolo adaptado para <i>M.a.m.</i>	69
Figura 3.2 Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la amplificación de un fragmento del gen 18S a partir de cDNA de banano.....	69

Figura 3.3 Gel de poliacrilamida al 6% del cDNA-AFLP realizado sobre distintos estadios de la embriogénesis de *M.a.m.* 71

Figura 3.4 Fragmentos de transcritos expresados diferencialmente durante distintos momentos de la embriogénesis de *Musa*..... 73

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1 Géneros y secciones que integran a la familia de las musáceas con algunos ejemplos de especies..	8
Cuadro 1.2 Tipos de explantes utilizados para inducir la embriogénesis somática en <i>Musa</i>	15
Cuadro 1.3 Tipos de genes que se expresan durante ES.	18
Cuadro 1.4 Nombre de las proteínas involucradas en embriogénesis y especies de monocotiledóneas en donde han sido detectadas.	22
Table 2.1 Effect of zeatin ZEA on the development of <i>M.a.m.</i> IZE after 30 days on MI media free of PGR (D0, control) and with ZEA (D1, D2)....	45
Table 2.2 Proliferation of <i>M.a.m.</i> embryogenic calli initiated from IZE under different PGR treatments (I1 to I6, as in Table 1).	48
Cuadro 3.1 Material vegetal utilizado para la extracción de RNA y subsecuente técnica de cDNA-AFLP en <i>Musa</i>	68
Cuadro 3.2 Pares de Adaptadores y Cebadores utilizados durante la amplificación selectiva del AFLP.	70
Cuadro 3.3 Clasificación de los TDFs encontrados en <i>M.a.m.</i> que no tuvieron homología con proteínas conocidas o caracterizadas....	75
Cuadro 3.4 Clasificación de los TDFs encontrados en <i>M.a.m.</i> con homología a proteínas conocidas.	77
Cuadro 3.5 Categorías de clasificación de TDFs durante los estadios diferenciales de la embriogénesis de <i>Musa</i>	80
Cuadro 3.6 Clasificación de las secuencias de TDFs encontrados en este trabajo de acuerdo a su homología, el estadio de desarrollo y el proceso embriogénico.....	81

ABREVIATURAS

DNA: Desoxirobonucleic acid.

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism.

cDNA: complementary Desoxirobonucleic acid.

dpf: días posteriores a la fertilización.

EC: embriogenesis cigótica.

ECl: Embrión cigótico inmaduro

ECM: Embrión cigótico maduro

ES: embriogenesis somática.

ESl.: Embrión somático inmaduro

ESM.: Embrión somático maduro

ha: hectáreas

M.a.m.: *Musa acuminata* ssp. *malaccensis*.

MEB: Microscopía electrónica de barrido.

mM: milimolar

RCV: reguladores del crecimiento vegetal.

RNA: Ribonucleic acid

SCE.: Suspensión celular embriogénica

ton.: toneladas.

RESUMEN

En este estudio se analizó el perfil de expresión de los genes involucrados en los estadios de desarrollo temprano y tardío de la embriogénesis somática de *Musa acuminata* ssp. *malaccensis* y se comparó con el perfil de aquellos expresados en la embriogénesis cigótica de la misma especie, utilizando para ello la técnica de cDNA-AFLP, misma que permitió distinguir diferencias en la expresión de genes entre ambos procesos.

Para ello, primero se desarrolló el protocolo de embriogénesis somática *in vitro* sobre embrión cigótico inmaduro de *M.a.m.* En este trabajo se implementó un paso en el protocolo que mejoró la maduración de embriones somáticos a partir de suspensiones embriogénicas, lo que resultó en el incremento de los porcentajes de germinación de los embriones somáticos y su conversión a planta. Con este material del proceso de embriogénesis somática y los embriones cigóticos colectados en campo, se desarrolló el estudio arriba señalado mediante cDNA-AFLP.

De los perfiles de transcripción de los embriones cigóticos y somáticos analizados se observó que solamente el 8% de los fragmentos derivados de transcritos (TDFs) mostró expresión diferencial. Se encontró una mayor proporción de transcritos de genes expresados en embriogénesis somática y generalmente ocurrió en estadios tempranos del desarrollo de los embriones.

ABSTRACT

In this study the expression profiles of genes involved in the early and late developmental stages of *Musa acuminata* ssp. *malaccensis* somatic embryogenesis were analyzed, and compared to those profiles obtain from correlative stages of zygotic embryogenesis of the same species, for this purpose, the method of cDNA-AFLP was employed, which permitted the differentiation of genes expressed in both processes.

To this end, an *in vitro* protocol for the initiation of *M.a.m* somatic embryogenesis through immature zygotic embryos culture was employed. In the present work a maturation step was added to the existing protocol to enhance the differentiation of somatic embryos via embryogenic cell suspensions, which resulted on the increased frequencies of embryos germination and plant conversion. By this means, the different stages of somatic embryogenesis and of zygotic embryos collected from field plants were available for development of the study using cDNA-AFLP.

Analyses of the transcription profiles of the zygotic and somatic embryos provide evidence that only 8% of transcripts derived fragments (TDFs) were express differentially. We found a higher proportion of transcripts of expressed genes in somatic embryogenesis, commonly in the early stages of embryo development.

INTRODUCCIÓN

Los bananos y plátanos son plantas monocotiledóneas que forman parte de la familia de las Musáceas (INIBAP, 2001). Los plátanos constituyen una fuente de alimentos importante en partes de África, sur de India y en toda la América tropical. Esto es debido a la estabilidad y relativa facilidad de producción de este fruto y alto valor nutritivo del mismo. El plátano es un alimento básico de la canasta familiar en los países africanos y latinoamericanos. Se diferencia del banano y de las demás frutas en que requiere cocción antes del consumo. A pesar de que México no figura a nivel mundial como productor de plátanos, ocupa el octavo lugar mundial en la producción de bananos; su producción en 1997 fué de 1.7 millones de toneladas y para el año 2007, la producción aumentó a 1.9 millones (FAO, 2008). Los principales cultivares son triploides, altamente estériles, partenocárpicos y de propagación vegetativa. También son susceptibles a varias enfermedades que amenazan seriamente a las plantaciones de todo el mundo (Aguilar et al., 2008).

La mayor parte de la investigación realizada en el género *Musa* se ha enfocado en mejorar la calidad de la fruta, la condición de enanismo de la planta (para contrarrestar su volcamiento) y la resistencia del germoplasma a las enfermedades. En este sentido, la embriogénesis somática en un gran número de cultivares de *Musa* ofrece grandes expectativas para el uso de esta tecnología como plataforma para el mejoramiento genético de bananos y plátanos (Aguilar et al., 2008).

En plantas, la embriogénesis no está restringida a la fecundación de la célula huevo, también puede ser inducida en las células somáticas. En la embriogénesis somática, las células se desarrollan en embriones a través de diferentes fases o estados morfológicos característicos de la embriogénesis cigótica, pero sin la previa fusión de los gametos (Williams y Maheswaran, 1986). La adquisición de la competencia embriogénica en células somáticas involucra una fase de inducción, en la cual las células utilizan su totipotencia para adquirir la competencia necesaria para responder a las señales embriogénicas; dicha fase no existe en la embriogénesis cigótica (Pasternak et al. 2002; Dodeman et al., 1997). Estas fases se caracterizan por distintos eventos bioquímicos y moleculares. Debido a las dificultades e inanccesibilidad del embrión cigótico, los trabajos sobre mecanismos

INTRODUCCIÓN

moleculares relacionados con embriogénesis se realizan preferentemente en embriones somáticos, ya que probablemente tengan un patrón de expresión de genes semejante (Suprasanna y Bapat, 2006; Merkle et al., 1995).

El análisis de la expresión de genes es una herramienta importante para entender y controlar los procesos morfogénéticos que ocurren en plantas. La embriogénesis es un proceso complejo regulado por un gran número de diferentes grupos de genes (Dong y Dunstan, 1999; Thomas, 1993). La regulación de la expresión de genes en plantas juega un papel importante en el desarrollo, en la diferenciación celular y las respuestas ante estrés. Por consiguiente, en estudios de genómica funcional, la embriogénesis somática es un elemento imprescindible para validar genes relacionados con determinados procesos (Campbell et al., 2003; Chugh y Khurana, 2002).

En este contexto, la identificación de genes específicos o estadio-específicos, expresados diferencialmente durante distintos momentos de la embriogénesis somática es imprescindible para entender los mecanismos moleculares y fisiológicos que controlan estos procesos (Low et al., 2008; Fu et al., 2002; Jung et al., 1997; Marrs et al., 1993) y para establecer sistemas de propagación clonal altamente eficientes. Aunque las fases del desarrollo de embriones cigóticos y somáticos ya han sido caracterizadas por la acumulación de distintos juegos de ARNm y sus correspondientes proteínas; un entendimiento completo del fenómeno todavía está lejos del alcance para una gran variedad de especies, entre ellas *Musa* (Chakrabarty et al., 2003; Dong y Dunstan, 1996; Goldberg et al., 1989).

El cDNA-AFLP es una de las metodologías más utilizadas para detectar los patrones de expresión de determinados genes; se basa en la amplificación de fragmentos polimórficos en longitud (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP) para detectar genes expresados diferencialmente. El ARNm se transcribe de manera reversa a ADNc de doble cadena que sirve como templado para la técnica estándar de AFLP. De esta manera se pueden detectar transcritos específicos en células, tejidos u órganos para aislar los genes correspondientes a determinados estímulos (Bachem et al., 1996). Es una técnica eficaz, sensible y reproducible que no requiere información previa de las secuencias; siendo por consiguiente, una herramienta útil para la identificación de nuevos genes en organismos no-modelos (Zago et al., 2006; Ditt et al., 2001; Durrant et al.,

2000).

En este trabajo nos planteamos como objetivo comparar los perfiles de expresión de los fragmentos derivados de transcritos (TDFs) obtenidos mediante cDNA-AFLP, tanto de embriones cigóticos como somáticos de *Musa acuminata* ssp. *malaccensis* (M.a.m.) en distintos momentos del proceso embriogénico. Los resultados evidencian la existencia de diferencias estadio-temporales en la expresión de genes, ya que hubo genes expresados en embriones cigóticos que difieren a los expresados en embriones somáticos, tanto en estado maduro como inmaduro.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar M. E., J. Ortiz y J. Sandoval (2008) Embriogénesis somática en plátanos y bananos: perspectivas y limitaciones Serie técnica. Boletín técnico/CATIE; no.27, 1ed. Turrialba, C.R: CATIE, 50p.
- Bachem C., R. S. van der Hoeven, S.M. de Bruijn, D. Vreugdenhil; M. Zabeau y R. G. Visser (1996) Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant Journal*, 9(5): 745-753.
- Campbell M., A. Brunner, H. Jones y S. Strauss (2003) Forestry's fertile crescent: the application of biotechnology to forest trees. *Plant Biotechnology Journal*, 1: 141-154.
- Chakrabarty D., K. Yu y K. Paek (2003) Detection of DNA methylation changes during somatic embryogenesis of Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*). *Plant Science*, 166: 61-78.
- Chugh A. y P. Khurana (2002) Gene expression during somatic embryogenesis: recent advances. *Current Science*, 83: 715-730.
- Ditt R., E. Nester y L. Comai (2001) Plant gene expression response to *Agrobacterium tumefaciens*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 98: 10954-10959.

INTRODUCCIÓN

- Dodeman V., G. Ducreux y M. Kreis (1997) Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany*, 48: 1493–1509.
- Dong J. y D. Dunstan (1996) Expression of abundant mRNAs during somatic embryogenesis of white spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss]. *Planta*, 199: 469–476.
- Dong J. y D. Dunstan (1999) Cloning and characterization of six embryogenesis-associated cDNAs from somatic embryos of *Picea glauca* and their comparative expression during zygotic embryogenesis. *Plant Molecular Biology*, 39: 859–864.
- Durrant W., O. Rowland, P. Piedras, K. Hammond-Kosack y J. Jones (2000) cDNA-AFLP reveals a striking overlap in race-specific resistance and wound response gene expression profiles. *Plant Cell* 12: 963–977.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations (2008).
- Fu S., R. Meeley y M. Scanlon (2002) Empty pericarp2 Encodes a Negative Regulator of the Heat Shock Response and Is Required for Maize Embryogenesis. *Plant Cell*, 14 (12): 3119-3132.
- Goldberg R., S. Baker y L. Perez (1989) Regulation of gene expression during plant embryogenesis. *Cell*, 56:149–160.
- INIBAP (2001) Taxonomía de los bananos. Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y el Plátano.
- Jung W., R. Skadsen y D. Peterson (1997) Cloning and characterization of an early embryogenesis gene, EEA1 (Accession No. AF017430), from barley. *Plant Physiology*, 115: 1730-1731.
- Low E., H. Alias, S. Boon, E. Shariff, C. Tan, L. Ooi, S. Cheah, A. Raha, K. Wan y R. Singh (2008) Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue culture ESTs: Identifying genes associated with callogenesis and embryogenesis. *BMC Plant Biology*, 8 (1): 62.

- Marrs K., E. Casey, S. Capitant, R. Bouchard, P. Dietrich, I. Mettler y R. Sinibaldi (1993) Characterization of two maize HSP90 heat shock protein genes: expression during heat shock, embryogenesis, and pollen development. *Developmental. Genetics*. 14 (1): 27-41.
- Merkle S.A., W.A. Parrott y B.S. Flinn (1995) Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: Thorpe T.A. (ed.), *In Vitro Embryogenesis in Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 155-203.
- Pasternak T.P., E. Prinsen, F. Ayaydin, P. Miskolczi, G. Potters, H. Asard, H.A. Van Onckelen, D. Dudits, y A. Fehe'r (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.
- Suprasanna P. y V. A. Bapat (2006) Differential gene expression during somatic embryogenesis. *Plant Cell Monographs*, 2: 305-320.
- Thomas T. (1993) Gene expression during plant embryogenesis and germination: an overview. *The Plant Cell*, 5: 1401-1410.
- Williams E. y G. Maheswaran (1986) Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Annals of Botany*, 57: 443-462.
- Zago E., S. Morsa, J. Dat, F. Alard, A. Ferrarini, D. Inze, M. Delledonne y F. Van Breusegem (2006) Nitric oxide- and hydrogen peroxide responsive gene regulation during cell death induction in tobacco. *Plant Physiology*, 141: 404-411.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 El género *Musa*

- **Clasificación Taxonómica**

Según Nieves (2007), la clasificación taxonómica de los bananos y plátanos es la siguiente:

Clase: Monocotiledónea

Orden: Escitaminales (6 familias)

Familias: Musaceas (3 subfamilias)

Subfamilias: Musoideae

Géneros: *Musa* (5 regiones)

Sección: *Eumusa*

Especies: *M. acuminata* y *M. balbisiana*

En el cuadro 1.1 se presentan los géneros que componen a la familia de las Musáceas, cuya distribución se extiende desde África occidental hasta el Pacífico, siendo su origen el sudeste de Asia predominantemente. Los géneros se distinguen entre sí principalmente en base a las características de sus frutos, dividiendo al género *Musa* en cuatro secciones (INIBAP, 2001).

Cuadro 1.1 Géneros y secciones que integran a la familia de las musáceas con algunos ejemplos de especies.

FAMILIA: MUSACEAS	
GÉNERO MUSA	GÉNERO ENSETE <i>E. ventricosum</i> (Welw) Cheesm.
SECCIÓN: <i>Callimusa</i>	
SECCIÓN: <i>Australimusa Musa textilis</i>	
SECCIÓN: <i>Rhodochlamys</i>	
SECCIÓN: <i>Eumusa</i> 11 ESPECIES <i>Musa acuminata</i> (genoma A) <i>M. balbisiana</i> (genoma B)	

El género *Musa* comprenden genotipos tanto silvestres como cultivados con considerable diversidad genética y un amplio rango de características morfológicas. En general, los bananos pueden ser clasificados en base a su genoma en cuatro grupos-A, B, S y T- representados por *M. acuminata* ($2n=2x=22$), *M. balbisiana* ($2n=2x=22$), *M. schizocarpa* ($2n=2x=22$) y *Australimusa* ($2n=2x=20$) respectivamente. El tamaño haploide del genoma de los bananos es relativamente pequeño de 500 a 600 Mpb (Lysak *et al.*, 1999).

Todas las variedades de banano y plátano cultivadas en la actualidad han surgido de especies de la sección *Eumusa*, siendo esta la más amplia y la más propagada geográficamente, con especies que crecen desde India hasta el Pacífico. La sección *Eumusa* contiene aproximadamente once especies pero la mayoría de los cultivares proceden de solo dos, *Musa acuminata* Colla (genoma A, $2n = 2x = 22$) y *Musa balbisiana* Colla (genoma B, $2n = 2x = 22$). La posibilidad de comer los frutos maduros de *M. acuminata* diploide (AA) ocurrió como resultado de mutaciones. El cruzamiento natural posterior entre estos diploides comestibles y los progenitores silvestres dio como resultado la formación de una progenie híbrida comestible y estéril con los genomas AB, AAA, AAB, ABB, AAAB, etc. Muchos de los bananos comerciales son triploides ($2n=3x=33$) con un genoma AAA, AAB y ABB originados de la poliploidización e hibridación interespecífica de las dos especies parentales mencionadas anteriormente,

que dieron origen a distintas combinaciones genómicas en tres niveles de ploidía (2x, 3x y 4x) (Figura 1.1). Estos diferentes grupos genómicos constituyen la diversidad de los bananos y plátanos comestibles que existen actualmente (Rosales y Pocasangre, 2002; Constantine y Rossel, 2001; Trehane, 1995).

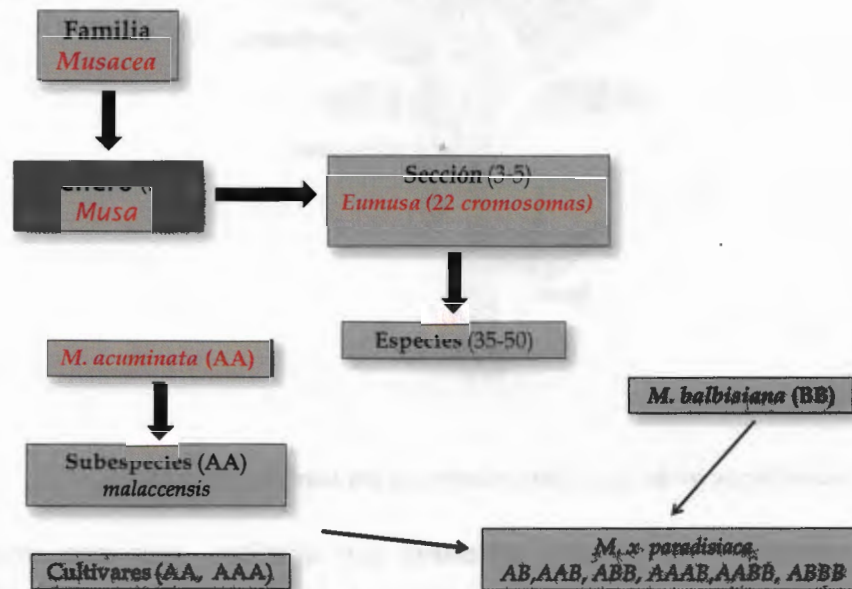


Figura 1.1 Origen hipotético del surgimiento de los bananos y plátanos comestibles actuales, Constantine y Rossel, 2001.

• Descripción botánica

Los miembros del género *Musa* son plantas herbáceas con pseudotallos aéreos que se originan de cormos carnosos en los cuales se desarrollan numerosas yemas laterales o hijuelos. Las hojas tienen una distribución helicoidal (filotaxia espiral) y las bases foliares circundan el tallo o cormo, dando origen al pseudotallo. La inflorescencia es terminal y crece a través del centro del pseudotallo hasta alcanzar el follaje superior y salir. Cada pseudotallo produce una sola inflorescencia y luego muere. La planta continúa su ciclo de vida a través de la formación de hijuelos laterales (Figura 1.2); de esta manera, la planta puede propagarse vegetativamente por tiempo aparentemente indefinido. En las especies silvestres seminíferas, la polinización es esencial para el desarrollo del fruto. El fruto maduro contiene una masa de semillas negras y duras rodeadas de una pulpa escasa y dulce que se desarrolla de las paredes del ovario y de la septa (Persley y De Langhe,

1987).

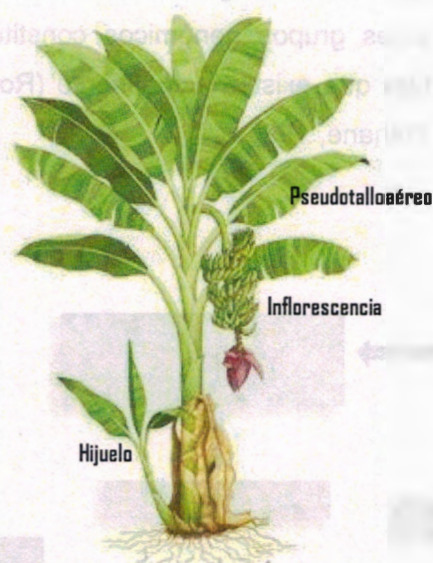


Figura 1.2 Características botánicas sobresalientes de los bananos y plátanos.

De manera particular, los bananos silvestres son diploides, producen semillas que generalmente son fértiles, siendo la polinización esencial para el desarrollo del fruto. El óvulo es fecundado en las 24 horas siguientes a la floración y el cigoto se divide en los siguientes quince días. El crecimiento del embrión es lento y la diferenciación comienza aproximadamente después de 55 días. Los meristemos apical y caulinar aparecen después de dos meses (Escalant y Teisson, 1987). En la semilla madura, el embrión presenta la forma de “hongo” característico de las Musáceas. La porción agrandada, “cabeza”, se denomina haustorio y es la parte principal del cotiledón. La porción angosta, llamada “pie”, del embrión representa el eje epicotilo-hipocotilo-radícula, así como una parte del cotiledón. Esta porción se encuentra dentro del collar del micrópilo (McGahan, 1961).

En el caso de los cultivares comerciales, estos son triploides, no producen semillas (solo en muy raras ocasiones y en contados cultivares) y para el desarrollo de los frutos no se requiere polinización (son frutos partenocárpicos) (Simmonds, 1962). La partenocarpia y la esterilidad son producto de mecanismos genéticos diferentes. Existe esterilidad genética, así como también la causada por la estructura híbrida del germoplasma. La esterilidad en los triploides es del tipo estructural; sus flores femeninas son altamente

estériles, y las flores masculinas no contienen polen viable (Rosales y Pocasangre, 2002).

- **Importancia económica**

Los bananos y plátanos son considerados componentes de la seguridad alimentaria de algunos países poco desarrollados debido a que representan la fuente de alimentación o ingresos para cerca de 400 millones de personas en 120 países; constituyendo hasta un 90% de los carbohidratos consumidos (Aert *et al.*, 2004; Roux *et al.*, 2004). Las especies económicamente importantes son generalmente triploides. Las especies diploides son la base para el mejoramiento genético y ésta es su principal utilidad; siendo muy poco utilizados como fuente de alimento, ya que generalmente son plantas delgadas, de porte alto, con producción prolífera de hijuelos, de racimos y dedos pequeños y llenos de semillas. Contrario a ello, los triploides son el producto ideal de todo programa de mejoramiento por ser plantas mucho más vigorosas, con un mayor potencial de producción, con racimos grandes y mejor conformados, frutos más largos y gruesos y; lo que es esencial, partenocárpicos y estériles (Rosales y Pocasangre, 2002).

En cuanto al área donde se cultiva una mayor cantidad de plátanos se mencionan partes de África, sur de India y en toda la América tropical, constituyendo una fuente importante de alimentos. En promedio, de 1997 a 2007 a nivel mundial se cultivaron 5,197,000 ha. de plátano. Uganda ha destinado en promedio 1, 626, 000 ha. al cultivo de plátano, seguido de Costa de Marfil, Colombia y Nigeria con 416,000; 409,000 y 398,000 ha. respectivamente. Los cuatro países representan el 55% de la superficie cosechada de plátano. Las variedades comerciales de plátano se cultivan en toda las regiones tropicales del mundo y es la fruta tropical más cultivada y una de las cuatro más importantes en términos globales, solo por detrás de la uva, los cítricos y la manzana. Sin embargo, México no figura como productor de plátanos a nivel mundial (FAO, 2008).

El área cultivada de bananos a nivel mundial muestra una tendencia a la alza. En 1997, se produjeron 60, 581,000 ton. y para 2007 fueron 81,263, 000 ton. observando un incremento del 3%. Los principales países productores de banano según la FAO (2008) son: India (22%), Brasil y Ecuador (9%), China y Filipinas (8%) respectivamente, Indonesia (6%), Costa Rica y México (3%), que en conjunto aportan el 69% del mercado mundial (Figura 1.3).

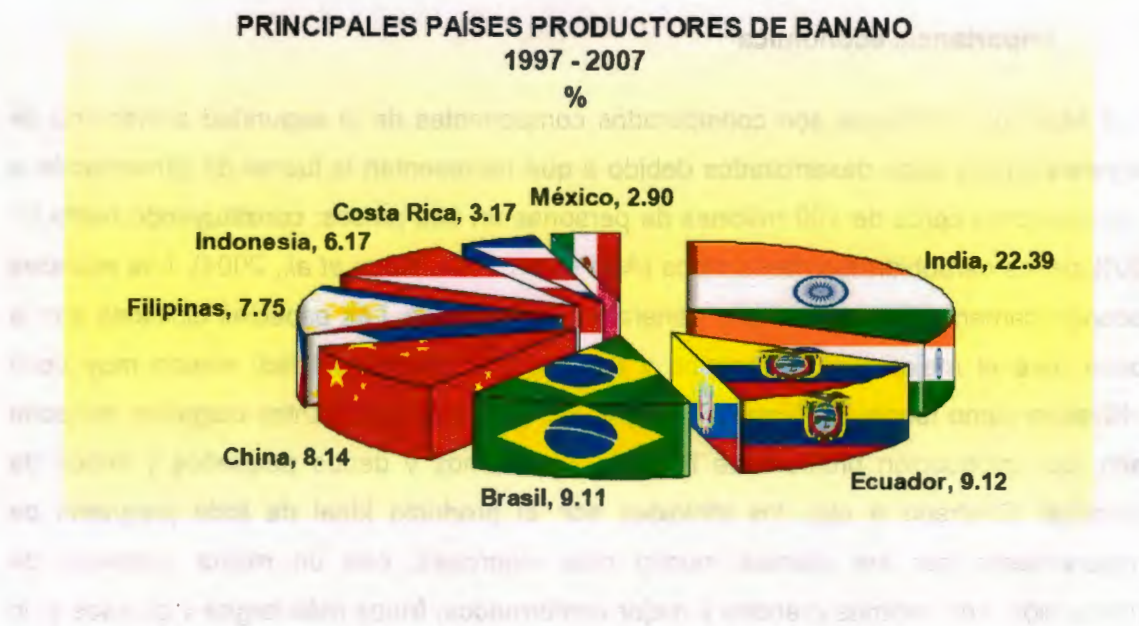


Figura 1.3 Principales países productores de banano en el periodo de 1997 a 2007 según los datos de la FAO, 2008 (Food and Agriculture Organization of the United Nations).

En México, la producción de bananos es una actividad agrícola de gran impacto económico. El principal estado productor de bananos es Chiapas con 21,115 ha. con una producción anual de 702,868 ton. Otros estados productores son Veracruz, Colima, Michoacán, Jalisco, Nayarit, Guerrero, Oaxaca, Puebla, Quintana Roo, Sinaloa, Yucatán, Campeche, Estado de México, Morelos e Hidalgo. En los 17 estados productores, incluyendo Tabasco, se tiene una superficie plantada de 76,313 ha., las cuales produjeron en el 2006, 2,196,154 ton. con un rendimiento de 29.5 ton. de fruta por ha. (SAGARPA, 2007).

Debido a que muchas de las clonas cultivadas de *Musa* son derivadas de especies silvestres como resultado de la selección continua y domesticación, es importante mantener la variabilidad de especies domésticas y silvestres mediante el establecimiento de bancos de germoplasma. La utilización del plátano y banano como alimento ha ido incrementando su valor, lo que implica la necesidad de mejorar sus rendimientos, calidad y fomentar su rápida multiplicación mediante la generación y/o mejoramiento de tecnologías, entre ellas, el cultivo de tejidos vegetales (Ramsey *et al.*, 1990).

1.2. Cultivo de tejidos vegetales

• La embriogénesis somática

La embriogénesis es uno de los procesos biológicos más importantes durante el ciclo de vida de las plantas. La embriogénesis cigótica (EC) inicia con la doble fertilización, seguida por la determinación de los tres ejes del embrión (longitudinal, lateral y radial) y los cambios morfológicos que lo caracterizan (globular, corazón, torpedo y cotiledonar en dicotiledóneas). Posteriormente, las proteínas de reserva se acumulan y finalmente, los embriones entran a un estado de desecación y dormancia. Dichos procesos son regulados por numerosos factores incluyendo fitohormonas, enzimas y otras sustancias relacionadas con la embriogénesis. Se han llevado a cabo muchos estudios utilizando diferentes estrategias experimentales para tratar de conocer los mecanismos que controlan la embriogénesis de plantas. El sistema de embriogénesis somática (ES) en el cultivo de tejidos es una de las estrategias experimentales más utilizada, ya que, como se observa en la Figura 1.4, produce embriones mediante una secuencia de desarrollo muy similar a la EC, excepto que los embriones somáticos no pasan por un estado de dormancia para poder germinar (Ikeda *et al.*, 2006; Dodeman *et al.*, 1997).

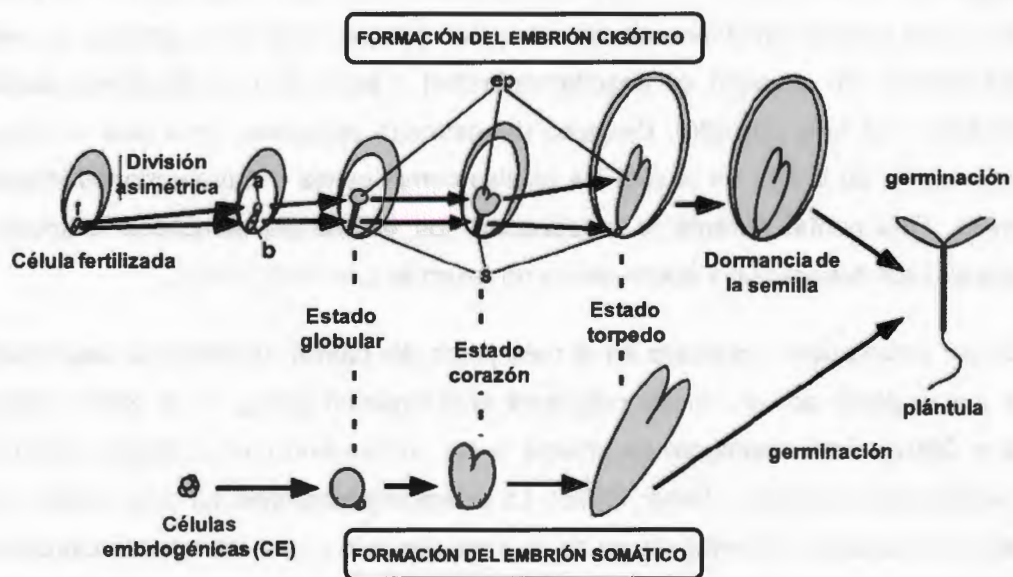


Figura 1.4 Modelo que esquematiza la formación del embrión cigótico y somático en angiospermas. La embriogénesis somática es similar en morfología y desarrollo a la embriogénesis

cigótica. a-célula apical, b-célula basal, ep- propio embrión, f-huevo fertilizado, s-suspensor (Adaptado de Zimmerman, 1993).

Para las monocotiledóneas, el patrón de desarrollo de los embriones tanto cigóticos como somáticos comprende los estados globular, escutelar y el estado de coleóptilo (Gray, 2000).

La capacidad de reproducirse vegetativamente y de iniciar el desarrollo de un embrión a partir de la reprogramación de células somáticas es una propiedad única de las plantas y de su totipotencialidad celular (Zimmerman, 1993). La ES, fue desarrollada por Steward (*et al.*, 1958) en cultivos celulares de *Daucus carota*, desde entonces dicho proceso se ha considerado una herramienta útil para la clonación de plantas. Esta especie junto con *Arabidopsis thaliana* han sido de las más utilizadas para estudios básicos de la embriogénesis, tanto sobre la regeneración de plantas como acerca de eventos morfogénicos y regulatorios tempranos en la embriogénesis (Zimmerman, 1993).

La ES ocurre cuando las células somáticas de la planta recobran su totipotencia y adquieren la competencia necesaria para responder a señales que le permiten iniciar la embriogénesis (Pasternak *et al.*, 2002). La primera fase es conocida como inducción, en ésta las células somáticas diferenciadas adquieren competencia embriogénica, ya sea de manera directa (sin un paso de dediferenciación) o indirecta (por dediferenciación e involucrando una fase de callo). Después del estímulo apropiado, esta fase es seguida por la iniciación de la ES, en la cual las células competentes o pro-embiones inician su desarrollo. Finalmente, durante la maduración, los embriones somáticos anticipan su germinación por desecación y acumulación de reservas (Jiménez, 2001).

La ES, por consiguiente, consiste en el reemplazo del patrón existente de expresión de genes del explante por un nuevo programa embriogénico (Zeng *et al.* 2007; Chugh y Khurana, 2002). Esto solamente es posible si las células son competentes y reciben el estímulo inductor apropiado (Fehér, 2005). La activación temprana del ciclo celular, el pH vacuolar más alcalino, el metabolismo de auxinas alterado y la existencia de cloroplastos no funcionales son algunas de las características que presentan las células embriogénicas competentes (Pasternak *et al.*, 2002).

Se reconocen dos condiciones inductoras de la ES que permiten a las células

diferenciadas desarrollarse en células desdiferenciadas competentes, 1) los reguladores del crecimiento vegetal (RCV) que son los niveles celulares internos o externos de diversas fitohormonas, fundamentalmente auxinas y citocininas; y 2) los factores de estrés como son: choque osmótico, medio de cultivo, deshidratación, estrés por agua, los metales pesados, alteración del pH del medio de cultivo, tratamientos de choque por calor o frío, hipoxia, antibióticos, radiación ultravioleta, tratamientos mecánicos o químicos (Lincy *et al.*, 2009; Begun *et al.*, 2007; Potters *et al.*, 2007; Karami *et al.*, 2006; Aoshima, 2005; Fehér, 2005; Patnaik *et al.*, 2005; Ikeda *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2001). Una gran cantidad de evidencia indica que los RCV actúan como señales centrales para reprogramar a las células somáticas hacia la vía embriogénica (Fehér, 2005; Jiménez y Thomas, 2005; Thomas y Jiménez, 2005; Gaj, 2004; Fehér *et al.*, 2003; Pasternak *et al.*, 2002).

A pesar de la gran cantidad de información que existe, aún falta por conocer la naturaleza exacta del mecanismo disparador de la embriogénesis, sea este físico, bioquímico o genético (Gray, 2000). En Musáceas, la ES se ha inducido a partir de diferentes tipos de explantes (cuadro 1.2). Las flores masculinas inmaduras han resultado ser el explante más adecuado para iniciar cultivos embriogénicos (Jalil *et al.*, 2003).

Cuadro 1.2 Tipos de explantes utilizados para inducir la embriogénesis somática en Musa. Con asterisco se indica el tejido más utilizado.

Explantes utilizados para inducir embriogénesis en Musa	
Tipo de explante	Autor
ápices vegetativos	Cronauer & Krikorian, 1983
embriones cigóticos	Cronauer & Krikorian, 1988 Escalant & Teisson, 1989 Marroquín <i>et al.</i> , 1993
cormo y base de hojas	Novak <i>et al.</i> , 1989
yemas adventicias	Dhed'a <i>et al.</i> , 1991
flores femeninas inmaduras	Grapin <i>et al.</i> , 2000
*flores masculinas inmaduras	Ma, 1991 Escalant <i>et al.</i> , 1994 Grapin <i>et al.</i> , 1996 Jalil <i>et al.</i> , 2003 Houllou-Kido <i>et al.</i> , 2005

1.3. Expresión de genes durante embriogénesis

En plantas con semillas, la embriogénesis involucra cambios morfológicos drásticos a través de los cuales un individuo se forma a partir de un huevo fertilizado. El proceso inicia cuando el cigoto se divide transversal y asimétricamente para formar una pequeña célula apical (el embrión) y una gran célula basal (el suspensor que mantiene unido al tejido madre y proporciona los nutrientes y reguladores de crecimiento para el desarrollo del embrión). A continuación, el desarrollo del embrión ocurre en tres pasos: 1) el establecimiento de la organización como un embrión, 2) la acumulación de sustancias de reserva en éste, 3) la adquisición de tolerancia a la desecación y dormancia (inactividad) de la semilla. Cada uno de estos pasos es regulado con precisión por fitohormonas, proteínas, factores de transcripción y otras moléculas relacionadas con la embriogénesis (Umehara *et al.*, 2007).

En la Figura 1.5 se esquematizan las distintas etapas del desarrollo y diferenciación del embrión cigótico, durante las cuales se expresan genes de manera constitutiva (genes de mantenimiento o housekeeping). También se ha detectado la expresión de genes de manera estadio-específica. Por ejemplo, en etapas tempranas de la morfogénesis; durante estadios inmaduros del embrión, se expresan genes que pueden diferir a los que se expresan en el estado maduro (estadios torpedo y cotiledonar). Para que ocurra el crecimiento se requiere de la replicación del ADN, acumulación de tubulinas, reensamblamiento de la red microtubular y finalmente mitosis. Asimismo, durante la desecación, el embrión pasa por un periodo de dormancia, en el cual, la actividad del ciclo celular se suprime. Finalmente, al terminar la embriogénesis, la emergencia de la radícula marca el inicio de la germinación. (De Castro y Hilhorst, 2000).



Figura 1.5 Tipos de genes expresados durante el desarrollo de la semilla. Adaptado de De Castro y Hilhorst (2000).

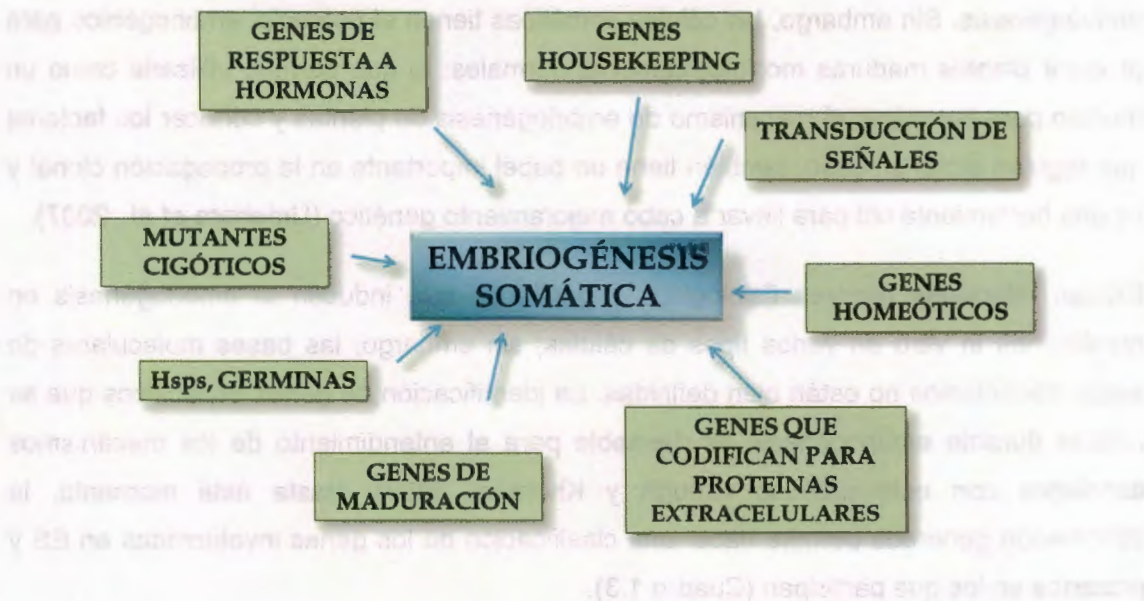
Debido a que el desarrollo del embrión ocurre dentro del tejido materno, la inaccesibilidad física de los embriones cigóticos ocasiona que los análisis bioquímicos y moleculares sean difíciles. Por consiguiente, se conoce muy poco sobre los eventos tempranos de la embriogénesis. Sin embargo, las células somáticas tienen el potencial embriogénico para producir plantas maduras morfológicamente normales, lo que permite utilizarla como un modelo para investigar el mecanismo de embriogénesis de plantas y conocer los factores que regulan dicho proceso, también tiene un papel importante en la propagación clonal y es una herramienta útil para llevar a cabo mejoramiento genético (Umehara *et al.*, 2007).

Existen diferentes factores fisiológicos y genéticos que inducen la embriogénesis en condiciones *in vitro* en varios tipos de células; sin embargo, las bases moleculares de estos mecanismos no están bien definidas. La identificación de genes específicos que se activan durante embriogénesis es deseable para el entendimiento de los mecanismos asociados con este proceso (Chugh y Khurana, 2002). Hasta éste momento, la información generada permite hacer una clasificación de los genes involucrados en ES y procesos en los que participan (Cuadro 1.3).

Cuadro 1.3 Tipos de genes que se expresan durante ES (Yang y Zhang, 2010).

GENES EXPRESADOS DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA
A) Genes relacionados con ciclo celular y pared celular
B) Genes de respuesta a tratamientos con hormonas Genes relacionados con auxinas Genes inducibles por ABA
C) Vía de transducción de señales involucrados en la ES Cinasas tipo receptor de la embriogénesis somática (SERK) Transducción de señales mediada por calmodulina
D) Factores de transcripción involucrados en la ES Genes LEC Proteínas con dominio AP2/ERF Proteínas homeodominio WUS Proteína 15 tipo AGAMOUS (AGL15) con dominio MADS

Contrario a angiospermas como la zanahoria, la embriogénesis somática en gimnospermas ha sido menos estudiada; los análisis moleculares han sido menos frecuentes y se han realizado en especies como *Picea glauca*, *Picea abies* y *Pinus edulis* (Dong y Dunstan, 1999; Leal y Misra, 1993). En la Figura 1.6 se muestra un resumen del análisis molecular de la expresión de algunos genes involucrados en ES.

**Figura 1.6** Representación esquemática de varios tipos de genes relacionados con la ES en

plantas superiores (Chugh y Khurana, 2002).

La caracterización molecular de la ES puede basarse en los genes cuya expresión depende del ciclo celular (Dudits *et al.*, 1991). Algunos ejemplos se mencionan a continuación: 1) genes que tienen un papel significativo durante la división y formación de la pared celular en distintas etapas de la diferenciación embriogénica; 2) genes que codifican para actina y tubulina que se expresan en tejido no embriogénico incrementan su expresión durante ES y con ello ocurre un aumento en la formación de pared y membrana celular, 3) la acumulación de pared celular y la regulación de moléculas señal que se unen a ésta, puede resultar en alteraciones esenciales en la expresión de genes específicos del ciclo celular y de genes involucrados en la síntesis de pared celular; causando cambios coordinados en las funciones celulares de varios estadios de la ES. Diversos estudios indican que la pared celular está involucrada en la transducción de señales durante la embriogénesis y en la formación de tensiones que determinan la forma de la célula y su plano de división (Malinowski y Filipecki, 2002).

También se puede caracterizar la ES dependiendo de la respuesta a la aplicación de hormonas. Dentro de ellas, las auxinas son reconocidas como iniciadores de la embriogénesis somática y se conocen diferentes genes que se expresan en respuesta a auxinas como el 2-4 D (ácido diclorofenoxiacético); entre ellos los que codifican para proteínas de choque térmico (Kitamiya *et al.*, 2000; Coca *et al.*, 1994). El ABA (ácido abscísico) es una hormona que regula varios procesos durante la embriogénesis y formación de semillas y regula la expresión de genes que codifican para distintas proteínas, entre ellas las proteínas LEA (Late Embriogénesis Abundant), los genes ECP (Extracellular Proteins), los genes ABI3 (ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3), involucrado en la regulación dependiente de ABA para la expresión de proteínas de genes de semillas (Chugh y Khurana, 2002).

Un gen muy importante utilizado en algunas especies como marcador molecular para diferenciar entre células competentes de las que no lo son, es el receptor de embriogénesis somática, SERK1 (SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE), el cual forma parte de un grupo especial de cinasas cuya función hipotética es actuar como receptores transmembranales que perciben las señales en el medio de cultivo y disparan la embriogénesis (Hu *et al.*, 2005). Este gen contiene un extremo N terminal con

cinco dominios repetidos ricos en Leucina (LRRs) que actúan como una región de unión a proteínas, también presenta regiones ricas en prolina entre el dominio extracelular LRR y la región transmembranal. El dominio intracelular contiene 11 subdominios característicos del centro catalítico de las proteínas cinasas y la segunda mitad del extremo C Terminal puede mediar interacciones proteína-proteína, disparando así una cascada de fosforilaciones en el interior de la célula (Nolan *et al.*, 2003; Baudino *et al.*, 2001; Hecht *et al.*, 2001; Somleva *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 1997).

Durante la EC, la expresión del gen DcSERK se observó solo en etapa globular y no en etapas tardías. Con base en estas observaciones se propuso que la misma vía de transducción de señales es activada durante la inducción de la competencia embriogénica, tanto para las células somáticas como en la EC, después de que ocurre la fertilización (Hecht *et al.*, 2001). El gen SERK ha sido identificado tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas, en especies como *Medicago trunculata*, *Helianthus sp*, *Theobroma cacao*, *Dactylis glomerata*, *Oriza sativa*, *Cocos nucifera* e incluso *Musa acuminata* (Huang *et al.*, 2010; Pérez, 2006; Thomas *et al.*, 2004; Nolan *et al.*, 2003; Baudino *et al.*, 2001; Somleva *et al.*, 2000).

Existen diferentes factores transcripcionales que se han identificado con relación a la embriogénesis, algunos de ellos se describen a continuación. Los genes que codifican para los factores de transcripción LEC (LEAFY COTYLEDON) promueven los procesos celulares característicos de la fase de maduración y la iniciación de la formación del embrión somático. Los genes blancos de estas proteínas activan su transcripción durante la fase de maduración, de tal manera que ocasionan la embriogénesis somática, dependiendo del balance del ácido abscísico (ABA) y ácido giberélico (AG). Otro de ellos es FUSCA3. Todos estos genes desempeñan papeles clave en el control del desarrollo del embrión y a diferencia de la mayoría de otros reguladores embriogénicos que funcionan durante etapas específicas de la embriogénesis, los genes LEC tienen la característica única de ser requeridos para el desarrollo tanto en las fases de morfogénesis como de maduración (Braybrook y Harada, 2008).

En la embriogénesis temprana los genes LEC son requeridos para especificar el destino de las células del suspensor y la identidad del cotiledón. En la embriogénesis tardía los genes LEC son necesarios durante la fase de maduración para la adquisición de

tolerancia a la desecación y para la expresión de muchos genes específicos de maduración. Así, los genes LEC juegan un papel central en el control de muchos aspectos de la embriogénesis temprana y tardía (Park y Harada, 2008).

Otros genes que codifican para proteínas relacionadas con embriogénesis son AGL15 (AGAMOUS- LIKE 15), un factor de transcripción tipo caja MADS que al ser sobreexpresado en *Arabidopsis* durante embriogénesis incrementa la competencia embriogénica. El factor de transcripción tipo AP2/ERF, BBM (BABY BOOM) al sobreexpresarse induce la formación de embriones somáticos y WUS (WUSCHEL), un factor de transcripción homeodominio, responsable de mantener la identidad del meristemo apical del retoño en plantas. Los genes LEC, BBM y WUS codifican para factores de transcripción involucrados en diferentes etapas de la embriogénesis somática; su expresión ectópica en *Arabidopsis*, resulta en la formación de embriones somáticos en explantes y plantas intactas (Nolan *et al.*, 2003; Harada, 2001; Stone *et al.*, 2001;).

También durante el proceso embriogénico, un indicador importante es el calcio (Ca^{2+}), un regulador clave de distintos procesos fisiológicos y celulares en plantas superiores (Sanders *et al.*, 2002). Estudios en zanahoria demuestran que su presencia aumenta la frecuencia embriogénica, y su ausencia detiene la formación de embriones somáticos. El incremento en la ES por la presencia de calcio, es la primera señal que sigue al reconocimiento de las células embriogénicas (Jansen *et al.*, 1990) y estudios sugieren que tiene un papel intermedio durante la embriogénesis, ya que es una señal detectada y transmitida por moléculas sensor. En plantas se han identificado tres clases de sensores de Ca^{2+} , siendo el mejor conocido la calmodulina (CaM); proteína de unión a Ca^{2+} altamente conservada en eucariotes localizada generalmente en regiones meristemáticas de embriones en desarrollo y fundamentalmente en tejidos celulares embriogénicos. Se ha observado que el número de transcritos de dicha proteína se incrementa durante los estadios globular y corazón del embrión; comparado con sus bajos niveles en callos indiferenciados, también incrementan su transcripción después de la aplicación de 2,4-D, acumulándose preferentemente en estadio globular (Dudits *et al.*, 1991).

En el Cuadro 1.4 se enlistan las proteínas involucradas en la embriogénesis de algunas especies de plantas monocotiledóneas reportadas en el GenBank hasta el año 2008.

Cuadro 1.4 Nombre de las proteínas involucradas en embriogénesis y especies de monocotiledóneas en donde han sido detectadas. Los datos fueron obtenidos del Genbank.

Species	Authors	Protein Name	Paper Title (name)
<i>Oryza sativa</i>	1. Chen and Chen Unpublished.	Late embryogenesis abundant proteins: LEA-3, 1, 14-A,	1. A rice embryo-specific cDNA encoding a late embryogenesis abundant group 3 protein.
	2. Ramani and Apte; 2003. Plant Physiol. 160 (10) 1165-1174.		2. Accumulation of LEA proteins in salt (NaCl) stressed young seedlings of rice (<i>Oryza sativa</i> L.) cultivar Bura Rata and their degradation during recovery from salinity stress.
	3. Buell et al. 2005. Genome Res. 15 (9) 1284-1291.		3. Sequence, annotation, and analysis of synteny between rice chromosome 3 and diverged grass species.
	4. Sasaki et al., 2002. Nature 420 (6913), 312-316.		4. The genome sequence and structure of rice chromosome 1.
	5. Chen and Chen, 1996. Plant Physiol. 111, 1353.		5. A rice embryo-specific cDNA (Accession No. U57641) encoding a late embryogenesis abundant group 3 protein (PGR96-049).
	Hu and Yang, 2005. Planta 222 (1) 107-117	Somatic embryogenesis protein kinase 1	Rice SERK1 gene positively regulates somatic embryogenesis of cultured cell and host defense response against fungal infection
	Song et al., 2008. Mol. Biol. Rep. 35 (2), 275-283	Benzothiadiazole-induced somatic embryogenesis receptor kinase 1	Molecular characterization and expression analysis of OsBISERK1, a gene encoding a leucine-rich repeat receptor-like kinase, during disease resistance responses in rice
	1. Sasaki et al., 2002 Published Only in Database. 2. Buell et al., 2005. BMC Biol. 3, 20.	Embryogenesis transmembrane protein	2. The sequence of rice chromosomes 11 and 12, rich in disease resistance genes and recent gene duplications.
	Sasaki et al., 2001. Published Only in Database.	Early embryogenesis protein	
<i>Zea mays</i>	Ahmed and Gupta. Unpublished.	Drought inducible late embryogenesis abundant protein	Induction of a unique LEA protein group III type 1 mRNA during drought stress in <i>Oryza sativa</i>
	Ito et al. Unpublished	HOS3	Cloning of rice early embryogenesis related gene H2A by using differential display.
	Postma-Haarsma et al., 1999. Plant Mol. Biol. 39 (2), 257-271.	KNOX class homeodomain protein	Characterization of the KNOX class homeobox genes Oskn2 and Oskn3 identified in a collection of cDNA libraries covering the early stages of rice embryogenesis.

		3	gene family.
	1. White and Rivin, 1995. Plant Physiol. 108 (3), 1337-1338. 2. Williams and Tsang, 1991. Plant Mol. Biol. 16 (5), 919-923. 3. Gardiner et al., 1995. Plant Physiol. 108 (3), 1337-1338.	Late embryogenesis abundant protein, group: 3, EMB564.	1. Sequence and regulation of a late embryogenesis abundant group 3 protein of maize. 2. A maize gene expressed during embryogenesis is abscisic acid-inducible and highly conserved. 3. Sequence and regulation of a late embryogenesis abundant group 3 protein of maize.
	Stiefel, 1999. J. Biol. Chem. 274 (39), 27734-27739	Embryogenesis transmembrane protein	TM20, a gene coding for a new class of transmembrane proteins expressed in the meristematic tissues of maize.
	1. Gardiner et al., 2004. Plant Physiol. 134 (4), 1317-1326. 2. Williams and Tsang, 1991. Plant Mol. Biol. 16 (5), 919-923. 3. Heuer et al., 2001. Plant Physiol. 127 (1), 33-45.	Embryo specific protein: 1, 3, 5.	1. Anchoring 9,371 maize expressed sequence tagged unigenes to the bacterial artificial chromosome contig map by two-dimensional overgo hybridization. 2. A maize gene expressed during embryogenesis is abscisic acid-inducible and highly conserved. 3. The maize MADS box gene ZmMADS3 affects node number and spikelet development and is co-expressed with ZmMADS1 during flower development, in egg cells, and early embryogenesis.
	Magnard et al., 2000. Plant Mol. Biol. 44 (4), 559-574.	Androgenic embryo 3.	Genes normally expressed in the endosperm are expressed at early stages of microspore embryogenesis in maize.
	Heuer et al., 2001. Plant Physiol. 127 (1), 33-45.	MADS1	The maize MADS box gene ZmMADS3 affects node number and spikelet development and is co-expressed with ZmMADS1 during flower development, in egg cells, and early embryogenesis.
	Marrs et al., 1993. Dev. Genet. 14 (1), 27-41.	Heat shock protein 82	Characterization of two maize HSP90 heat shock protein genes: expression during heat shock, embryogenesis, and pollen development.
	Fu et al., 2002. Plant Cell 14 (12), 3119-3132.	Heat shock factor-binding protein 1.	Empty pericarp2 Encodes a Negative Regulator of the Heat Shock Response and Is Required for Maize Embryogenesis.
	Heuer et al., 2001. Plant Physiol. 127 (1), 33-45.	MADS box protein 3	The maize MADS box gene ZmMADS3 affects node number and spikelet development and is co-expressed with ZmMADS1 during flower development, in egg cells, and early embryogenesis.
	Magnard et al., 2000. Plant Mol. Biol. 44 (4), 559-574.	ae3 protein and ae1 protein	Genes normally expressed in the endosperm are expressed at early stages of microspore embryogenesis in maize.
Hordeum	Espelund et al., 1992.	Late embryogenesis	Late embryogenesis-abundant genes encoding

vulgare	Plant J. 2 (2), 241-252	abundant protein: B19.3, B19.1, B19.4	proteins with different numbers of hydrophilic repeats are regulated differentially by abscisic acid and osmotic stress.
	March et al., Unpublished.	Putative late embryogenesis abundant protein.	A novel late embryogenesis associated protein and peroxidase associated with black pointed barley grains.
	Jung et al., 1997. Plant Physiol. 115, 1730-1731.	EEA1	Cloning and characterization of an early embryogenesis gene, EEA1(Accession No. AF017430), from barley.
Triticum aestivum	Curry et al., 1991. Plant Mol. Biol. 16 (6), 1073-1076.	Late embryogenesis abundant protein, group 2, 3.	Sequence analysis of a cDNA encoding a group 3 LEA mRNA inducible by ABA or dehydration stress in wheat.
	Futers et al, 1993. Plant Mol. Biol. 23 (5), 1067-1072.	Em protein H5	Sequence analysis of two tandemly linked Em genes from wheat.
	NDong et al., 2002. Plant Physiol. 129 (3), 1368-1381.	WCOR14a	Cold-regulated cereal chloroplast late embryogenesis abundant-like proteins. Molecular characterization and functional analyses.
Poa pratensis.	Albertini et al., 2005. Plant Physiol. 138 (4), 2185-2199.	Somatic embryogenesis receptor kinase 1,2.	SERK and APOSTART. Candidate genes for apomixis in Poa pratensis.
Sorghum bicolor.	Unpublished.	Late embryogenesis abundant protein	Sorghum bicolor late embryogenesis abundant protein mRNA sequence.
Cocos nucifera	Perez et al., Unpublished	Somatic embryogenesis receptor kinase	Analysis of expression of a SERK-like gene during somatic embryogenesis in Cocos nucifera L.
Dactylis glomerata	Alexandrova and Conger, 2002. Plant Sci. 162 (2), 301-307.	Somatic embryogenesis related protein	Isolation of two somatic embryogenesis-related genes from orchardgrass (Dactylis glomerata)
Ananas comosus	Neuteboom et al., 2002. Plant Sci. 163 (5), 1021-1035.	Late-embryogenesis abundant protein-like protein.	Characterization and tissue-regulated expression of genes involved in pineapple (Ananas comosus L.) root development.
Elaeis guineensis	Low et al., 2008. BMC Plant Biol. 8 (1), 62.	Senescence-associated protein. SKP1 Ras-related protein RIC1. Ribosomal protein. Nuclear transport factor 2. RUB1 conjugating enzyme. Light-inducible protein ATLS1. 24 kDa seed maturation	Oil palm (Elaeis guineensis Jacq.) tissue culture ESTs: Identifying genes associated with callogenesis and embryogenesis.

		protein. RMDL family protein-like.	
<i>Secale cereale</i>	Dong et al., 2002. Plant Physiol. 129 (3), 1368-1381.	REP14 y REP13	Cold-regulated cereal chloroplast late embryogenesis abundant-like proteins. Molecular characterization and functional analyses.

1.4. La técnica cDNA-AFLP

El advenimiento de técnicas moleculares ha sido crucial en la identificación de genes que exhiben actividad diferencial; entre ellas, la técnica de cDNA-AFLP, un método sumamente eficaz para el aislamiento de genes expresados diferencialmente cuyos resultados son reproducibles y pueden ser confirmados mediante análisis tipo Northern Blot. Una de las ventajas de la técnica es que no requiere la información previa de secuencias y por consiguiente es útil para el descubrimiento de genes (Bachem *et al.*, 1996).

Este procedimiento es una combinación del AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) y el despliegue diferencial, pero en este caso el cDNA se digiere con una enzima de restricción. Posteriormente se realiza el acoplamiento de un adaptador apropiado al sitio de restricción, y a continuación se realizan amplificaciones sucesivas utilizando un cebador correspondiente a la secuencia poli-A, y otro correspondiente al adaptador, utilizando dos o tres bases selectivas. Se pueden realizar variantes digiriendo el ADNc con dos enzimas de restricción, de modo similar al AFLP, para después acoplar a adaptadores con secuencia similar a los sitios de restricción utilizados, para finalmente, realizar amplificaciones con cebadores complementarios a estos adaptadores con dos o tres bases selectivas como se observa en la Figura 1.7 (Bachem *et al.*, 1996).

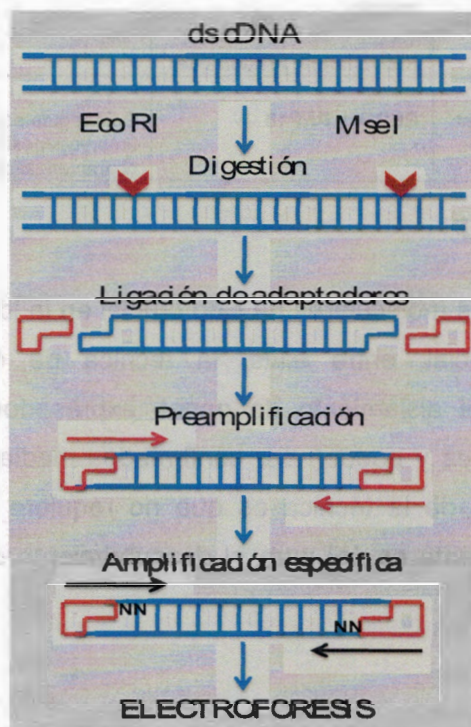


Figura 1.7 Diagrama de la técnica cDNA-AFLP. Eco RI, Mse I: enzimas de restricción. La N indica bases selectivas adicionales.

Los productos amplificados se separan mediante geles de poliacrilamida. La combinación de diferentes cebadores permite detectar un elevado índice de polimorfismo expresado. En este caso no se utilizan cebadores arbitrarios, por lo que la confiabilidad y reproducibilidad del método es superior a otras técnicas (Cornide *et al.*, 2002). El cDNA-AFLP es una técnica mejorada del despliegue diferencial tradicional, es un método basado en PCR, en donde en el primer paso de amplificación, se obtienen preferencialmente los fragmentos que fueron digeridos por ambas enzimas de restricción y así se tienen los adaptadores diferentes al final. En los siguientes pasos de amplificación, la mezcla compleja inicial de ADNc es dividida en pequeños subconjuntos por amplificaciones selectivas de PCR usando los cebadores en los adaptadores que contienen uno o más nucleótidos extra. Por incremento de la astringencia de amplificación de PCR (adicionando nucleótidos adicionales a los cebadores), la sensibilidad de los análisis puede incrementarse. También de esta manera, aquellos genes con un bajo nivel de expresión pueden ser detectados. Los fragmentos que son amplificados se

encuentran alrededor de los 10-400 pb. Dichos fragmentos son separados en geles de poliacrilamida desnaturalizante. Las diferencias en la intensidad de las bandas obtenidas proporcionan una buena medida de las diferencias relativas en los niveles de expresión del gen; la posterior caracterización de los transcritos de interés requiere a menudo la identificación del ADNc entero correspondiente (Breyne *et al.*, 2003).

Esta técnica ya ha sido utilizada con éxito en el análisis de transcritos durante distintos momentos de la embriogénesis. En cebada se utilizó para identificar los genes involucrados en dormancia y germinación de embriones cigóticos (Leymarie *et al.*, 2007); en embriones somáticos maduros de *Prunus amygdalus* se empleó para analizar los diferentes transcritos acumulados durante el periodo de desecación inducido in vitro con la hormona ABA (Campalans *et al.*, 2001) y en *Nicotiana plumbaginifolia* para comparar los patrones de expresión de genes de semillas dormantes bajo diferentes tratamientos antes de la germinación (Bove *et al.*, 2005).

En este trabajo, mediante la técnica de cDNA-AFLP se pretende obtener el perfil de los transcritos correspondientes a los genes expresados durante el proceso de embriogénesis somática en *M. a.m.* para compararlos con el perfil observado durante el proceso de embriogénesis cigótica en la misma especie. La técnica cDNA-AFLP permitirá detectar si existen diferencias en la expresión de genes en distintos momentos de la embriogénesis cigótica y somática.

HIPÓTESIS

Los genes que se expresan durante los estadios tempranos y tardíos de la embriogénesis cigótica de *M.a.m.* difieren a los que se expresan en las etapas correspondientes de la embriogénesis somática *in vitro*.

OBJETIVO GENERAL

Analizar los genes que se expresan en estadios tempranos y tardíos de la embriogénesis cigótica y somática en una especie diploide seminífera de *M.a.m.*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar las condiciones en las cuales el embrión cigótico de *M.a.m.* forma callo embriogénico, prolifera y mantiene lo largo del estudio.
2. Establecer suspensiones celulares embriogénicas que generen embriones maduros, que germinen y que se conviertan en plantas.
3. Obtener los perfiles de expresión de los genes de embriones cigóticos y somáticos maduros e inmaduros y compararlos.
4. Identificar los transcritos expresados diferencialmente en ambos tipos de genes, clonarlos, secuenciarlos y comparar en bases de datos públicas.
5. Analizar si existen diferencias en los transcritos expresados en embriogénesis temprana y tardía de EC con respecto a los mismos momentos pero en ES.

JUSTIFICACIÓN

M.a.m. una especie diploide seminífera que permite la obtención tanto de embriones cigóticos como somáticos *in vitro*. De esta manera, es posible utilizar una técnica de expresión diferencial para comparar los patrones de expresión y encontrar genes comunes y diferentes entre ambos procesos.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Con base en los antecedentes previos, se pretende que los estudios realizados en *M.a.m.* puedan ser una herramienta útil para comprender el mecanismo molecular de la embriogénesis somática en ésta especie; por lo tanto, en este trabajo se realizó un análisis de los transcritos que se expresan en distintos momentos de la embriogénesis cigótica y somática de *M.a.m.*, para ello se aplicó la siguiente metodología: 1) Se indujo la ES a partir de embriones cigóticos; 2) se diferenciaron los estadios tempranos y tardíos (Histología, MEB) de embriones cigóticos y somáticos; 3) se realizó la extracción de ARN, la síntesis de cDNA y el cDNA-AFLP en embriones cigóticos y somáticos maduros e inmaduros; 4) se obtuvieron los perfiles genómicos de embriones cigóticos y somáticos, se realizó la comparación, se identificaron las bandas diferenciarlas, se clonaron y se realizó el análisis de las secuencias (Figura 1. 8).

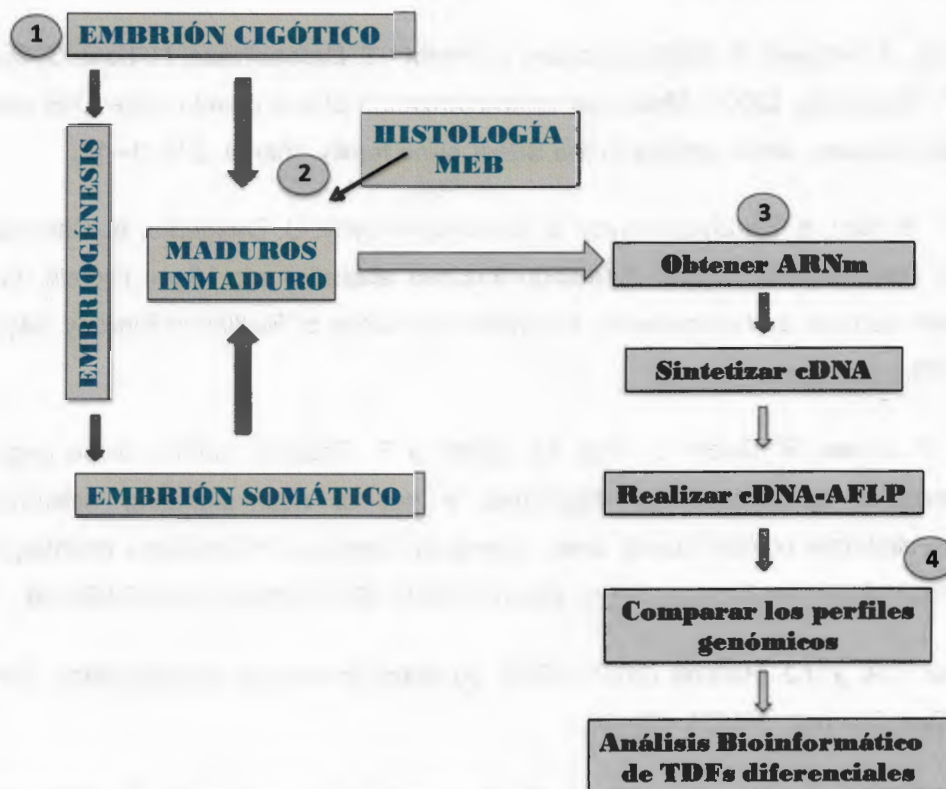


Figura 1.8 Estrategia experimental planteada para este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Aert R., L. Sagi, G. y Volckaert (2004) Gene content and density in banana (*Musa acuminata*) as revealed by genomic sequencing of BAC clones. *Theoretical and Applied Genetics*, 109: 129-139.
- Aoshima Y. (2005) Efficient embryogenesis in the callus of tea (*Camellia sinensis*) enhanced by the osmotic stress or antibiotics treatment. *Plant Biotechnology*, 22(4): 277-280.
- Bachem C., R. Van der Hoeven, S. de Bruijn, D. Vreugdenhil, M. Zabeau y R. Visser (1996) Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant Journal*, 5: 745-753.
- Baudino S., S. Hansen, R. Brettschneider, V. Hecht, T. Dresselhaus, H. Lorz, C. Dumas y P. Rogowsky (2001) Molecular characterization of two novel maize LRR receptor-like kinases, which belong to the SERK gene family. *Planta*, 213: 1-10.
- Begun Y., S. Roy, S. Bandyopadhyay, S. Bandyopadhyay, U. Dasgupta, A. Chakraborty y S. Raychaudhuri (2007) Radiation induced alterations in *Vigna radiata* during in vitro somatic embryogenesis. *International Journal of Radiation Biology*, 84(2):165-175.
- Bove J., P. Lucas, B. Godin, L. Ogé, M. Jullien y P. Grappin (2005) Gene expression analysis by cDNA-AFLP highlights a set of new signaling networks and translational control during seed dormancy breaking in *Nicotiana glauca*. *Plant Molecular Biology*, 57(4): 593-612, DOI: 10.1007/s11103-005-0953-8.
- Braybrook S.A. y J.J. Harada (2008) LECs go crazy in embryo development. *Trends in Plant Science*, 13(12): 624-30.
- Breyne P., R. Dreesen, B. Cannoot, D. Rombaut, K. Vandepoele, S. Rombauts, R. Vanderhaeghen, D. Inzé, y M. Zabeau (2003) Quantitative cDNA-AFLP analysis for genome wide-expression studies. *Molecular Genetics and Genomics*, 269: 173-179.

-
- Campalans A., M. Pagès y R. Messeguer (2001) Identification of differentially expressed genes by the cDNA-AFLP technique during dehydration of almond (*Prunus amygdalus*). *Tree Physiology*, 21(10): 633-643, doi: 10.1093/treephys/21.10.633.
- Chugh A. y P. Khurana (2002) Gene expression during somatic embryogenesis: recent advances. *Current Science*, 83: 715-730.
- Coca M., C. Almoguera y J. Jordano (1994) Expression of sunflower low-molecular weight heat shock proteins during embryogenesis and persistents after germination: localization and possible functional implication. *Plant Molecular Biology*, 25: 479-492.
- Constantine D. y G. Rossel (2001) The Musacea: an annotated list of the species of the Ensete, Musa and Musella, <http://www.users.globalnet.co.uk/drc/index.htm>
- Cornide H. (2002) Marcadores moleculares: nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas, Editorial Felix Varela, p. 367.
- De Castro R. y W.M. Hilhorst (2000) Dormancy, germination and the cell cycle in developing and imbibing tomato seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 12:105-136.
- Dodeman V., G. Ducreux y M. Kreis (1997) Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany*, 48 (313): 1493–1509.
- Dong J. y D. Dunstan (1999) Cloning and characterization of six embryogenesis-associated cDNAs from somatic embryos of *Picea glauca* and their comparative expression during zygotic embryogenesis. *Plant Molecular Biology*, 39: 859-864.
- Dudits D, L. Bögre y J. Györgyey (1991) Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells. *In vitro Journal Cell Science*, 99: 475-484.
- Escalant J., T. Teisson (1987) Comportements in vitro del embrion isole du bananier (*Musa* sp). *Fruits* 4, 333-342. Citado por Escobedo R. (1996) Condiciones nucleares y citológicas durante la embriogénesis somática in vitro de *Musa*
-

acuminata Colla. spp. malaccensis. Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Mérida, 134pp.

FAO (2008), Food and Agriculture Organization of the United Nations

Fehér A. (2005) Why somatic plant cells start to form embryos? In: Mujid, Abdul and Samaj, Josef. eds. Somatic Embryogenesis. Plant Cell Monographs, Springer; Berlin/Heidelberg, 2: 85-101.

Gray D. (2000) Nonzygotic embryogenesis. In Trigiano, R.N.; Gray, D.J. eds. Plant Tissue Culture: concepts and laboratory exercises. Boca Ratón, Florida. CRC, Press, pp. 175–189.

Harada J. (2001) Role of Arabidopsis LEAFY COTYLEDON genes in seed development. J Plant Physiology, 158: 405–409.

Hecht V., J. Vielle, M. Hartog, E. Schmidt, U. Boutilier, U. Grossniklaus y S. de Vries (2001) The Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 Gene Is Expressed in Developing Ovules and Embryos and Enhances Embryogenic Competence. Culture Plant Physiology, 127: 803–816.

Hu H., L. Xiong y Y. Yang (2005) Rice SERK1 gene positively regulates somatic embryogenesis of cultured cell and host defense response against fungal infection. Planta, 222: 107-117.

Huang X., X. Yan, J. Tang, J. Kai, X. Mei, W. Xiao, Y. Ping, Y. Feng y X. Lin (2010) MaSERK1 Gene Expression Associated with Somatic Embryogenic Competence and Disease Resistance Response in Banana (Musa spp.). Plant Molecular Biology Report, 28: 309–316.

Ikeda M., M. Umehara, S. Satoh y H. Kamada (2003) Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of Arabidopsis thaliana. The Plant Journal, 34 (1):107-114.

Ikeda M., M. Umehara y H. Kamada (2006) Embryogenesis-related genes; Its expression

- and roles during somatic and zygotic embryogenesis in carrot and Arabidopsis. *Plant Biotechnology*, 23: 153–161.
- INIBAP (2001) *Taxonomía de los bananos*. Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y el Plátano.
- Jalil M., N. Khalid y R. Othman (2003) Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of *Musa acuminata* cv. Mas (AA). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 75: 209-214.
- Jansen M., H. Booij, J. Schel y S. de Vries (1990) Calcium increases the yield of somatic embryos in carrot embryogenic suspension cultures. *Plant Cell Report*, 9: 221-223.
- Jiménez V.M. (2001). Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 13: 196–223.
- Jiménez V. y C. Thomas (2005) Participation of plant hormones in determination and progression of somatic embryogenesis. In: MUJID, A. and SAMAJ, J. eds. *Somatic Embryogenesis: Plant Cell Monographs*, Springer; Berlin/Heidelberg 2: 103-118.
- Karami O., A. Deljou, M. Esna-Ashari y P. Ostad-Ahmdi (2006) Effect of sucrose concentrations on somatic embryogenesis in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Scientia Horticulturae*, 110(4): 340-344.
- Kitamiya E., S. Suzuki, T. Sano y T. Nagata (2000) Isolation of two genes that were induced upon the initiation of somatic embryogenesis on carrot hypocotyls by high concentration of 2,4-D. *Plant Cell Report*, 19: 551-557.
- Leal I. y S. Misra (1993) Developmental gene expression in conifer embryogenesis and germination. *Plant Science*, 88: 25-37.
- Leymarie J. E. Bruneaux, S. Gibot-Leclerc y F. Corbineau (2007) Identification of transcripts potentially involved in barley seed germination and dormancy using cDNA-AFLP. *Journal of Experimental Botany*, 58(3):425-437. doi:10.1093/jxb/erl211.

- Lincy A., A. Remashree y B. Sasikumar (2009) Indirect and direct somatic embryogenesis from aerial stem explants of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). *Acta Botanica Croatica*, 68 (1): 93-103.
- Lysak, M. A., M. Dolezelova, J. P. Horry, R. Swennen, y J. Dolezel (1999) Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in *Musa*. *Theoretical and Applied Genetics*, 98: 1344-1350.
- Malinowski R. y M. Filipecki (2002) The role of cell wall in plant embryogenesis. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 7: 1137–1151.
- McGahan M. (1961) Studies of the seed of banana: Anatomy of the seed and embryo of *Musa balbisiana*. *American Journal of Botany*, 48: 230-238.
- Nieves S. (2007) Estimulación del crecimiento y desarrollo de frutas de plátanos (*Musa acuminata* X *M. balbisiana* AAB) mediante aplicaciones de biorreguladores y fertilizantes. Tesis Maestro en ciencia en Horticultura. Universidad de Puerto Rico, recinto Universitario de Mayaguez, Pp.92.
- Nolan K., R. Irwanto y R. Rose, (2003) Auxin up-regulates MtSERK1 expression in both *Medicago truncatula* root-forming and embryogenic cultures. *Plant Physiology*, 133: 218–230.
- Park S. y J.J. Harada (2008) *Arabidopsis* embryogenesis. *Methods in Molecular Biology Journal*, 427: 3-16.
- Pasternak T.P., E. Prinsen, F. Ayaydin, P. Miskolczi, G. Potters, H. Asard, H.A. Van Onckelen, D. Dudits, y A. Fehe'r (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.
- Patnaik D., A. Mahalakshmi y P. Khurana (2005) Effect of water stress and heavy metals on induction of somatic embryogenesis in wheat leaf base cultures. *Indian Journal of Experimental Biology*, 43 (8): 740-745.
- Pérez T. (2006) Embriogénesis somática en cocotero: estudios sobre aspectos del

desarrollo y mejoramiento de la eficiencia, Tesis de doctorado, Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Persley GJ, de Langhe E (1987). Banana and plantain breeding strategies. ACIAR Proceeding, No. 21 pp. 87. Citado por Escobedo R. (1996) Condiciones nucleares y citológicas durante la embriogénesis somática in vitro de *Musa acuminata* Colla. spp. malaccensis. Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Mérida, 134pp.

Potters G., T. Pasternak, Y. Guisez, K. Palme y M. Jansen (2007) Strees-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends in Plant Science*, 12(3):98-105.

Ramsey M., J. Daniells y V. Anderson (1990) Effects of Sigatoka Leaf Spot (*Mycosphaerella musicola*) on Fruit Yields, Field Ripening and Greenlife of Bananas in North Queensland. *Scientia Horticulturae*, 41: 305-313.

Rosales E., L. Pocasangre (2002) Mejoramiento convencional de banano y plátano: Estrategias y logros, Acorbat, Memorias XV reunión realizada en Cartagena de Indias, Colombia

Roux N., H. Strosse, A. Toloza, B. Panis y J. Dolezel (2004) Detecting ploidy level instability of banana embryogenic cell suspension cultures by flow cytometry. In: *Banana Improvement: Cellular, Molecular Biology and Induced Mutagenesis*. Editors Jain Sm, Swennen R. Scientific Publishers Inc. Pp. 251-261.

Sagarpa (2007) Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, Boletín Noviembre.

Sanders D., J. Pelloux, C. Brownlee y J. Harper (2002) Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell*, 14: 401-417.

Schmidt E., F. Guzzo, M. Toonen y S. de Vries (1997) A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development*, 124: 2049-2062.

- Simmonds N. (1962) The evolution of the bananas, Longmans, London, 170 pp. Citado por Escobedo R. (1996) Condiciones nucleares y citológicas durante la embriogénesis somática in vitro de *Musa acuminata* Colla. spp. *malaccensis*. Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Mérida, 134pp.
- Somleva M., E. Schmidt y S. de Vries (2000) Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by SERK expression. *Plant Cell Reports*, 19: 718–726.
- Stone S., L. Kwong, K. Yee, J. Pelletier, L. Lepiniec, R. Fischer, R. Goldberg, J. Harada (2001) *LEAFY COTYLEDON2* encodes B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 98: 11806–11811.
- Thomas C. y V. Jiménez (2005) Mode of action of plant hormones and plant growth regulators during induction of somatic embryogenesis: molecular aspects. In: MUJIB, A. and SAMAJ, J. eds. *Somatic Embryogenesis*, Plant Cell Monographs. Berlin; Springer-Verlag 2: 157-175.
- Thomas C., D. Meyer, C. Himber y A. Steinmetz (2004) Spatial expression of a sunflower SERK gene during induction of somatic embryogenesis and shoot organogenesis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 26: 35–42.
- Trehane P. (1995) *International Code of Nomenclature for Cultivated Plants*. Quarterjack Publishing, Wimborne, UK.
- Umehara M., M. Ikeda, H. Kamada (2007) Endogenous Factors that Regulate Plant Embryogenesis: Recent Advances. *Japanese Journal of Plant Science*, 1(1):1-6.
- Yang X. y X. Zhang (2010) Regulation of Somatic Embryogenesis in Higher Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 29(1): 36-57.
- Yu T., S. Yeh y J. Yang (2001) Effects of carbenicillin and cefotaxime on callus growth and somatic embryogenesis from adventitious roots of papaya. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 42(4): 281-286.

Zeng F., X. Zhang, L. Cheng, L. Hu, L. Zhu, J.Cao y X. Guo (2007) A draft gene regulatory network for cellular totipotency reprogramming during plant somatic embryogenesis. *Genomics*, 90(5): 620-628.

Zimmerman J. (1993) Somatic embryogenesis a model for early development in higher plants. *Plant Cell*, 5: 1411-1423.

CAPÍTULO II

IMPROVED MATURATION AND GERMINATION OF SOMATIC EMBRYOS *IN Musa acuminata* COLLA (AA) SUBSPECIES *malaccensis* BY CHANGES IN THE CULTURE MEDIUM.

Josefina I. Maldonado-Borges, José R. Ku-Cauich, Rosa M. Escobedo-Gracia-Medrano

En esta parte del trabajo, utilizando distintos tratamientos, se implementó un protocolo de maduración de embriones somáticos de *M.a.m.* que incrementó la germinación y conversión a planta. Con este material se realizaron los estudios de cADN-AFLP.

2.1 ABSTRACT

The effect of plant growth regulators (PGR), sucrose and water stress on *M.a.m.* in vitro embryogenesis of immature zygotic embryos (IZE) is examined. IZEs at the globular-heart-like stage were cultured on half strength Murashige and Skoog (MS) media with 175.28 mM sucrose and eight different PGR combinations. The culture of IZEs in 0.5 μ M zeatin (Z) led to their maturity after ~30 d. On PGR-free media, 54% of the embryos germinated and grew into healthy plants. Auxin at 4.52 and 2.26 μ M (2, 4-dichlorophenoxyacetic acid, 2, 4-D) promoted the formation of embryogenic calli, dispersed in liquid media with 4.52 μ M 2, 4-D. Once embryo development had been synchronised by filtering, the fine suspension was overlaid on PGR-free media (MS). After 60d on culture media with a normal sucrose concentration (87.64 mM), embryos progressed to asynchronous populations of opaque white and yellow quiescent embryos. The former showed a 48% germination frequency and healthy plants grew in all cases, as was the case for zygotic originators. Conversely, 175.28 mM sucrose had a negative effect on embryo differentiation; germination was incomplete. When water availability was restricted by a physical barrier, the embryos sustained embryogenic growth on a media with 87.64 mM sucrose and germination of white-opaque embryos increased to 90%; high sucrose in the medium led to the arrest of the embryos' growth. The effect of sucrose and water stress on embryo development is discussed.

Key words: crop improvement, embryo development, in vitro embryogenesis,

Abbreviations: 2, 4-D, 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid; DPA days post anthesis; EC, embryogenic callus; IZE immature zygotic embryo, Z, Zeatin.

2.2. INTRODUCTION

In *Musa* (*Musaceae* family), as for other angiosperms, the zygote and somatic embryos derived from either seed or seedless genotypes exemplify distinctive plant cell developmental plasticity phenomena, offering the opportunity to study fundamental mechanisms governing the fate of cells during embryogenesis. Because of polyploidy, male and/or female sterility and parthenocarpy, banana and plantain breeders have encountered difficulties and adopted in vitro protocols for the germination of seeds (Cox, 1960; Stotzky *et al.* 1962; Fortescue and Turner 2011). The rates of germination fluctuate from 23 up to 100% depending on the genotype and other key factors (Ortiz and Vuylsteke 1995). *In vitro* culture of Immature Zygotic Embryos (IZE) and somatic embryogenesis, expected to assist breeding strategies, has been undertaken for different purposes such as conservation of the genetic diversity of the wild banana ancestors of current edible plants (Darjo and Bakry 1990, Asif, *et al.* 2001); embryo rescue of seeds from open-pollinated wild seedy banana and controlled hybrids (Afle and De Langhe, 1991; Bakry, 2008; Uma *et al.* 2011); propagation of edible clones for synthetic seed technology (Xiao Pan, *et al.* 2011); as well as to guarantee the safety of human nutrition in developing countries, where the banana and plantain crops are part of their stable diet and a source of income. The regeneration of whole banana plants from somatic embryos derived from different tissues, including IZE has been shown to be possible (Cronauer and Krikorian, 1988; Escalant and Teisson, 1989; Navarro *et al.* 1997). However, the basis for the low quality and quantity of the somatic embryos that frequently occurs as well as their poor regeneration and conversion to vigorous plants is often the least studied aspect.

This study was undertaken to gain an insight into the effect of auxin and cytokinin during in vitro embryogenesis of IZE cultured from *Musa acuminata* ssp. *malaccensis*. The percentage of IZE that continued to develop and germinate or produce embryogenic callus was analysed, as well as the effect of media water availability on embryo development, their germination and plant conversion.

2.3. MATERIALS AND METHODS

2.3.1. Plant materials

The plant material of *M.a.m.*, genome A, was obtained from the Bioversity, Musa International Transit Centre (ITC), hosted by the Catholic University of Leuven in Belgium, the accession with code number ITC-250 is kept in the *Musa* germplasm collection located in the Experimental Station of the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, INIFAP-Uxmal (20° 24' 40.10" Lat. N, and 89° 45' 24.90" Long. W, 8.0 meters above sea level (m.a.s.l.) Yucatán, México.

Fruits with plenty of seeds were collected from an open-pollinated plant within a cluster of five fully developed plants, and used as the source of immature zygotic embryo (IZE) explants. The age of IZE was estimated by the number of scars left by the bract on the rachis of the inflorescence after day one of anthesis, and was confirmed by histological and scanning electron microscopy (SEM) analysis. The fruits were surface sterilised and the IZE removed from the seeds aseptically, as described by Navarro *et al.* (1997).

2.3.2. Culture conditions, for IZE growth, maturation and germination, and induction of somatic embryogenesis

Eight plant growth regulator (PGR) treatments were tested (Table 2.1). In total the experiment was repeated independently twice, with three replicates per treatment and 10 explants per replicate. Media used for growth and maturation and somatic embryogenesis is based on the MI medium of Navarro (*et al.* 1997), composed of MS salts (Murashige and Skoog, 1962) with ½ the concentration of macro-elements, supplemented with 1.47 mM KH₂PO₄, Morel (1950) vitamins, 175.28mM sucrose, but with different concentrations of zeatin (Z) and of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) added. The media was labelled as development or induction treatments, D or I (Table 2.1), respectively. All media were adjusted to pH 5.8 and supplemented with Gelrite 2%. All cultures were sealed with plastic wrap and kept in a growth room at 27± 2°C under total darkness, unless otherwise stated. Zeatin which was filter-sterilized was added to partially cooled medium after autoclaving.

IZE growth, maturation and germination. Ten translucent globular-torpedo like stage IZEs (60-65 days post anthesis, dpa) were transferred to Petri dishes containing 25 ml of

MI media, with 0.0 (control), 0.5, or 1.0 μM of Z added (D0, D1 and D2; Table 2.1). After 30 days, embryos showing evidence of plumule or radicle emergence were transferred to complete MS medium, with 87.64 mM sucrose and devoid of Z, and cultured under an 18 h photoperiod ($120 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) for further development into a plant. After 30 days, plants were transferred to the greenhouse in pods full of a 1:1 mix of soil: peat moss.

Induction of embryogenic calli. IZEs (60-65 dpa) were transferred to the induction medium, MI, supplemented with 2, 4-D alone (0.0, 2.24 or 4.52 μM) or combined with Z (0.0, 0.5, 1.0 μM) (Table 2.1). Cultures were kept in the same media for up to 90 days. After the first 30 days of culture the frequencies of different types of callus were recorded (Table 2.1).

Proliferation of embryogenic callus and suspensions. After 90 days on induction treatments (I1 to I6, Table 2.1), embryogenic calli were transferred to a proliferation medium of the same composition, but at full ionic strength, with 87.64 mM sucrose and 4.52 μM of 2,4-D. Cultures were kept as described above with subcultures every 30 days, during which non-embryogenic callus was discarded. Data proliferation taken from 5 subcultures at the end of each interval was recorded and analysed (Table 2.2). The embryogenic callus was kept for up to one year and was used to establish suspensions. Approximately 1 g of the calli was transferred into a 25 ml Erlenmeyer flask containing 10 ml of liquid medium M2 (Cote et al. 1996). Suspensions were kept under continuous agitation (90 rpm) for 60 days with weekly subcultures. Subsequently subcultures were extended to 15 days. After 75 days, suspensions were sieved through a stainless steel mesh (sieve 250 μm) and the media were refreshed.

Effect of sucrose and water availability on somatic embryo development. To assess the participation of sucrose and water availability in promoting embryo development, 15 days after being sieved, 500 μl of homogeneous embryogenic cell suspension, adjusted to 5% package cell volume (PCV) was overlaid on PGR-free MS solid maturation medium in Petri dishes (100 x 15 mm), under two osmotic conditions: 87.64 mM and 175.28 mM sucrose. The use of one disc of filter paper (Wattman No. 1, 9.0 cm in diameter) on top of the medium was tested under each condition. The cultures were kept in darkness at $27 \pm 2^\circ \text{C}$ for a period of 60 days. Every two weeks the cultures were observed under a stereoscope and the somatic embryo growth features recorded. The developed embryos

were later transferred to the germination medium under a 16:8 h photoperiod.

Germination of somatic embryos. After 60 days of maturation, somatic embryos were transferred for germination to a semisolid MS medium with a pH of 5.8, 87.64 mM of sucrose, and no PGR, 2 μ M BAP and 2.85 μ M IAA or with 1 μ M BAP and 5.7 μ M IAA. Cultures were kept in darkness for a week and later transferred to a 16:8 h photoperiod. After 8 to 15 days the emergence of the plumule and radicle in some embryos was observed. After germination and growth, plants were transferred to the greenhouse as previously described.

2.3.3 Light and scanning electron microscopy (SEM).

Fruits were collected every 10 days from 55 to 110 dpa, and fixed overnight at 4°C in FAA (v/v, 10% formaldehyde: 5% acetic acid: 50% ethanol, and water), FAA was replaced twice. Fixed tissues were dehydrated with an ethanol series of 30, 50, 70, 90, 95% v/v, and absolute; embedded in TJB-4 Plus resin (POLYSCIENCES); sectioned at 4.0 microns (MICROM GMBH type HM340E), double stained with Periodic Acid Schiff reagent (PAS)-Naphthol Blue-Black (NBB) (Fisher, 1968), and mounted in Permount (Fisher Scientific). Samples were observed and photographed with LEICA MZFLIII a stereoscope connected to a LEICA DFC 320 digital camera. For SEM analysis, following dehydration of embryogenic calli, IZE and somatic embryo tissues; samples were dried at the critical point using CO₂ in a Sandri-795 semi-automatic critical point dryer, mounted on stubs and coated with a 12 nm layer of gold in a Denton vacuum Desk II sputter coater. Observations were made using a Jeol JSM-6360-LV scanning electron microscope operating at 18 kV.

2.3.4 Statistical analysis

A completely random experimental design with 3 replicates for each treatment was used and the results were subjected to a factorial ANOVA test (Random Complete Block Design). The comparison of means was carried out by Duncan's multiple range tests. Least significant differences were calculated at the 5% level of probability.

2.4. RESULTS AND DISCUSSION

2.4.1 Effect of Zeatin on the development of IZE, as revealed by the percentage of germination

At the start of in vitro culture, the M.a.m. IZEs were of globular to cylindrical shape, named the globular-heart-like stage (~60-65 dpa, Fig. 2.1a), and of a transparent-white-coloured appearance. Zeatin at 0.5 μM (D1, Table 2.1) supported the development of IZE. After the first 20 days of culture the embryos attained a more elongated shape and an opaque white colour. Transition of the IZEs from a translucent to opaque white appearance and the evidence of a lateral invagination of the embryo linked to the locus of the apical meristem, was an indicator of the onset of differentiation (Cronauer and Krikorian, 1988; Darjo and Bakry 1990), and a criterion of maturity (Marquez-Matin *et al.*, 2011). With the emergence of the plumule after 30 days of culture, and then transferred to a 16:8 h photoperiod, the opaque white embryos grew in size and synthesised photosynthetic pigments, turning green, an early indicator of being autotrophic. The root primordia emerged and after 15-20 days on PGR-free media up to 54% of the zygotic embryos had germinated (Table 2.1, Fig. b). Thus, the IZEs reached morphological and physiological maturity in vitro and all grew into healthy plants, just like mature embryos (Asif *et al.*, 2001; Bakry, 2008; Uma *et al.*, 2011).

The growth of a white compact callus (CC) from IZE with a frequency of 36% was supported by 0.5 μM Z (D1, Table 2.1, Fig. e). Higher concentrations of cytokinin in the medium, 1.0 μM Z, led to the formation of 75% CC; however, on PGR-free media (D0) the IZE oxidised within the first 10d of culture (Table 2.1, Fig. a). It therefore seems that lower concentrations of cytokinin, $\leq 0.5 \mu\text{M}$ Z, is required for the in vitro development of IZE to reach maturity, as revealed by the frequency of germination (54%, D1, Table 2.1, Fig. b) with complete conversion to vigorous plants. These results are consistent with reports that higher cytokinin i.e. BAP, 6-benzylaminopurine, in culture media significantly reduces germination and induces callus formation (Asif *et al.*, 2001 and Uma *et al.*, 2011). Interestingly, the in vitro development of IZE reported here increased the frequency of germination to 54% compared to 45% found for mature seeds of the same accession and genotype after 45 days of growth under green-house conditions (Burgos M, personal communication).

Table 2.1 Effect of zeatin ZEA on the development of *M. a.m.* IZE after 30 days on MI media free of PGR (D0, control) and with ZEA (D1, D2). The average percentages of unresponsive explants (UR, a) and compact callus alone (CC, e) are expressed; after ~30 days of culture on D1 the zygotic embryos germinated (ZEG, b) in vitro on MS media free of PGR. The effect of the auxin 2, 4-D and ZEA on IZE cultured on MI induction media (I1, I2, I3, I4, I5 and I6), is shown by the percentage formation of embryogenic callus (EC, c), embryogenic callus plus compact callus (EC+CC, d), and CC. The bar = 5 mm in all figures. For all variables, different superscript letter indicates significant statistical differences ($P \leq 0.05$).

a	Treatments		Percent of response				
			EC	EC+CC	CC	ZEG	NR
	2,4-D / ZEA(μ M)						
b	D0	0.0 / 0.0	-	-	-	-	100 ^a
c	D1	0.0 / 0.5	-	-	36 ^c	54 ^a	10 ^c
d	D2	0.0 / 1.0	-	-	75 ^b	-	25 ^b
e	I1	2.26 / 0	75 ^b	-	-	-	25 ^b
	I2	2.26 / 0.5	-	96 ^a	-	-	4 ^d
	I3	2.26 / 1.0	-	-	96 ^a	-	4 ^d
	I4	4.52 / 0	97 ^a	-	-	-	3 ^d
	I5	4.52 / 0.5	-	100 ^a	-	-	-
	I6	4.52 / 1.0	-	-	92 ^a	-	8 ^c

2.4.2 .Effect of Auxin and Zeatin on somatic embryogenesis of IZE

Auxin treatment of IZE (Fig. 2.1, Fig. a) on induction media with 2.26 and 4.52 μ M of 2,4-D caused the formation of embryogenic callus (EC), with a frequency of 75% and 97%, after 30 days in culture, with no significant differences between treatments (I1 and I4, Table 2.1, Fig. c). The morphology of these homogeneous EC was a friable creamy yellow-mass (Table 2.1, Fig. c, and Fig 2.1, b) with tiny somatic embryos emerging across its surface, comparable to EC reported using picloram and 2,4-D (Escalant and Teisson 1989; Navarro *et al.* 1997). SEM micrographs revealed that the EC grew as a mass of loosely attached cells at the onset of polarisation, i.e., elongated cells (Fig. 2.1, c). With subculture, the callus was composed of distinctive embryogenic cells characterised by a

high nucleocytoplasmic ratio, large nucleolus, a dense cytoplasm, resembling the type II cell aggregates of triploid banana embryogenic cultures (Georget, *et al.* 2000).

Heterogeneous callus developed from the IZE 90 days after culture initiation in media combining auxin and zeatin at 2.26/0.5 or 4.52/0.5 μM and was composed of EC and a mix of yellowish and white CC, with a frequency above 96% (I2 and I5, Table 2.1, Fig. d), whereas the formation of a white CC with frequencies above 92% was recurrent on the higher concentration of zeatin 1.0 μM Z in combination with 2.26 μM or 4.52 μM of 2,4-D (I6 and I3, Table 2.1, Fig. e). Recognition of the different type of calluses and their selection for subsequent proliferation are essential steps for the successful establishment of embryogenic suspension cultures (Cote *et al.* 1996; Georget, *et al.* 2000).

2.4.3 Embryogenic callus proliferation and initiation of suspension cultures

After the initial 90 days of induction culture of the IZE, the production of the creamy-yellow-callus was increased in mass with subsequent subcultures on proliferation media. After 60 days of proliferation, small somatic embryos appeared on the surface of the callus (Fig. 2.1, b, d and f). The origin of somatic embryos from yellow callus has been reported for other *Musa* species (Cronauer and Krikorian, 1988; Escalant and Teisson 1989; Marroquín *et al.*, 1993). SEM analysis revealed two types of embryos on the EC: globular and torpedo-like embryos (Fig. 2.1, e, and g), which developed within the creamy yellow-white callus (Fig. 2.1, d and f). Two types of embryos have been described in embryogenic suspension ~30 days after culture initiation; their origin seems to be due to the plane of the first division of the embryogenic cells, i.e., two symmetric or two asymmetric cells (Escobedo, unpublished data). Globular to torpedo shaped somatic embryos have also been recognised in embryogenic cultures of the diploid and triploid parthenocarpic *Musa* genotypes (Mahanom *et al.* 2008; Cote, *et al.* 1996; Youssef, *et al.* 2010). Two pathways, one of unicellular and the other of pluricellular origin, have been documented in *Musa* embryogenic cultures, with single cell origin embryos formed from cryopreserved cells (Georget *et al.* 2009).

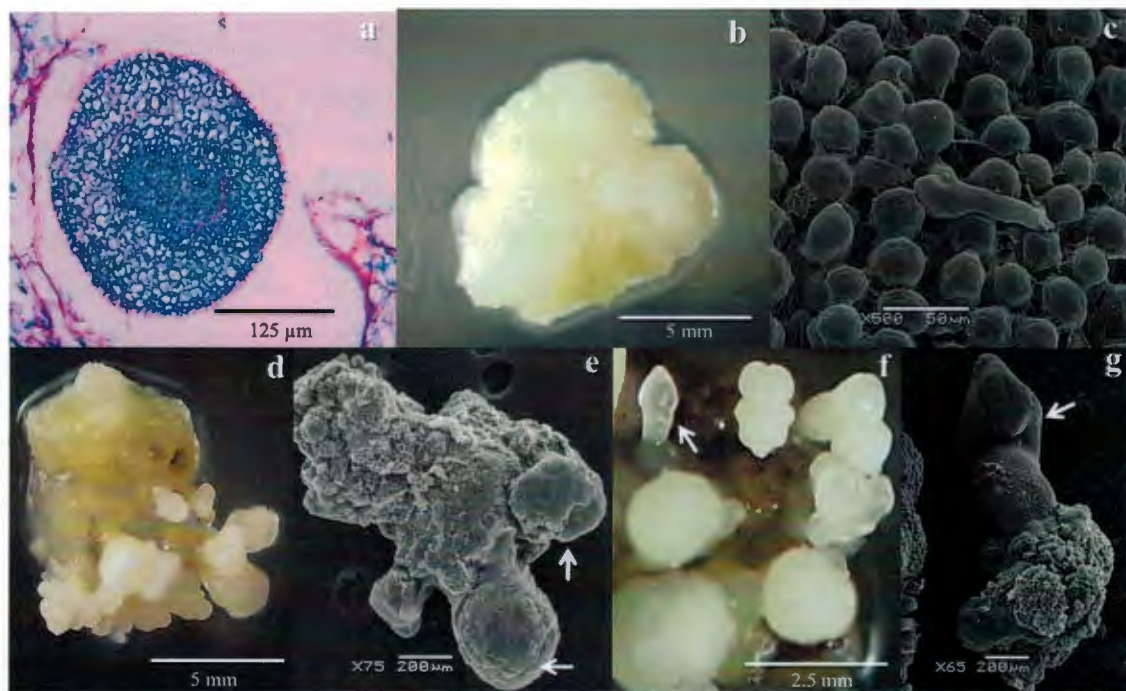


Figure 2.1 Different stages of *M.a.m.* somatic embryogenesis. a) histological section of a globular-elongated IZE of ~65 dpa; b) macroscopic appearance of embryogenic callus after 150 days of induction on MI added with 4.52 μM 2, 4-D. c) Scanning electron microscopy (SEM) of the embryogenic callus 30 days after induction showing polarised proembryos; d) proliferated callus with somatic embryos (SE) at different stages of development; e) SEM, callus with globular somatic embryo(s) (arrow); f) macroscopic view of somatic embryos classified as “torpedo-like” (arrow) according to its form; g) SEM, “torpedo-like” embryo (arrow).

The proliferation of the EC on MS media with half the initial sucrose concentration (87.65 mM) and 4.52 μM 2, 4-D for 150 days and media replaced every 15 days (Table 2.2), was best when the cultures were initiated with a homogeneous EC produced under auxin (I1 and I4) or auxin and low zeatin concentrations (I2), rather than with a heterogeneous callus (I3, I5 and I6) produced under a mix of auxin and cytokinin media, although differences were not significant between the treatments. For the heterogeneous callus, oxidation of non-embryogenic tissue (Table 2.2, NC) occurred with subcultures; oxidation of tissue inhibited the embryogenic potential of cultures.

Embryogenic callus initiated on MI media with treatment I1 and I4 (Table 2.2) and

multiplied for ~ one year produced highly homogeneous suspension cultures after their filtration and subculture for two months. The suspensions composed of cell clusters of embryogenic cells with a central nucleus and dense cytoplasm look like the type II aggregates of Georget et al. (2000); whereas those initiated with EC formed on I3, I5 and I6 treatments led to suspensions with heterogeneous cell aggregates similar to those of type IV and V. Although it has been reported that proembryos initiated from suspension cultures derived from IZE callus (Escalant and Teisson 1989), correspond to type IV aggregates of Georget et al. (2000), in the present work homogenous embryogenic cell lines comprising type II aggregates were obtained and continued over a year by the subculture of 5% PCV dilutions every month and their embryogenic capacity was tested by the maturation experiments, discussed below.

Table 2.2 Proliferation of *M.a.m.* embryogenic calli initiated from IZE under different PGR treatments (I1 to I6, as in Table 1). The results were obtained, after 150 days of culture of the callus on MS media with 4.52 μ M 2,4-D, with media replaced every 15 days. Values showed the percentages of formation of embryogenic callus (EC), white compact callus (CC) and necrotic callus (NC). Means sharing the same superscripts within a column do not differ ($P \leq 0.05$).

Callus from treatments 2,4-D/ZEA (mM)		EC (%)	CC (%)	NC (%)
I1	2.26 /0	81 ^a	6 ^a	13 ^a
I2	2.26 /0.5	85 ^a	-	15 ^a
I3	2.26 /1.0	55 ^a	5 ^a	40 ^a
I4	4.52 /0	84 ^a	-	16 ^a
I5	4.52 /0.5	62 ^a	-	38 ^a
I6	4.52 /1.0	79 ^a	-	21 ^a

2.4.4 Influence of sugar and water availability on somatic embryo maturation and germination

A significant difference in germination was found between embryos formed from embryogenic suspensions developed for 60 days on media devoid of PGR with different concentrations of sucrose (Fig. 2.2 and Fig. 2.3 a). For example, 87.64 mM and 175.28 mM sucrose led to the formation of asynchronous populations of embryos varying in size

and degree of maturity i.e., large opaque-white embryos vs. small translucent-white embryos, with numerous embryos that turned brown and red in colour (Fig. 2.2 c, d), which differed significantly when transferred to germination media. If the opaque white somatic embryo is matured, as in Figure 2.2 c, on a medium with a normal sucrose concentration (87.64 mM), it will start to germinate in approximately one week after being transferred to germination media free of PGR (Fig. 2.3a, Control), showing 48% germination, or on media with different combinations of auxin and cytokinin (Fig. 2.2a, G1 and G2) in the range of 40 and 67%, respectively.

The emission of shoot and roots as well as the growth of the seedlings was slow and the plantlets exhibited a pale yellow colour (low vigour). Whereas the high concentration of the permeating sucrose (175.28 mM) led to the development of abnormal somatic embryos, dissimilar in size and colour, many of which remained small and transparent white (Fig. 2.2d).

The high osmotica impinge an irreversible stress on the development of somatic embryos; they showed a poor and diminished germination frequency (21%), which consisted of the emergence of a small shoot or root, but no complete plants were recovered (Fig 2.3. a* and b).

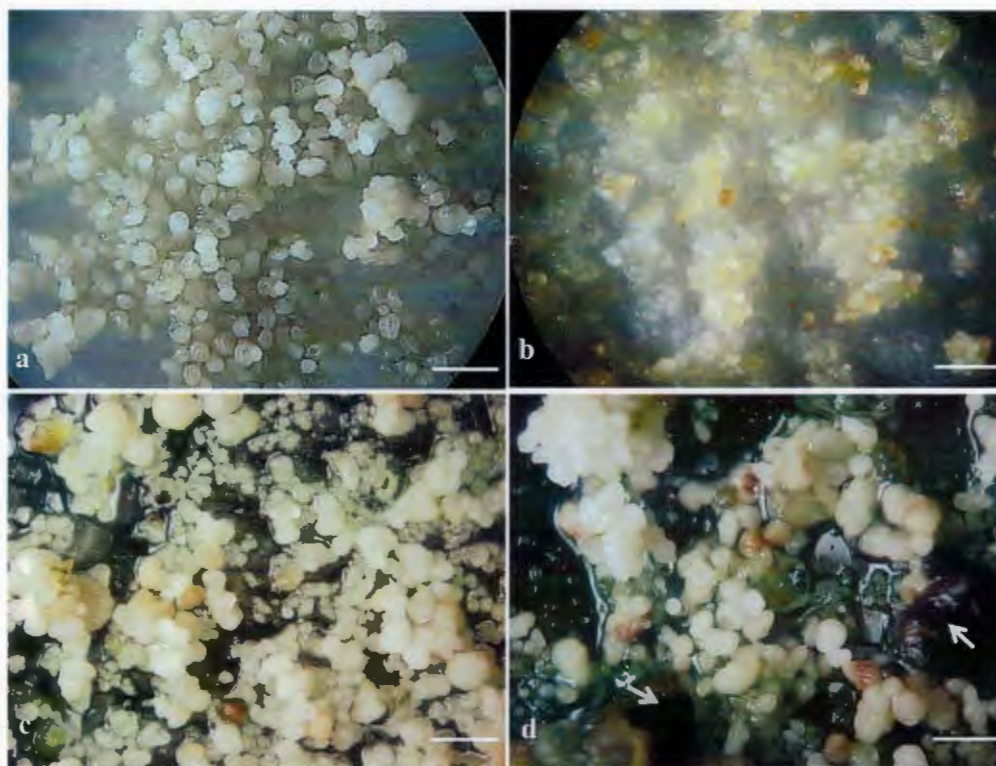


Figure 2.2 Evolution of *M.a.m.* somatic embryos formed after 60 days of plating aliquots of embryogenic suspension on PGR-free MS medium showing the effect of sucrose concentration and filter paper (FP) on water availability to embryo maturation. a) Opaque-white somatic embryos developed on MS medium with 87.64 mM of sucrose + FP (bar = 10 mm); b) translucent-white embryo on MS medium with 175.28 mM of sucrose + FP (bar = 10 mm); c) asynchronous populations of embryos in MS medium with 87.64 mM of sucrose (bar = 5 mm); d) asynchronous populations of embryos on medium with 175.28 mM sucrose showing embryos oxidization (arrow) (bar = 5 mm).

There are contrasting results in the literature over the appropriate concentration of sucrose or other permeating osmotica for use within the maturation media. Incorporation of higher levels of sucrose, above 175.3 mM, decreases the production of somatic embryos in *Pinus strobus* (Klimaszwska and Smith, 1997). Whereas, increasing the sucrose concentration from 87.6 mM (3%) to 175.3 mM (6%) in the development media increased the vigour without reducing the number of embryos formed during the acquisition of desiccation tolerance in *Medicago sativa* (Anadarajah and McKersie 1990).

In this study, when the water potential of the embryogenic tissue was modified by means of the use of filter paper (FP) that separated the culture from the medium, contrasting embryo development and maturation paths were observed with respect to the same two sucrose concentrations tested (Fig. 2.2 a, b). After 60 days in culture at 87.64 mM sucrose + FP, opaque-white somatic embryos grew as synchronous populations; they exhibited the cotyledonary slit, which is an indication of the onset of the maturity stage being reached (Fig. 2.2 a); whereas at 175.28 mM of sucrose + FP, almost all embryos remain morphologically immature, in the form of small globular crystalline structures (Fig. 2.2 b), perhaps due to the inhibition of their development, suggesting that a high osmotic stress was impinging on these embryos.

Reports on *Musa* indicate that a long maturation period and the use of FP can produce twice as many mature embryos, which depend on the variety of banana and the quality of the cell suspension (Cote *et al.*, 1996, Gorget *et al.* 2000; Matsumoto *et al.*, 2006). For some varieties of the AAB group, a period of 14-21 days is sufficient for the maturation of the embryos (Matsumoto *et al.*, 2006); nevertheless, many bananas for the groups AAA and ABB need a maturation period of 30 to 70 days (Novak *et al.*, 1989; Dhed *et al.* 1991; Grapin *et al.* 1996). The difference from the former reports is that in our study, the maturation media was devoid of PGR and sucrose was reduced compared to other studies.

The somatic embryo that matured on filter paper (FP) on a medium with 87.64 mM sucrose showed an increased frequency ($\geq 90\%$) of germination on media free of PGR (control), and on G1 and G2 media with auxin-cytokinin PGRs, as compared to those matured without FP (Fig. 2.3 a). Although, no significant differences were detected, embryos on the G1 medium (1 μM BAP and 5.7 μM AIA) displayed a slower germination process compared to those on G2 (2 μM BAP and 2.85 μM AIA), which germinated as the control treatment did, one week after being transferred to the germination medium (Fig. 2.3 a, b).

The present results suggest that the use of exogenous hormones in the germination medium, i.e., BAP and AIA, is redundant when embryos progress more synchronously to maturity on a reduced water availability medium and normal sucrose concentration; perhaps the imbalance of PGR towards a higher auxin concentration inhibits the correct

germination of the embryo. So, it is possible that when the embryos become opaque-white, as a sign of maturity, and are transferred to a germination medium under a photoperiod regime where they exhibited an intense greenish colour, an indicator of being autotrophic (Fig. 3b), they are then able to synthesise their own growth regulators.

Thus, the use of highly embryogenic cell suspensions, a developmental phase that includes a culture media devoid of PGR, the restriction of water availability to the embryos by the use of filter and the optimisation of sucrose concentration for each species will be a good practice for the acquisition of morphological and physiological maturity of somatic embryos and the growth of vigorous seedlings.

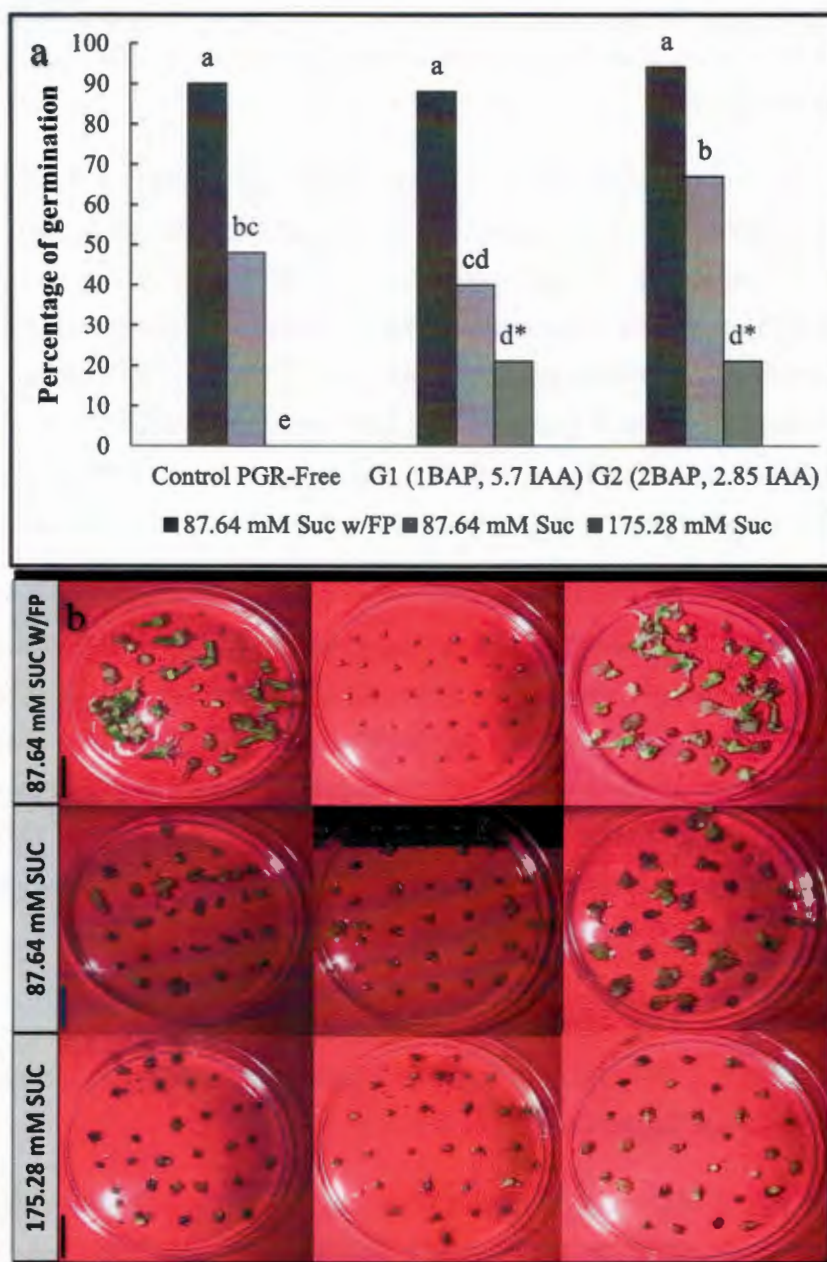


Figure 2.3 Percentage germination of *M.a.m.* somatic embryos under MS media with different PGR concentrations. The germinated embryos grew into complete plantlets. a) Effect of the maturity of somatic embryos' cultured with 87.64 mM sucrose on filter paper (SUC W/FP); with only 87.64 mM of sucrose (SUC), or with 175.28 mM of sucrose, on their response to germination media, control PGR-Free, with 1 μ M BAP, 5.7 μ M IAA. b) With germination, embryos showed the presence of

plumule and radicle according to the treatments (bar = 20 mm). *Indicates that the embryos germinated but did not continue to form a complete plant. Different letters within graph bars indicate significant difference ($P \leq 0.05$).

In summary, we have completed the in vitro maturation of IZE of a diploid banana genotype and obtained an improvement in the protocol for the maturation of somatic embryos that increased the frequency of germination to $\geq 90\%$, and guarantee a good conversion ($\geq 95\%$) to healthy potted plants. The increase in the potential number of clone plants obtained through somatic embryogenesis of IZE, previously reported with lower germination rates (Escalant and Teisson 1989; Marroquin *et al.*, 1993; Navarro *et al.* 1997), is anticipated as a means to optimise existing protocols in banana for different genotypes and particularly for the rescue of embryos of open-pollinated wild species and hybrid seeds use in breeding programs.

Acknowledgments: We thank the support provided by: INIFAP-CIR-SURESTE for the field facilities at the Uxmal-Experimental Station-Yucatán, México; the technical support provided by Dra. Goreti Campos, QFB Angela Ku, Ing. Fernando Contreras and QBB Martha Burgos. We are grateful to Dr. Felipe Vazquez for reviewing the manuscript and Mrs. Gemma Franklin for correcting the English. This work was funded by CONACYT through the Basic Science Research Project No. 0060838 (to the corresponding author), and studentship No.169880 awarded to the first author.

REFERENCES

- Afele J.C., E. Langhe (1991) Increasing in vitro germination of *Musa balbisiana* seeds. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 27:33-36.
- Anandarajah K. y R. B. McKersie (1990) Manipulating the desiccation tolerance and vigour of dry somatic embryos of *Medicago sativa* L. with sucrose, heat shock and abscisic acid. *Plant Cell Report*, 9:451-455.
- Asif M.J., C. Mak y R.Y. Othman (2001) In vitro zygotic embryo culture of wild *Musa acuminata* ssp. *malaccensis* and factors affecting germination and seedling growth. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 67:267-270.
- Bakry F. (2008) Zygotic embryo rescue in bananas. *Fruits*, 63:111-115.

-
- Cote F.X., R. Domergue, S. Monmarson, J. Schewendiman, C. Teisson y J.V. Escalant (1996) Embryogenic cell suspensions from male flower of Musa AAA cv. Grand Nain. *Physiology Plant*, 97:285-290.
- Cox E., A.G. Stotzky y D.G. Roger (1960) In vitro culture of Musa balbisiana Colla embryos. *Nature*, 185:403–404.
- Cronauer S.S. y A.D. Krikorian (1988) Plant regeneration via somatic embryogenesis in the seeded diploid banana Musa ornata Roxb. *Plant Cell Report*, 7:23–25.
- Darjo P. y F. Bakry (1990) Conservation et germination des graines de bananiers Musa sp. *Fruits*, 45:103-113.
- Dhed' D., F. Dumortier, B. Panis, D. Vuylsteke y E. De Langhe (1991) Plant regeneration in cell suspension cultures of the cooking banana cv. 'Bluggoe' (Musa spp. ABB group). *Fruits*, 46:125-135.
- Escalant J.V. y C. Teisson (1989) Somatic embryogenesis and plants from immature zygotic embryos of the species Musa acuminata and Musa balbisiana. *Plant Cell Report*, 7:665-668.
- Fisher D.B. (1968) Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. *Histochemie*, 16:92–96.
- Fortescue J.A. y D.W. Turner (2011) Chapter 8. Reproductive Biology. In: *Banana Breeding Progress and Challenges*. Pillary M, Tenkouano A (eds) Boca Raton, FL, CRC Press, pp. 145-179.
- Georget F., R. Domergue, N. Ferriere y F.X. Cote (2000) Morpho-histological study of the different constituents of a banana (Musa AAA, cv. Grande naine) embryogenic cell suspension. *Plant Cell Report*, 19: 748-754.
- Georget F., F. Egelman, R. Domergue y F. Cote (2009) Morpho-histological study of banana (Musa spp. Cv. Grande Naine [AAA]) cell suspensions during cryopreservation and regeneration. *CryoLetters*, 30:398-407.
-

- Grapin A., J. Schwendiman y C. Teisson (1996) Somatic embryogenesis in plantain banana. *In Vitro Cell Development Biology Plant*, 32:66-71.
- Klimaszewska K. y D.R. Smith (1997) Maturation of somatic embryos of *Pinus strobus* is promoted by a high concentration of gellum gum. *Physiology Plant*, 100:949-957.
- Mahanom J., N. Khalid y R.Y. Othman (2003) Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of *Musa acuminata* cv. Mas (AA). *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 75:209-214.
- Marquez-Matín 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 Plant Physiology*, 168:2028-2024.
- Marroquin C.G., C. Paduscheck, J.V. Escalant y C. Teisson (1993) Somatic embryogenesis and plant regeneration through cell suspensions in *Musa acuminata*. *In Vitro Cell Development Biology Plant*, 29:43-46.
- Matsumoto K., M. Felipe, M. Souza y J. Batista (2006) Plantlet regeneration from suspension cells of a diploid hybrid banana; XVII Reuniao Internacional da Associacao para a Cooperacao nas Pesquisas sobre Banana no Caribe e na América Tropical; 15-20 octubre; Joinville, Santa Catarina Brasil, pp 523-527.
- Morel G. (1950) Sur la culture des tissus de deux monocotylédones. *C.R. Academy Science Paris* 230:1099-1101.
- Murashige T. y F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant*, 15:473-497.
- Navarro C., R. Escobedo y A. Mayo (1997) In vitro plant regeneration from embryogenic cultures of a diploid and a triploid, Cavendish banana. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 51:17-25.
- Novak F.J., R. Afza, M. Van Duren, M. Perea-Dallos, B.V. Conger y X. Tang (1989) Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB) bananas (*Musa* spp.). *BioTechnology*, 7:154-

159.

Ortiz R. y D. Vuylsteke (1995) Factors influencing seed set in triploid *Musa* spp. L. and production of euploid hybrids. *Annals of Botany*, 75:151–155.

Shin H. y Y-W. Kim (2012) Somatic embryogenesis of *Pinus rigida* x *P. taeda* and the relationship between the initiation of embryogenic tissue and zygotic embryo development. *Plant Biotechnology Report*, DOI 10.1007/S11816-011-0212-1.

Stotzk G. y E.A. Cox (1962) Seed germination studies in *Musa*. II. Alternating temperature requirement for the germination of *Musa balbisiana*. *American Journal of Botany*, 49:763-770.

Uma S., S. Lakshmi, M.S. Saraswathi, A. Akbar y M.M. Mustaffa (2011) Embryo rescue and plant regeneration in banana (*Musa* spp.). *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 105:105-111.

Xiao P., Y. Xiao, L. Guimei,, Z. Ru, C. Houbin, S. Jozef y X. Chunxiang (2011) Ultrastructural changes and the distribution of arabinogalactan proteins during somatic embryogenesis of banana (*Musa* spp. AAA cv. 'Yueyoukang 1'). *Physiology Plant*, 142:372–389.

Youssef M., J. Andrew, M.A. Mayo, J.R. Ku-C, A.R. Grijalva y M.R. Escobedo (2010) Influence of genotype and age of explant source on the capacity for somatic embryogenesis of two Cavendish banana cultivars (*Musa acuminata* Colla, AAA). *African Journal of Biotechnology*, 9:2216-2223.

CAPÍTULO III

GENES EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS DE *MUSA*

Josefina I. Maldonado Borges, Rosa M. Escobedo Gracia-Medrano.

En esta parte del trabajo, mediante cDNA-AFLP, se obtuvieron los fragmentos de transcritos de genes expresados diferencialmente durante embriogénesis cigótica y somática en estadios tempranos y tardíos para realizar su comparación en bases de datos públicas.

3.1 RESUMEN

Este trabajo representa uno de los primeros esfuerzos por identificar genes que presentan expresión diferencial durante diferentes estadios de la embriogénesis cigótica y somática de *Musa*. En total se obtuvieron 253 fragmentos derivados de transcritos o TDFs (transcript-derived fragments) con un tamaño de 100 a 5000 pb, de los cuales 21 mostraron ser expresados diferencialmente. Del total de clonas obtenidas y secuenciadas, el 67% de las secuencias de tamaño entre 76 a 299 pb mostró homología con proteínas caracterizadas, siendo mayor la proporción de secuencias de transcritos relacionados con la expresión de genes en embriogénesis somática en estadios tempranos del desarrollo de los embriones. Se realizó una clasificación de las secuencias de acuerdo a su implicación en un proceso biológico, al desempeño de una función molecular o al ser parte de algún componente celular, encontrándose generalmente relacionadas con funciones moleculares.

Asimismo, la comparación en bases de datos públicas reveló que el 33% restante fueron secuencias con homología a proteínas desconocidas o no descritas de diversas especies de plantas, entre ellas *Musa*, lo que demuestra la importancia de realizar estudios más profundos debido a la poca información molecular del proceso embriogénico en esta especie. Los resultados sugieren la existencia de diferencias estadio-temporales en la expresión de genes durante ambos procesos de embriogénesis.

Palabras claves: *M.a.m.*, TDFs, embriogénesis cigótica, embriogénesis somática.

3.2 INTRODUCCIÓN

Una mejor comprensión de los genes involucrados en la embriogénesis somática en banano (*Musa* spp.) puede proporcionar una forma práctica de mejorar la regeneración de plantas. Se espera que el uso de herramientas moleculares acelere el mejoramiento del germoplasma; razón por la cual se están realizando estudios moleculares con el fin de recabar información útil y en su caso, transferir con éxito genes de una especie a otra. Recientemente ha sido secuenciado el genoma de un genotipo doble haploide de *Musa acuminata* con un tamaño de 523 megabases constituyendo un paso crucial en el mejoramiento genético de banano. En dicho trabajo se detectaron duplicaciones del genoma de *Musa* y los resultados permiten hacer análisis comparativos del genoma de esta especie con otras plantas, lo cual es muy importante al realizar diversos estudios evolutivos del genoma (D' Hont *et al.*, 2012).

Durante la embriogénesis somática ocurren cambios bioquímicos y morfológicos que permiten que los tejidos inducidos se desarrollen (Sharp *et al.*, 1980), los cuales están fuertemente relacionados con alteraciones en el patrón de expresión de genes (Zimmerman, 1993). Algunos genes son expresados diferencialmente durante la inducción de la embriogénesis somática, mientras que otros son expresados durante la diferenciación del embrión hasta la maduración y durante el desarrollo completo de la planta (Zimmerman, 1993).

Los mecanismos moleculares de la embriogénesis somática han sido investigados en sistemas clásicos de inducción de la embriogénesis somática y de cultivo de tejidos de embriones inmaduros de zanahoria y *Arabidopsis*. El empleo de técnicas moleculares ha conducido a la identificación de diferentes genes relacionados con embriogénesis tales como LEA (Late Embryogenesis Abundant), SERK (Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase), AGL15 (Agamous-like15), BBM (Baby Boom), LEC1, FUS3 (Fusca3) y ABI3 (ABA Insensitive 3) (Ikeda *et al.* 2006).

En suspensiones celulares de zanahoria, la presencia del mRNA de SERK es un indicador de la capacidad que tienen las células simples de iniciar el desarrollo de embriones somáticos (Schmidt *et al.* 1997). Similares resultados han sido obtenidos en

Dactylis glomerata (Somleva *et al.* 2000) y en *Arabidopsis thaliana* (Hecht *et al.* 2001). Se ha observado que las plantas transgénicas de *A. thaliana* que sobreexpresan el gen AtSERK1 exhiben un aumento en su capacidad para formar embriones somáticos, en comparación con plantas no transformadas (Hecht *et al.* 2001). Los resultados obtenidos por Gaj *et al.* (2005) indican que los genes LEC desempeñan un papel clave en la embriogénesis somática de *A. thaliana*. La expresión ectópica de LEC1 (Lotan *et al.* 1998), LEC2 (Stone *et al.* 2001) y BBM (Boutillier *et al.* 2002) en *Arabidopsis* causa la formación espontánea de embriones somáticos en plantas o explantes. Los genes LEC y BBM codifican para factores de transcripción. El gen LEC2 muestra gran similitud con el dominio B3 de los factores de transcripción VIVIPAROUS1 y FUSCA3 (Stone *et al.* 2001).

Diversos genes que han sido inducidos durante la embriogénesis somática indirecta en zanahoria han sido aislados, principalmente por análisis de bibliotecas de cDNA. Dichos genes incluyen aquellos que codifican para proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant) (Choi *et al.*, 1987; Wilde *et al.*, 1988; Kiyosue *et al.*, 1992, 1993; Wurtele *et al.*, 1993), proteínas de la pared celular ricas en prolina y glicina (Aleith y Richter, 1992), proteínas secretadas tales como proteínas de transferencia de lípidos EP2 (Sterk *et al.*, 1991) y endoquitinasas EP3 (De Jong *et al.*, 1992). Ninguno de los genes específicos de estadios muy tempranos de la formación del embrión somático, aparte de la quitinasa (De Jong *et al.*, 1992; Schmidt *et al.*, 1994), parecen desempeñar papeles más estructurales que regulatorios.

En el género *Musa* solamente se ha identificado un gen relacionado con el proceso embriogénico. La proteína cinasa tipo receptor durante la embriogénesis de banano designada como MaSERK1, la cual fue aislada de *Musa acuminata* cv. Mas (AA). El gen codifica para una proteína de 628 aminoácidos con un porcentaje de identidad del 82% con otras proteínas tipo SERK reportadas en coco, arroz, maíz, *Arabidopsis*, y zanahoria. MaSERK1 se expresa débilmente en clusters de inflorescencias masculinas, pero no en callo no embriogénico derivado de inflorescencias masculinas; se observa un alto nivel de expresión en callo embriogénico derivado de inflorescencias masculinas y en suspensiones celulares embriogénicas. MaSERK1 no solamente sirve como un marcador molecular de la embriogénesis somática de banano, sino que también desempeña un papel importante en la respuesta de resistencia a enfermedades en banano ((Xia *et al.*,

2010).

A pesar de que un gen no tiene que aumentar o disminuir su regulación para desarrollar un papel clave en un determinado proceso biológico, la detección de genes diferencialmente expresados es uno de los métodos más sencillos para revelar las bases moleculares de un sistema biológico. Como una herramienta de detección, el cDNA-AFLP ha demostrado ser un método estricto y reproducible capaz de amplificar los transcritos poco abundantes (Bachem *et al.*, 1996; Lievens *et al.*, 2001). El cDNA-AFLP es una técnica robusta, con alto rendimiento, es una herramienta útil para el descubrimiento de genes que se expresan en todo el genoma (Breyne y Zabeau, 2001; Polesani *et al.*, 2008), en donde el conocimiento previo de las secuencias no es necesario (Ditt *et al.*, 2001).

En este trabajo se tuvo como objetivo analizar la expresión de genes en diferentes momentos de la embriogénesis de *M.a.m.* utilizando la técnica cDNA-AFLP. Nuestros resultados revelan diferencias estadio-temporales en la expresión de genes en esta especie.

3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1 Material Vegetal y Condiciones de Cultivo

Los frutos de banano fueron colectados en el banco de germoplasma del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) localizado en la estación experimental del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales (INIFAP) en Uxmal (Yucatán, México). La accesión utilizada en este trabajo corresponde a *M.a.m.* (AA), con número de ITC 250 proveniente del Centro Internacional de Biodiversidad de Musa, ubicado en el Laboratorio de Mejoramiento de Plantas Tropicales en la Universidad Católica de Lovaina (Bélgica).

La embriogénesis somática fue inducida a partir de embriones cigóticos obtenidos de frutos con una edad de 60-65 días posteriores a la antesis. Los embriones fueron colocados sobre medio MS (Murashige & Skoog, 1962) con macroelementos reducidos a la mitad, 175.28 mM de sacarosa y 4.52 μ M de 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) a un pH de 5.8, manteniendo los cultivos en oscuridad constante a una temperatura de 27

°± 2 °C durante 3 meses sin subcultivos; posteriormente los callos embriogénicos fueron proliferados en el mismo medio pero con macroelementos completos y sacarosa a 87.64 mM, con renovación mensual del medio.

Las suspensiones celulares embriogénicas fueron iniciadas a partir de un gramo de callo embriogénico en 10 ml de medio líquido de proliferación denominado M2 en matraces de 25 ml (Cote *et al.*, 1996) el cual contenía minerales y vitaminas de MS, sacarosa a 87.64 mM, 4.52 µM de 2.4-D, 4.1 µM de Biotina, 680 µM de glutamina, 100 mgL⁻¹ de extracto de malta y el pH ajustado a 5.3, en agitación a 90 rpm a una temperatura de 27±2 ° C en completa oscuridad. El medio fue inicialmente renovado cada 7 días durante los primeros 2 meses y posteriormente cada 15 días al encontrarse en matraces de mayor capacidad (125 ml con 50 ml de medio de cultivo). Después de renovar 5 veces más el medio de cultivo, se filtraron las suspensiones con colador (60 mesh o 250 µm). Para la maduración se utilizaron dos concentraciones de sacarosa (175.28/87.64 mM) en presencia y ausencia de papel filtro. La germinación de los embriones somáticos ocurrió en el medio MS en ausencia de fitoreguladores y con distintas concentraciones de BAP y AIA.

3.3.2 Extracción de RNA

Se extrajo RNA total a partir de 50 mg de material vegetal de los distintos tejidos mencionados en el cuadro 3.1 (embriones cigóticos y somáticos maduros e inmaduros, suspensiones celulares y embriones somáticos germinados). El método de extracción fue adaptado al peso y características del material, utilizando el reactivo TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Para realizar las pruebas de extracción de RNA el material vegetal se almacenó a -20°C utilizando el reactivo RNAlater (SIGMA) el cual sirve para estabilizar y proteger el RNA. Con el objetivo de estandarizar las condiciones de extracción de RNA se analizaron diferentes reportes. El protocolo obtenido, se basa principalmente en las aportaciones de Chomczynski y Sacchi (1987) y de Almarza *et al.* (2006); es simple y rápido para aislar RNA de buena calidad y se menciona detalladamente en anexos.

La calidad del ARN extraído se confirmó de distintas maneras; se realizó electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio en donde se observaron claramente las bandas que corresponden al RNAr 18 y 25S, se determinó la

concentración y pureza mediante espectrofotometría (DO260), la cual fue de 1.8 a 2.0 con un rendimiento de 1 a 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de RNA. También se llevó a cabo la amplificación de diversos genes constitutivos (actina, RNAr 18S y RNAr 5S). La estandarización de la amplificación de los genes constitutivos se realizó a partir de ADN y las condiciones de amplificación se mencionan en la metodología del cDNA.

3.3.3 Síntesis de cDNA de cadena sencilla

Los restos de DNA genómico fueron eliminados totalmente al tratar las muestras con DNase I (Invitrogen) utilizando una concentración final de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de RNA en un volumen final de 30 μl , siguiendo las instrucciones del proveedor y al final se cuantificó la concentración del RNA.

El RNA total fue utilizado para obtener el cDNA utilizando la enzima transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y random primers, a una concentración de 5 μg de RNA total en un volumen final de 20 μl siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante y detallado en anexos.

También en anexos se detalla la síntesis y cuantificación del cDNA, posteriormente se amplificó el RNAr 5S con tamaño esperado de 300 pb (cebadores P1- 5'-GATCCCATCAGAACTCC3' y P2- 5'-GGTGCTTTAGTGCTGGTAT3'); las condiciones de amplificación consistieron de una desnaturalización previa a 94° C por 5 min, 30 ciclos de: desnaturalización a 94° C por 1 min, alineación a 57° C por 1 min y extensión a 72° C por 2 min, con una extensión final de 72° C por 5 min. También se amplificó un fragmento del gen de actina de banano con un tamaño esperado de 585 pb (Cebadores en sentido y antisentido: 5'-GATGCCCGGAGGTTCTCTTCC-3' y 5'-AGTACAGGTACAACCTCGAGC-3'). Las condiciones de amplificación fueron una desnaturalización previa a 94° C por 5 min, 35 ciclos de: desnaturalización a 94° C por 40 s, alineación a 55° C por 50 s y extensión a 72° C por 40 s, con una extensión final de 72° C por 8 min. Para el fragmento de 200 pb del ADNr 18S las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización previa a 94° C por 30 s, 20 ciclos de: desnaturalización a 94° C por 30 s, alineación a 60° C por 20 s y extensión a 72° C por 30 s, con una extensión final de 72° C por 7 min. La mezcla de reacción consistió de 50 mM de MgCl_2 , 1 mM de cada componente del dNTP mix, 20 pmoles de cada cebador, 2.5 μl de amortiguador de PCR

10X, 0.5 U de Taq DNA polimerasa, 10 ng de cDNA en 25 µl de volumen total de reacción.

3.3.4 La Técnica cDNA- AFLP

En esta parte del trabajo se menciona de manera resumida los pasos seguidos durante la realización del cDNA-AFLP; los cuales se detallan en la sección de anexos.

Digestion y ligación de adaptadores. La técnica cDNA-AFLP fue realizada como describen Vos *et al* (1995) y Bachem *et al* (1998), con algunas modificaciones: se llevó a cabo una primera digestión de una concentración de 300 ng/µl del cDNA con 0.2 µl de 5U de la enzima Mse I (Invitrogen) durante 3 h a 37°C, posteriormente se adicionó 0.2 µl de 10U de la enzima Eco RI y se dejó actuar durante 3 h a 37°C, ambas enzimas se inactivaron a 70° C por 15 min. Se ligaron adaptadores complementarios a los cortes de las enzimas durante 12 h a 16-20°C utilizando 1U de DNA ligasa y 1 µl de los pares de adaptadores (cuadro 3.2.) para ambas enzimas (5 µM de e-Eco RI y 50 µM de e-Mse I) para generar los fragmentos para la amplificación.

Amplificación pre-selectiva. La preamplificación se llevó a cabo con cebadores para AFLP (Cuadro 3.2) que tenían una base selectiva utilizando cebadores para AFLP Mse I con una C como nucleótido selectivo y Eco RI con una A como nucleótido selectivo. La reacción de preamplificación consistió en un volumen de 25 µl con 2.5 µl de buffer de PCR 10X, 0.75 µl de 50 mM de cloruro de magnesio, 0.75 µl de 30 µM de cada cebador, 2.5 µl de 2 mM de dNTPs, 5 µl del cDNA ligado y diluido (1:10) y 0.125 µl de 5U de Taq-DNA polimerasa (Invitrogen). El PCR se realizó por 20 ciclos de 92°C por 1 min, 56 °C por 30 s y 72 °C por 1 min.

Amplificación selectiva. El producto de la amplificación pre-selectiva se diluyó (1:10) y se utilizaron 5 µl de dicha dilución para la amplificación selectiva utilizando 5 combinaciones de cebadores que ya habían mostrado un alto nivel de polimorfismo en *M. acuminata malaccensis* (Youssef *et al.*, 2010), (Cuadro 3.2). Cada reacción de 20 µl de amplificación selectiva consistió de 2 µl de buffer de PCR 10X, 0.6 µl de 50 mM de cloruro de magnesio, 0.2 µl de 20 µM del primer para Eco RI, 0.3 µl de 20 µM del primer para Mse I, 2 µl de 2 mM de dNTPs, 5 µl de la reacción de preamplificación diluida (1:10) y 0.25 µl de

5U de Taq-DNA polimerasa (Invitrogen). La amplificación de PCR consistió de 11 ciclos de 94°C por 30 s, 65 °C por 30 s (-0.7 °C por ciclo) y 72 °C por 1 min; así como 24 ciclos adicionales de 94°C por 30 s, 65 °C por 30 s y 72 °C por 1 min.

3.3.5 Obtención de secuencias de TDFs

Electroforesis en geles de secuenciación. Los productos amplificados fueron mezclados con igual volumen de buffer de carga (98% formaldehído, 10 mM de EDTA (ethylenediamine tetra-acetic acid), pH 8.0, 0.01% de azul de bromofenol, 0.01% xylene cyanol), sometidos durante 3 min a 95° C y colocados en hielo. Las muestras fueron corridas en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 6% en buffer TBE al 0.5X. Se realizó una tinción con plata (Bassam *et al*, 1991), siguiendo el protocolo mencionado en anexos, se dejó secar el gel toda la noche y se escaneó para realizar el conteo manual de las bandas.

Evaluación de geles y selección de bandas diferenciales. Las muestras fueron ordenadas por estadios de desarrollo en el siguiente orden 1: Embrión cigótico inmaduro, 2: Embrión somático inmaduro, 3: Suspensión celular embriogénica, 4: Embrión cigótico maduro, 5: Embrión somático maduro, 6: Embrión somático germinado. Los pares de cebadores utilizados fueron los siguientes: E4-M1, E1-M3, E4c-M10, E7c-M10 Y E15c-M10, cuyas secuencias se mencionan en el Cuadro 3.2., se realizó el conteo del total de bandas de acuerdo al criterio de presencia-ausencia y se obtuvieron las bandas diferenciales (únicamente presentes en momentos específicos del desarrollo embriogénico) de las presentes en todo el proceso embriogénico.

Amplificación de bandas diferenciales: Las bandas de interés fueron cortadas del gel con bisturí y eluidas en 25 µl de buffer para PCR al 2X. Alícuotas de 25 µl fueron utilizadas como templados para la reamplificación de las bandas utilizando cebadores idénticos a los empleados para la amplificación selectiva del AFLP y con las condiciones de PCR utilizadas para la preamplificación. Los productos reamplificados fueron observados en geles de agarosa al 1.2%, de donde se purificaron con el QIAEX II Gel Extraction kit (QUIAGEN) y fueron clonados en el pGEM-T Easy vector (Promega) de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Se transformaron células competentes de *Escherichia coli* DH5α mediante choque térmico y se realizó la extracción de los

plásmidos. Se comprobó la inserción de fragmentos mediante la digestión con EcoRI o mediante PCR (en anexos).

Se enviaron a secuenciar 5 clonas por TDF a Macrogen Incorporation (Korea). Se realizó la edición para eliminar las secuencias del vector de clonación y se obtuvieron las secuencias consenso mediante el paquete DNASTar versión 5.0. Las secuencias fueron comparadas en distintas bases de datos públicas (GENBANK, REFSEQ_PROT, EMBL, DDBJ) con el fin de determinar su grado de homología con otras proteínas ya caracterizadas.

3.4 RESULTADOS

El estudio morfo-histológico por microscopia de luz transmitida y de barrido (MEB) de la ontogénesis de la embriogénesis cigótica y somática permitió definir los estadios de la embriogénesis y los respectivos tiempos de colecta de material biológico para el estudio de la expresión diferencial de genes relacionados con la embriogénesis de *M.a.m.*

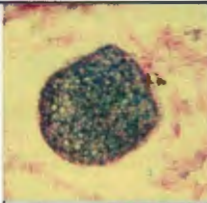
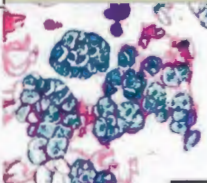
El análisis histológico de semillas de diferentes edades posteriores a la fertilización (dpf) mostró que a los 61-65 dpf las semillas contienen embriones del tipo globular cuyas células están en activa división celular, y se observa una incipiente bicapa de protodermis, (Cuadro 3.1, figura del recuadro correspondiente a embriogénesis cigótica temprana), el embrión de 67 dpf tiene forma acorazonada con incipientes evidencias de polarización (diferenciación de ejes apical y caulinar); mientras que a los 70 dpf se evidencia indicios de diferenciación en forma de una hendidura o invaginación en el embrión, y la acumulación de almidones y proteínas. Se comprobó que los embriones cigóticos se encontraban en estado inmaduro hasta antes de cumplir los 70 días posteriores a la fertilización (dpf) y correspondían a estructuras globulares cristalinas.

El análisis por MEB de embriones cigóticos de *M.a.m.* extraídos de semillas triangulares que medían ≥ 5 mm de cada lado y cuya testa es rugosa, negra y extremadamente dura, se observó que los embriones maduros de 100 dpf tienen forma de hongo, característico de las musáceas, con una porción agrandada (haustorio) y una región angosta o pie que representa el eje epicotilo-hipocótilo-radícula y una parte del cotiledón (Cuadro 3.1, figura del recuadro correspondiente a embriogénesis cigótica tardía). En este estadio el embrión es blanco opaco debido a las reservas de almidón que ha almacenado, mientras que el

abundante endospermo de las semillas que rodea a los embriones ya se le encuentra en forma de gránulos almidón.

Las características de los estadios maduros e inmaduros de embriones cigóticos y somáticos, de las suspensiones embriogénicas y embriones somáticos germinados (con emergencia de la plúmula) utilizados para el análisis de transcritos se presentan en el cuadro 3.1.

Cuadro 3.1 Material vegetal utilizado para la extracción de RNA y subsecuente técnica de cDNA-AFLP en *M.a.m.* Se incluye una imagen de cada estadio y se describe en cada caso las características del material vegetal utilizado y el momento de su obtención.

MATERIAL VEGETAL				
EMBRIOGÉNESIS				GERMINACIÓN
CIGÓTICA	TEMPRANA	TARDÍA		
Embriones globulares translúcidos obtenidos de semillas de 60 días después de la fertilización.		Embriones con forma de hongo y de color blanco opaco obtenidos de semillas de 100 días después de la fertilización.		
Suspensiones celulares al final del ciclo de crecimiento, antes de renovar el medio líquido.				
Embriones globulares translúcidos después de 62 días en el medio de maduración (30 g/l sac. sin PF) población asincrónica.		Embriones blancos opacos con hendidura cotiledonaria, después de 62 días en medio de maduración (30 g/l sac. y PF) población sincrónica.		
				Embriones con emergencia de la plúmula después de 9 días en medio de germinación.

La calidad del RNA total extraído de los tejidos seleccionados se corroboró mediante electroforesis en geles de agarosa (Figura 3.1); donde se observó la integridad de las

bandas que corresponden al RNAr 18S y 25S.

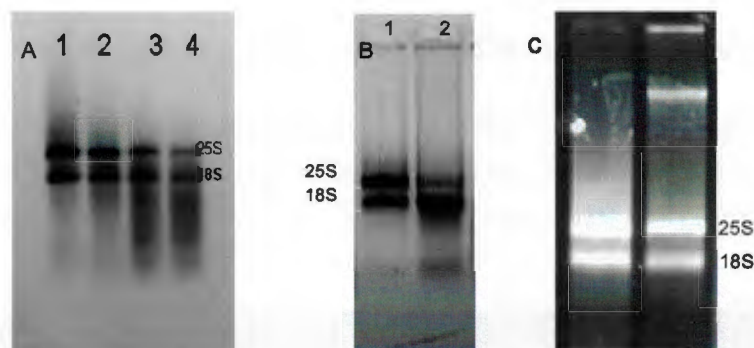


Figura 3.1 Electroforesis en gel de agarosa al 1% del RNA total extraído con un protocolo adaptado para *M.a.m.*, tinción bromuro de etidio A) RNA obtenido de embriones cigóticos maduros B) RNA de embriones somáticos maduros C) RNA de callo embriogénico obtenido después de cinco meses de cultivo. Las bandas representan al RNAr 18S y 25S.

Para comprobar que el RNA era apropiado para los experimentos de expresión diferencial, se amplificaron diversos genes constitutivos; actina, RNAr 18S y RNAr 5S, la Figura 3.2 muestra la amplificación de un fragmento de ~200 pb del gen 18S a partir de cDNA de cinco tejidos.



Figura 3.2 Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la amplificación de un fragmento del gen 18S

a partir de cDNA de banano. 1) Embrión somático germinado, 2, 3) Embrión somático inmaduro y maduro respectivamente, 4) Embrión cigótico inmaduro, 5) Suspensiones celulares (células pre-embriónicas).

La amplificación de los fragmentos derivados de transcritos (TDFs) para los diferentes tejidos embriónicos se alcanzó para las cinco combinaciones de cebadores AFLP (Cuadro 3.2.) selectivos probados, seleccionados con base al que mostraron porcentajes de polimorfismo mayor al 70% en musaceas diploides, (Youssef et al. (2010..

Cuadro 3.2 Pares de Adaptadores y Cebadores utilizados durante la ligación, amplificación pre-selectiva y amplificación selectiva del AFLP. Se mencionan las secuencias de los cebadores y en negritas se especifican los nucleótidos selectivos. CAP se refiere a los cebadores para amplificación preselectiva.

Pares de cebadores	Adaptadores / Cebadores	Secuencia 5'-3'
	Adaptador1 eEco RI	CTCGTAGACTGCGTACC
	Adaptador2 eEco RI	AATTGGTACGCAGTCT
	Adaptador1 eMse I	GACGATGAGTCCTGAG
	Adaptador2 eMse I	TACTCAGGACTCAT
	CAP-eEcoRI -01	GACTGCGTACCAATTCC
	CAP-eMse I -02	GATGAGTCCTGAGTAAC
	EcoRI, 3+	Mse I, 3+
1. E4-M1	GACTGCGTACCAATT CACG	GATGAGTCCTGATA ACAA
2. E1-M3	GACTGCGTACCAATT CAAC	GATGAGTCCTGATA ACAG
3. E4C-M10	GACTGCGTACCAATT CCAC	GATGAGTCCTGATA ACCG
4. E7C-M10	GACTGCGTACCAATT C CGC	GATGAGTCCTGATA ACCG
5. E15C-M10	GACTGCGTACCAATT CCTC	GATGAGTCCTGATA ACCG

Al realizar el cDNA-AFLP, se obtuvieron un total de 253 TDFs (Transcript Derived Fragments) visualizados como bandas con un tamaño de 100 a 1000 pb; de los cuales un 8.3% mostraron expresión diferencial (21 TDFs) durante distintos momentos del proceso de embriogénesis. Los estadios diferenciales seleccionados se muestran en el cuadro 3.1 y correspondieron a embrión cigótico y somático inmaduro (1, 2), suspensión celular o células pre-embriónicas (3), embrión cigótico y somático maduro (4, 5) y embrión somático germinado (6), este fue el orden que se siguió al cargar las muestras en el gel de poliacrilamida de la Figura 3.3. Se observó una mayor expresión de genes (mayor cantidad de TDFs) durante embriogénesis somática.

Los números remarcados sobre el gel de poliacrilamida corresponden a los transcritos que mostraron expresión diferencial de acuerdo a la combinación de cebadores señalada en la parte inferior, en donde se observó que la combinación E1-M3 proporciona una mayor cantidad de bandas diferenciales (ver cuadro en anexos). Solo los TDFs con expresión diferencial fueron reamplificados, clonados y secuenciados para comparar en bases de datos públicas. Con la combinación de cebadores E1-M3 se obtuvo una mayor cantidad de fragmentos amplificados (Figura 3.3).

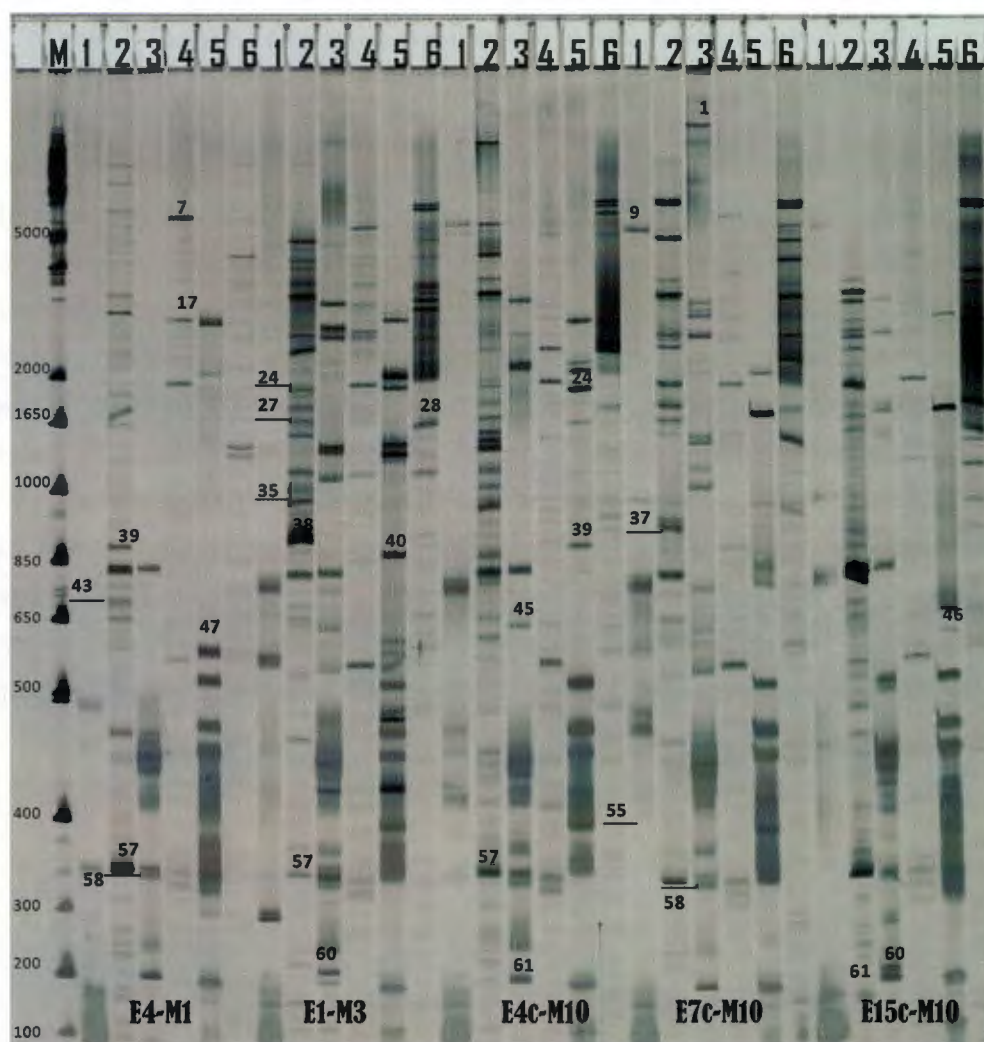


Figura 3.3 Gel de poliacrilamida al 6% del cDNA-AFLP realizado sobre distintos estadios de la embriogénesis de *M.a.m.* donde se señalan los TDFs diferenciales con números. 1: Embrión

cigótico inmaduro, 2: Embrión somático inmaduro, 3: Suspensión celular, 4: Embrión cigótico maduro, 5: Embrión somático maduro, 6: Embrión somático germinado. E4-M1, E1-M3, E4c-M10, E7c-M10 Y E15c-M10 son las combinaciones de cebadores utilizadas.

En este trabajo, únicamente se consideraron aquellos transcritos que mostraron expresión diferencial durante determinados momentos del proceso embriogénico (21 TDFs) y no aquellos con expresión constante durante todo el proceso de embriogénesis (232 TDFs). Al hacer la comparación de los transcritos que mostraban expresión diferencial, las diferencias en los niveles de expresión fueron consideradas en base a la intensidad de las bandas por apreciación óptica.

En la Figura 3.4 se presentan algunos de los TDFs que mostraron expresión diferencial. En embriogénesis temprana (Figura 3.4A) se encontró una banda que correspondió al TDF 57, característico de embriones cigóticos y somáticos inmaduros, así como de suspensiones celulares (células pre-embriogénicas). Dentro del periodo denominado embriogénesis tardía (embriones cigóticos y somáticos maduros), se observó que el TDF 17 mostró una mayor expresión (Figura 3.4B); en la figura 3.4C se observa que en embriones cigóticos inmaduros, el TDF 9 mostró una mayor intensidad (mayor nivel de expresión); en embriones cigóticos maduros fue la banda que corresponde al TDF 7 la que mostró una mayor intensidad (Figura 3.4D). La banda que corresponde al TDF 43 fue expresado con mayor intensidad en embriones somáticos inmaduros y el TDF 47 presenta una mayor intensidad en embriones somáticos maduros (Figura 3.4.F). En embriones somáticos germinados se observó una mayor intensidad de expresión del TDF 28 (dato no mostrado).

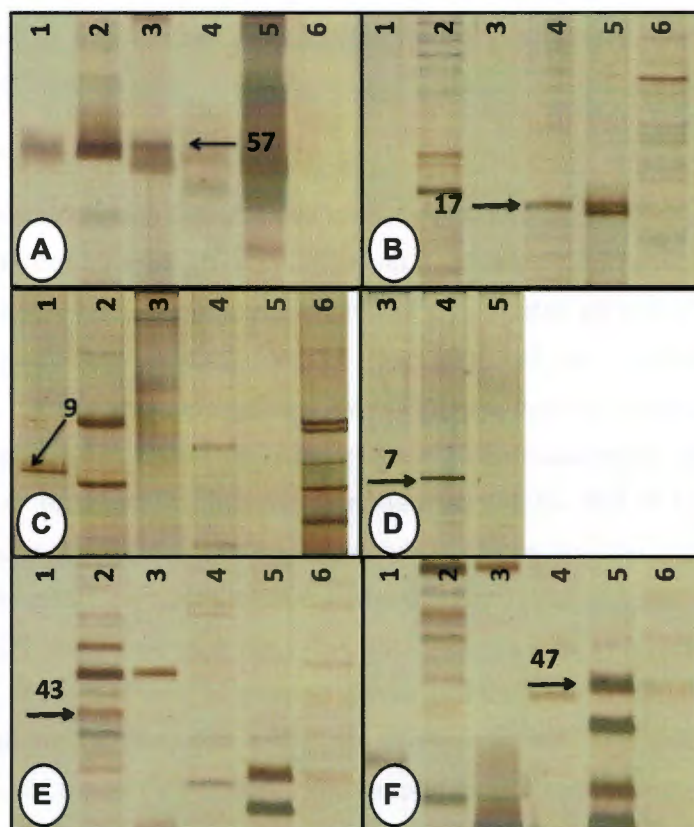


Figura 3.4 Fragmentos de transcritos expresados diferencialmente durante distintos momentos de la embriogénesis de *M.a.m.* Con una flecha se señala el TDF que presenta expresión diferencial y el número de identificación se señala en la parte superior. A) Embriogénesis temprana, B) embriogénesis tardía, C) embrión cigótico inmaduro, D) embrión cigótico maduro, E) embrión somático inmaduro, F) embrión somático maduro. Los números en la parte superior de cada imagen corresponden al material vegetal: 1: embrión cigótico inmaduro, 2: embrión somático inmaduro, 3: suspensión celular, 4: embrión cigótico maduro, 5: embrión somático maduro, 6: embrión somático germinado.

Al comparar las secuencias obtenidas de las clonas de los fragmentos derivados de transcritos (TDFs) se observó que una gran cantidad de ellas mostraban homología con proteínas hipotéticas o desconocidas de diferentes especies de plantas; entre ellas principalmente *Musa acuminata*, *Musa balbisiana*, *Oryza sativa* y *Pinus radiata*, los resultados se resumen en el cuadro 3.3. El rango de tamaño de los TDFs varió de 68 a 299 pb.

En los embriones cigóticos maduros solamente se encontró una clona que correspondió a una proteína hipotética de *O. sativa* con un tamaño de 76 pb; hubieron dos proteínas que se expresaron en todos los estadios de la embriogénesis somática y que correspondieron a proteínas hipotéticas de *M. acuminata* (TDFs 24-2-1 y 46-45-4). En embriones somáticos inmaduros se encontraron dos proteínas desconocidas de *O. sativa* (TDFs 43-1-3, 43-1-4) cuyos tamaños eran de 68 y 225 pb respectivamente; en embriones somáticos maduros el TDF 47-1-3 correspondió también a una proteína desconocida de *O. sativa*. En células en suspensión (células pre-embriogénicas) se encontró una mayor cantidad de TDFs expresados diferencialmente, entre ellos tres TDFs correspondieron a proteínas hipotéticas de *M. acuminata* (TDFs 7-1-4, 58-1-2, 60-1-3), el TDF 1-4-2 de 71 pb correspondió a una proteína hipotética de *M. balbisiana* y el TDF 60-5-7 a una proteína desconocida de *O. sativa*. En secuencias de TDFs comunes a embriones cigóticos y somáticos en estadios tempranos se encontraron tres TDFs (57-4-1, 57-4-5 y 57-4-6), el primero con homología a una proteína hipotética de *M. balbisiana* y los dos últimos con homología a proteínas de *M. acuminata* también de función desconocida; en estadios tardíos se encontraron dos secuencias (TDFS 17-1-1 y 17-1-5) con tamaños de 75 y 299 pb y con homología a una proteína desconocida de *O. punctuate* y una proteína hipotética de *M. acuminata*.

Cuadro 3.3 Clasificación de los TDFs encontrados en *M.a.m.* que tuvieron homología con proteínas desconocidas o no caracterizadas.

TDF	Tamaño(pb)	Homología y Especie
SECUENCIAS ENCONTRADAS EN EMBRIOGÉNESIS CIGÓTICA		
SÓLO EN EMBRIONES CIGÓTICOS MADUROS		
7-1-1	76	Proteína hipotética de <i>O. sativa</i>
SECUENCIAS ENCONTRADAS EN EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA		
EN TODOS LOS ESTADIOS DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA		
24-2-1	286	Proteína hipotética de <i>M. acuminata</i>
46-5-4	119	Proteína hipotética de <i>M. acuminata</i>
SÓLO EN EMBRIONES SOMÁTICOS INMADUROS		
43-1-3	68	Proteína desconocida de <i>O. sativa</i>
43-1-4	225	Proteína desconocida de <i>O. sativa</i>
SÓLO EN EMBRIONES SOMÁTICOS MADUROS		
47-1-3	148	Proteína desconocida de <i>O. sativa</i>
SÓLO EN CÉLULAS EN SUSPENSIÓN (CÉLULAS PRE-EMBRIOGÉNICAS)		
1-4-2	71	Proteína hipotética de <i>M. balbisiana</i>
7-1-4	71	Proteína hipotética de <i>M. acuminata</i>
58-1-2	94	Proteína hipotética de <i>M. acuminata</i>
60-1-3	71	Proteína hipotética de <i>M. acuminata</i>
60-5-7	116	Proteína desconocida de <i>O. sativa</i>
SECUENCIAS COMUNES A EMBRIONES CIGÓTICOS Y SOMÁTICOS		
ESTADIOS TEMPRANOS (EMBRIONES INMADUROS Y CÉLULAS PRE-EMBRIOGÉNICAS)		
57-4-1	71	Proteína hipotética de <i>M. balbisiana</i>
57-4-5	126	Proteína hipotética de <i>M. acuminata</i>
57-4-6	75	Proteína desconocida de <i>M. acuminata</i>
ESTADIOS TARDÍOS (EMBRIONES MADUROS)		
17-1-1	75	Proteína desconocida de <i>O. punctate</i>
17-1-5	299	Proteína hipotética de <i>M. acuminata</i>

Las secuencias que mostraron homología con proteínas identificadas y caracterizadas sus funciones biológicas se muestran en el Cuadro 3.4. Se realizó una clasificación de los TDFs encontrados embriogénesis cigótica, diferenciando embriones maduros de inmaduros, TDFs expresados en embriogénesis somática (embriones maduros, inmaduros y células pre-embriogénicas) y TDFs comunes a embriones cigóticos y

somáticos en estadios tempranos y tardíos del desarrollo del embrión.

En embriones cigóticos inmaduros se encontró únicamente el TDF 9-4-1 que tuvo homología a una trehalosa 6-fosfato sintasa; también en embriones cigóticos maduros solamente se encontró un TDF (7-1-2) con homología a una proteína cinasa.

En embriogénesis somática se expresaron una mayor cantidad de TDFs y por consiguiente, en este sistema se encontró una mayor cantidad con expresión diferencial. Se encontraron seis TDFs presentes en todos los estadios de embriogénesis somática (tanto embriones maduros como inmaduros así como células pre-embriogénicas), que correspondieron a distintas proteínas relacionadas con algún proceso biológico como metabolismo de carbohidratos (TDF 39-3-3), con alguna función molecular TDFs 24-2-1, 24-3-1, 39-3-1, 46-5-5 (transducción de señales o replicación) y con componentes celulares TDF 46-5-4 (organización del citoesqueleto).

Los TDFs presentes en embriones somáticos inmaduros fueron 8 y la mayoría correspondieron a proteínas con alguna función molecular (factores de replicación, de elongación, proteínas de unión a calcio, entre otras); también hubo TDFs relacionados con procesos biológicos como la síntesis y degradación de proteínas (TDF 35-2-3) y el TDF 37-4-4 corresponde a un componente celular (la actina componente importante de la organización del citoesqueleto).

En embriones somáticos maduros -se encontró TDFs, tres tuvieron funciones moleculares (55-3-3, 47-1-3 y 47-1-5) y los otros seis se relacionaron con procesos biológicos entre los que se encontraban dormancia y metabolismo de carbohidratos.

En células en suspensión (pre-embriogénicas) los TDFs correspondieron a proteínas con funciones moleculares, principalmente relacionadas con transducción de señales, solo el TDF 45-3-1 estuvo relacionado con el metabolismo de carbohidratos (proceso biológico) y el TDF 7-1-3 con un componente celular relacionado con lignificación de tejidos.

En estadios tempranos de la embriogénesis se encontraron dos secuencias comunes tanto a embriones cigóticos como somáticos inmaduros que correspondieron a procesos biológicos y ciclo celular (TDFs 57-3-6 y 57-4-5) y una secuencia, el TDF 57-3-3 con una función molecular (replicación). En estadios tardíos se encontró que el TDF 17-1-5 esta

relacionado con el proceso biológico de respuesta a estrés (Cuadro 3.4).

Cuadro 3.4 Clasificación de los TDFs encontrados en *M.a.m.* con homología a proteínas caracterizadas.

TDF	Tamaño (pb)	Número de accesión	Base de Datos Pública	Homología, Probable Función y Especie	E-value Blastx/BI astn
SECUENCIAS ENCONTRADAS EN EMBRIOGENESIS CIGÓTICA					
A) SÓLO EN EMBRIONES CIGÓTICOS INMADUROS					
9-4-1	120	AAX16015.1	GENBANK	(1) <i>Trehalose-6-phosphate synthase (Ginkgo biloba)</i> , es esencial en las plantas y está implicada en la regulación del metabolismo de carbohidratos y en le desarrollo del embrión; en <i>Arabidopsis</i> es esencial para la maduración del embrión	2.0e-63
B) SÓLO EN EMBRIONES CIGÓTICOS MADUROS					
7-1-2	88	XP_474874.1	REFSEQ_PROT	(2) <i>Signal transduction histidine kinase (Oryza sativa)</i> , probablemente involucrada en la transducción de señales por citocininas, posiblemente como receptor de citocininas.	4.0e-26
SECUENCIAS ENCONTRADAS EN EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA					
C) EN TODOS LOS ESTADIOS DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA					
24-2-1	286	XP_479475.1	REFSEQ_PROT	(2) <i>Putative TGF (transforming growth factor) beta inducible nuclear protein TINP1 (Oryza sativa)</i> , involucrada en transducción de señales.	1e-17
24-3-1	285	XP_469953.1	REFSEQ_PROT	(2) <i>Putative replication factor (Oryza sativa)</i> , expresado fuertemente en tejidos en proliferación, en el meristemo apical del vástago (SAM: shoot apical meristem), muy débilmente expresado en tejidos maduros que no se encuentran en proliferación.	3.0e-12
39-3-1	285	XP_469953.1	REFSEQ_PROT	(2) <i>Putative replication factor (Oryza sativa)</i> , expresado fuertemente en tejidos en proliferación.	3.0e-12
39-3-3	120	AAX16015.1	GENBANK	(1) <i>Trehalose-6-phosphate synthase (Ginkgo biloba)</i> , es esencial en las plantas y está implicada en la regulación del metabolismo de carbohidratos y en le desarrollo del embrión; en <i>Arabidopsis</i> es esencial para la maduración del embrión.	2.0e-63
46-5-4	119	BAD88311.1	DDBJ	(3) <i>Adenylyl cyclase-like protein (Oryza sativa)</i> ; se encuentra relacionada con el proceso biológico de organización del citoesqueleto y su función molecular es la unión de actina.	4.0e-22
46-5-5	263	NP_916295.1	REFSEQ_PROT	(2) <i>Putative receptor-protein kinase (Oryza sativa)</i> ; se encuentra relacionada con la fosforilación de proteínas y su función molecular es la unión de ATP, es una proteína cinasa tipo serina/treonina con actividad de receptor.	4.0e-25
D) SÓLO EN EMBRIONES SOMÁTICOS INMADUROS					
27-2-1	285	XP_469953.1	REFSEQ_PROT	(2) <i>Putative replication factor (Oryza sativa)</i> , expresado fuertemente en tejidos en proliferación, en el meristemo apical del vástago (SAM: shoot apical meristem), muy débilmente expresado en tejidos maduros que no se encuentran en proliferación.	3.0e-12
35-2-3	225	XP_481142.1	REFSEQ_PROT	(2) <i>Putative chloroplast nucleoid DNA binding protein (Oryza sativa)</i> ; putative aspartyl protease protein; su papel biológico no se encuentra totalmente establecido; sin embargo, se cree que está involucrada en el procesamiento y degradación de proteínas bajo diferentes condiciones y en diferentes estadios de la planta sugiriendo alguna función especializada.	1.0e-12
35-2-3	225	CAA60681.1	EMBL	(1) <i>Protein B1 hordein (Hordeum vulgare)</i> , son el mayor grupo de proteínas de reserva de prolaminas en cebada; expresada específicamente en el endospermo en desarrollo.	5.0e-25
37-4-4	69	HO058978	GENBANK	(3) <i>Putative Actine 2 (Muse acuminata AAA)</i> .	
37-4-6	84	AAB38974.1	GENBANK	(2) <i>Poly(A)-binding protein (Triticum aestivum)</i> , con un papel importante durante inicio de traducción.	3.0e-71
43-1-1	183	AAM52883.1	GENBANK	(1) <i>GRF1-interacting factor 3 (Arabidopsis thaliana)</i> , desempeña un papel importante durante el control de la proliferación celular vía regulación del ciclo celular y en otras actividades relacionadas con la función del meristemo apical del vástago.	4.0e-25
43-1-2	161	NP_915149.1	REFSEQ_PROT	(2) <i>Putative calreticulin (Oryza sativa)</i> , es la mayor proteína de unión a Ca ²⁺ . Implicada en una amplia variedad de funciones celulares tales	6.0e-4

43-1-2	161	CAA90651.1	EMBL	como almacenaje de calcio, actividad de chaperona y señalización dentro del citoplasma y en el retículo endoplasmático, y con un papel potencial en regular la respuesta a estrés. (2) Elongation factor 1-alpha (<i>Hordeum vulgare</i>) Elongation factor 1-alpha (EF-1-alpha) translation elongation factor 1 alpha-subunit, un polipéptido con un papel central en la síntesis de proteínas, sus niveles se incrementan con los altos niveles de síntesis de proteínas en tejidos en desarrollo.	3.0e-59
E) SÓLO EN EMBRIONES SOMÁTICOS MADUROS					
47-1-2	148	AAM74066.1	GENBANK	(2) CONSTANS-like protein (<i>Hordeum vulgare</i>), tiene un papel importante en la vía de floración controlada por fotoperíodo, principalmente expresada en dormancia sugiriendo su participación en el control transcripcional del fotoperíodo durante la inducción y mantenimiento de la dormancia.	1.0e-115
47-1-3	148	AAW52722.1	GENBANK	(1) Peroxidase 8 (<i>Triticum monococcum</i>); desempeña un papel importante en la detoxificación de los efectos del peróxido de hidrógeno en plantas superiores. Su expresión es mediada por la acumulación de ABA.	3.0e-67
47-1-4	149	XP_549801.1	REFSEQ_PROT	(2) Putative GTPase-activating protein (<i>Oryza sativa</i>); son proteínas de unión al nucleótido guanina que usualmente exhiben actividad de GTPasa y tienen un papel importante en transducción de señales.	4.0e-36
47-1-5	192	BAD54156.1	DDBJ	(1) Putative Acid phosphatase precursor 1 (<i>Oryza sativa</i>); durante la germinación, el embrión de cebada libera sustancias tipo giberelinas que inducen que la aleurona libere diversas enzimas hidrolíticas, las cuales subsecuentemente degradan el almidón del endospermo para proporcionar una fuente de carbón y energía para el crecimiento del embrión.	1.0e-10
47-1-5	192	BAD29369.1	DDBJ	(1) dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase-like (<i>Oryza sativa</i>); enzima involucrada en remodelamiento de la pared celular y en metabolismo de carbohidratos.	3.0e-98
55-3-2	120	AAX16015.1	GENBANK	(1) Trehalose-6-phosphate synthase (<i>Ginkgo biloba</i>), es esencial en las plantas y está implicada en la regulación del metabolismo de carbohidratos y en el desarrollo del embrión; en <i>Arabidopsis</i> es esencial para la maduración del embrión.	2.0e-63
55-3-3	126	AAP82174.1	GENBANK	(2) CIPK-like protein (<i>Oryza sativa</i>); son un grupo de proteínas cinasas tipo Ser/Thr altamente inducibles por diversas señales tales como frío, luz, sales, carbohidratos y citoquininas; similares a las proteínas de la familia calcineurin B-like protein (CBL)-interacting protein kinases (CIPKs).	2.0e-67
55-3-3	126	AAA18558.2	GENBANK	(1) Similar to GTP-binding proteins (<i>Zea mays</i>); probablemente involucrada en regulación del ciclo celular y diferenciación.	2.0e-22
55-4-2	120	AAX16015.1	GENBANK	(1) Trehalose-6-phosphate synthase (<i>Ginkgo biloba</i>), es esencial en las plantas y está implicada en la regulación del metabolismo de carbohidratos y en el desarrollo del embrión; en <i>Arabidopsis</i> es esencial para la maduración del embrión.	2.0e-63
F) SÓLO EN CÉLULAS EN SUSPENSIÓN (CÉLULAS PRE-EMBRIOGÉNICAS)					
1-4-1	84	AAB38974.1	GENBANK	(2) Poly(A)-binding protein (<i>Triticum aestivum</i>), juega un papel importante durante la iniciación de la traducción.	3.0e-71
7-1-2	88	XP_474874.1	REFSEQ_PROT	(2) Signal transduction histidine kinase (<i>Oryza sativa</i>), probablemente involucrada en la transducción de señales por citoquininas, posiblemente como receptor de citoquininas.	4.0e-26
7-1-3	122	AAP23942.1	GENBANK	(3) Caffeic acid O-methyltransferase (<i>Triticum aestivum</i>), involucrada en la lignificación del tejido de la planta en respuesta a varios tipos de estrés (mecánico o por ataque de patógenos).	3.0e-85
45-3-1	120	AAX16015.1	GENBANK	(1) Trehalose-6-phosphate synthase (<i>Ginkgo biloba</i>), es esencial en las plantas y está implicada en la regulación del metabolismo de carbohidratos y en el desarrollo del embrión; en <i>Arabidopsis</i> es esencial para la maduración del embrión.	2.0e-63
58-1-3	88	XP_474874.1	REFSEQ_PROT	(2) Signal transduction histidine kinase (<i>Oryza sativa</i>), probablemente involucrada en la transducción de señales por citoquininas, posiblemente como receptor de citoquininas.	4.0e-26
60-5-4	120	XP_470356.1	REFSEQ_PROT	(2) Putative receptor-like protein kinase (<i>Oryza sativa</i>); se encuentra relacionada con la fosforilación de proteínas y su función molecular es la unión de ATP, es una proteína cinesa tipo serina/treonina con actividad de receptor.	3.0e-91
60-5-4	120	AAP86645.1	GENBANK	(2) Peroxisomal membrane protein (<i>Oryza sativa</i>); posee diferentes funciones metabólicas dependiendo del tipo de tejido y del estado de desarrollo del individuo; posee la habilidad de degradar peróxido de hidrógeno y en <i>Arabidopsis</i> se expresa en todos los órganos de plantas maduras y en células del cultivo de tejidos.	5.0e-23
60-5-7	116	CAB10698.1	EMBL	(2) Argininosuccinate lyase (<i>Arabidopsis thaliana</i>); es una enzima que cataliza el desglose reversible de argininosuccinato para producir los aminoácidos arginina y fumarato.	4.0e-27
SECUENCIAS COMUNES A EMBRIONES CIGÓTICOS Y SOMÁTICOS					

G) ESTADIOS TEMPRANOS					
57-3-6	120	AAX16015.1	GENBANK	(1)Trehalose-6-phosphate synthase es esencial en las plantas y está implicada en la regulación del metabolismo de carbohidratos y en el desarrollo del embrión; en <i>Arabidopsis</i> es esencial para la maduración del embrión	2.0e-63
57-3-3	285	XP_469953.1	REFSEQ_PROT	(2)Putative replication factor (<i>Oryza sativa</i>), expressed strongly in the proliferating tissue, the shoot apical meristem (SAM), and very weakly in the mature leaves which have no proliferating tissues.	3.0e-12
57-4-5	126	AAA18558.2	GENBANK	(1)Similar to GTP-binding proteins (<i>Zea mays</i>); involucrada en la regulación de la división celular y en la diferenciación celular.	2.0e-22
H) ESTADIOS TARDÍOS					
17-1-5	299	AAQ92972.1	GENBANK	(1)CTD-phosphatase-like protein (<i>Hordeum vulgare</i>), en respuesta a estrés abiótico e interactúa con factores de transcripción de respuesta a ABA.	1.0e-101

En el cuadro 3.5 se resume la frecuencia de los TDFs implicados en la embriogénesis de *Musa* basados en la categoría funcional en la que estuvieron involucrados y el estadio diferencial del tejido de donde se aislo el transcrito. Se encontró con mayor frecuencia TDF's realcionados con proteínas que desempeñan alguna función molecular de factor de replicación, cinasa relacionada con transducción de señales, unión a proteínas, degradación, etc. Le siguieron en orden descendente aquellas proteínas relacionadas a algún proceso biológico, e.g., ciclo celular, metabolismo de carbohidratos, dormancia, y de respuesta a estrés. Hubo una menor cantidad de TDFs relacionados con componentes celulares tales como organización del citoesqueleto, y lignificación entre otros.

En el estadio diferencial E que corresponde solo a aquellos transcritos relacionados con proteínas descubiertas en embriones somáticos maduros se encontró con mayor frecuencia que los TDFs estuvieron relacionados con procesos biológicos y ninguno de ellos correspondieron a componentes celulares. En los estadios diferenciales A (embriones cigóticos inmaduros) y H (secuencias comunes a embriones cigóticos y somáticos en estadio maduro) se encontraron menos TDFs y se relacionaron con procesos biológicos.

Cuadro 3.5 Categorías de clasificación de TDFs durante los estadios diferenciales de la embriogénesis de *M.a.m.* Los números (1, 2, 3, 4, 5, 6) corresponden a la cantidad de veces que se encontró un TDF de cualquiera de las diversas categorías (1: proceso biológico, 2: función molecular, 3: componente celular) en los estadios diferenciales analizados (A, B, C, D, E, F, G, H).

CATEGORÍAS DE AGRUPAMIENTO DE TDFs	ESTADIOS DIFERENCIALES							
	A	B	C	D	E	F	G	H
(1) PROCESO BIOLÓGICO	1	--	1	2	6	1	2	1
(2) FUNCIÓN MOLECULAR	--	1	4	5	3	6	1	--
(3) COMPONENTE CELULAR	--	--	1	1	--	1	--	--

En el cuadro 3.6 se presenta una comparación de las secuencias de los TDFs con homología a proteínas desconocidas (33%) y con homología a proteínas caracterizadas (67%). Se encontró que en ambos casos, la mayoría de las secuencias se relacionan con estadios tempranos de desarrollo y corresponden mayoritariamente a secuencias aisladas a partir del proceso de embriogénesis somática.

Cuadro 3.6 Clasificación de las secuencias de TDFs encontrados en este trabajo de acuerdo a su homología, el estadio de desarrollo y el proceso embriológico.

SECUENCIAS DE CLONAS DE TDFs 48 Secuencias 100%	CON HOMOLOGÍA A PROTEÍNAS DESCONOCIDAS 16 Secuencias 33%	• EN EMBRIOGÉNESIS TEMPRANA 10 secuencias 21 % ✓ 2 sec. ESI ✓ 5 sec. SCE ✓ 3 sec. Comunes a SCE, ECI y ESI • EN EMBRIOGÉNESIS TARDÍA 4 secuencias 8 % ✓ 1 sec. ECM ✓ 1 sec. ESM ✓ 2 sec. Común en ECM y ESM • TODOS LOS ESTADIOS DE ES 2 secuencias 4 %
	CON HOMOLOGÍA A PROTEÍNAS CARACTERIZADAS 32 Secuencias 67%	• EMBRIOGÉNESIS TEMPRANA 17 secuencias 36% ✓ 1 sec. ECI ✓ 6 sec. ESI ✓ 7 sec. SCE ✓ 3 sec. Comunes a ECI y ESI • EMBRIOGÉNESIS TARDÍA 9 secuencias 19% ✓ 1 sec. ECM ✓ 7 sec. ESM ✓ 1 sec. Común en ECM y ESM • TODOS LOS ESTADIOS DE ES 6 secuencias 12 %

3.5 DISCUSIÓN

Mediante MEB se observó que las características morfológicas generales en embriones cigóticos y somáticos se mantienen. Ambos tipos de embriones presenta en estado maduro la forma de hongo característico de las musáceas; con su región haustorial, parte principal del cotiledón, y el pie del embrión que se encuentra dentro del micrópilo de la semilla (McGahan, 1961; Marroquín et al., 1993). También se observó una gran cantidad de almidón en los embriones cigóticos, que pudieran ocasionar problemas durante la extracción de ácidos nucleicos (Birtic y Kranner, 2006; Kim y Hamada, 2005; Liu *et al.*, 1998). Con el fin de determinar el grado de diferenciación en los embriones cigóticos y obtener embriones maduros e inmaduros como etapas diferenciales del cDNA-AFLP, se fijaron semillas que iban desde los 50 dpa hasta los 100 dpa y se realizaron cortes histológicos. Los resultados de las observaciones realizadas en embriones cigóticos con edades de 61, 64 y 67 dpa, mostraron que el embrión, hasta esta edad, aún no presenta evidencias de polarización (diferenciación de los polos caulinar y radicular); a partir de los 70 dpa el embrión empieza a evidenciar señales de diferenciación que permite considerarlos como maduros. Nuestros datos concuerdan con las observaciones realizadas por Escobedo (1996) que menciona que a los 70 dpa se presenta una incipiente diferenciación en los embriones cigóticos; mientras que los embriones de 40 y 50 dpa corresponden a la descripción de masa pluricelular no diferenciada o proembrión. Con dichos resultados determinamos que los embriones cigóticos inmaduros se obtendrían de semillas en edades menores a 65 dpa, mientras que el estado maduro correspondería a embriones obtenidos de semillas preferentemente mayores a 75 dpa, ya que presentan la forma de hongo que caracteriza al embrión maduro en musáceas.

En los embriones más diferenciados (con forma de hongo), se observó el inicio del proceso de maduración, manifestado como una zona procambial en el interior del embrión. En algunos de los embriones pudo observarse la protodermis, la capa externa del embrión en vías de desarrollo, la cual es el primer tejido que puede identificarse histológicamente durante la embriogénesis somática (West y Harada, 1993). Después de cinco meses de cultivo, se obtuvieron callos embriogénicos con proembriones; las características iniciales de los embriones somáticos corresponden a estructuras globulares translúcidas, similar a los embriones inmaduros de otros cultivares de banano (Navarro *et al.*, 1997; Khalil *et al.*, 2002); posteriormente se forman embriones de color

blanco opaco con forma de hongo y en estadio tipo “torpedo”. Estos últimos tipos de embriones son característicos de dicotiledóneas, ya que en monocotiledóneas se encuentran los estadios globular, escutelar y coleoptilar (Gray, 2000); sin embargo, ya habían sido reportados anteriormente en *Musa* (Mahanom *et al.*, 2008; Escobedo, 1996).

El RNA extraído de embriones cigóticos y somáticos en diferentes estadios de madurez de *Musa acuminata ssp malaccensis* según el protocolo que se basa principalmente en las aportaciones de Chomczynski y Sacchi (1987) y de Almarza *et al.* (2006); es simple, rápido y apropiado para aislar RNA de buena calidad tanto de embriones cigóticos, somáticos y callo embriogénico ($A_{260}/A_{280nm} = 1.9-2.0$). La calidad fue claramente comprobada por las bandas de genes constitutivos que corresponden al RNAr 18 y 25S; se obtuvo cDNA y se amplificaron diversos genes constitutivos (actina de banano, 18s y 5S del RNAr).

La información molecular de la secuenciación del genoma de *Musa* se liberó recientemente (D’Hont *et al.*, 2012). La comparación de secuencias TDF del presente trabajo generalmente fueron homólogas a aquellas de proteínas obtenidas de bibliotecas de cDNA, en donde una gran cantidad de ellas no han sido caracterizadas para determinar su función biológica ni el momento de expresión, también algunas de ellas no han sido completamente secuenciadas. Hubo más secuencias de TDFs homólogos a proteínas desconocidas o hipotéticas en embriogénesis somática que en embriogénesis cigótica. Entre las especies se encontró *M. acuminata* y *M. balbisiana*, *O. sativa*, *O. punctate* y *P. radiata*. Solamente existe un reporte de un gen relacionado con embriogénesis en *Musa*, MaSERK1, el cual fue altamente expresado en tejido embriogénico; utilizado no solamente como marcador molecular de la embriogénesis somática de banano, sino también importante en la repuesta de resistencia a enfermedades en banano (Xia *et al.*, 2010).

Los resultados encontrados en esta investigación forman parte de los primeros trabajos relacionados con el proceso de embriogénesis en *M.a.m.* y abren la posibilidad de estudios moleculares más profundos para la caracterización de cada uno de los TDFs y su relación con el estadio diferencial en el que se encuentran. Se encontró que la mayoría de las secuencias fueron obtenidas del proceso de embriogénesis somática, lo cual ya había sido observado en el gel de secuenciación, probablemente debido a el estrés

inducido durante el cultivo, asimismo, generalmente correspondieron a estadios tempranos de desarrollo; a continuación se discute cada estadio de manera más detallada.

En embriogénesis somática, se encontraron secuencias con homología a proteínas tales como el Putativo TGF (transforming growth factor) beta inducible nuclear protein TINP1, este gen está relacionado con la proliferación celular y la progresión a través del ciclo celular; es decir, está involucrado fuertemente con la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas. Codifica para miembros de la familia de proteínas TGF-beta (transforming growth factor) las cuales están involucradas en embriogénesis y diferenciación celular (Jiang y Clouse, 2001); también se hallaron los TDFs 24-31 y 39-3-1 los cuales fueron homólogos a Replication factors. El factor de replicación C (RFC) está compuesto de cinco subunidades, es un factor importante involucrado en la replicación del DNA y en mecanismos de reparación. En *Oryza sativa* se expresa fuertemente en tejidos en proliferación, como es el caso del meristemo apical del retoño (SAM: shoot apical meristem) y muy débilmente en tejidos maduros como es el caso de tejidos no proliferativos. También cuando se detiene el ciclo celular debido a inhibidores, se observan diferencias en los niveles de expresión de estos genes (Furukawa *et al*; 2003). La clona 39-3-3 fue homóloga a la trehalosa-6-fosfato sintasa, la cual fue hallada en otros sistemas y la clona 46-5-4 fue homóloga a la proteína adenilil ciclasa de *Oryza sativa* cuya función es unir actina durante la organización del citoesqueleto.

Por último, la clona 46-5-5 fue homóloga a una proteína cinasa tipo receptor encargada de la fosforilación de proteínas. Las proteínas cinasas tipo receptores de plantas (RLKs) son receptores de la superficie celular que se encuentran localizados en la membrana plasmática y desempeñan un papel importante en la iniciación de la señalización celular. En plantas, parecen ser proteínas cinasas del tipo serina/treonina. La gran diversidad de RLKs en plantas, refleja sus propiedades estructurales y funcionales (Walter, 1994). Existe un gran número de genes que codifican para RLKs plantas; las cuales se distinguen principalmente debido a diferencias en sus dominios extracelulares. A pesar de que la mayoría de dichas proteínas aún no han sido caracterizadas, diferentes miembros de esta familia son conocidas por estar involucradas en diversos procesos biológicos que incluyen crecimiento y desarrollo vegetal, autoincompatibilidad, percepción de hormonas e

interacciones planta-patógeno (Jakubowska *et al.*, 2007). Las áreas de señalización mediadas por hormonas incluye las respuestas dependientes de ABA y estrés osmótico, herbivoría y ataque por patógenos, así como también las vías de señalización mediadas por etileno y citocininas. Particularmente, los tipos de cinasas con repeticiones ricas en leucina (LRR), contienen de 9 a 26 repeticiones en tándem de motivos ricos en leucina; son una gran subfamilia de RLKs y se encuentran involucradas en varios procesos celulares que incluyen morfogénesis (Torii *et al.*, 1996), embriogénesis (Schmidt *et al.*, 1997), crecimiento meristemático (Clark *et al.*, 1997) y autoincompatibilidad del polen (Muschietti *et al.*, 1998). También se ha visto que algunas respuestas pueden ser reguladas por señales ambientales tales como luz (Deeken y Kaldenhoff, 1997), hormonas (Van der Knaap *et al.*, 1996; Hong *et al.*, 1997; Li y Chory, 1997) y patógenos (Song *et al.*, 1995). En nuestro caso, probablemente se trate de RLKs del tipo de repeticiones ricas en leucina involucradas con la respuesta de las células a la presencia de hormonas que desencadenaron el proceso de embriogénesis.

Se encontraron varias clonas cuya secuencia mostró homología con la trehalosa-6-fosfato sintasa de *Ginkgo biloba*, disacárido no reductor que se acumula en una gran variedad de organismos que toleran el estrés abiótico. Este gen juega un importante papel en la orquestación de la actividad del ciclo celular y la biosíntesis de la pared celular con el metabolismo celular durante el desarrollo embrionario (Gómez *et al.*, 2006). Dicho gen podría actuar a través de un mecanismo de participación del ABA y el metabolismo del azúcar para coordinar la maduración del embrión y el crecimiento vegetativo (Gómez *et al.*, 2010). El único estadio de desarrollo donde no se pudo detectar fue en embrión cigótico maduro.

En suspensiones celulares, tejidos que se encuentran en constante proliferación, se halló la clona 1-4-1 con homología a una proteína de unión a poly A de *Triticum aestivum*, con un papel importante durante la iniciación de la traducción. Muchos RNAs mensajeros eucarióticos poseen una estructura tipo capucha (cap) en el extremo 5 y una cola de poli A en el extremo 3, ambos son requeridos para una eficiente traducción. La cola de poli A se une a la proteína de unión a poli A (PABP), lo cual es necesario para una eficiente traducción (Sachs *et al.*, 1997). Las clonas 7-1-2 y 58-1-3 fueron homólogas a una signal transduction histidina kinase, involucrada en la transducción de señales, probablemente

como receptor de citocininas (Kakimoto, 1996). Las citocininas son hormonas de plantas que tienen papeles esenciales y roles cruciales en varios aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas. Estudios extensivos que involucran la aplicación exógena y contenidos endógenos elevados de citocininas revelan que están involucradas en diversos procesos, tales como la proliferación celular, iniciación del retoño, biogénesis del cloroplasto, dominancia apical e inhibición de la senescencia de la hoja (Mok y Mok, 2001). Debido a que las citocininas promueven la división celular, es probable que durante el cultivo de tejidos, se encuentren niveles muy elevados de citocininas endógenas en las células en suspensión; probablemente debido a ello se encontró una secuencia con homología a una proteína histidina cinasa, la cual se ha visto que pertenece al sistema de señalización de "dos-componente" en donde las histidinas cinasas se autofosforilan en un residuo de histidina conservado, a menudo en respuesta a estímulos ambientales; este fosfato luego se transfiere a un residuo de ácido aspártico como un segundo componente que es referido como el regulador de respuesta (Parkinson, 1993; Swanson et al., 1994). Dicha proteína fue descubierta inicialmente en *Arabidopsis thaliana* como un receptor de citocininas histidina cinasa 4 (AHK4) involucrado con la transducción de señales (Inoue et al., 2001; Ueguchi et al., 2001); se sugiere que las funciones primarias de los genes AHK y las citocininas endógenas son disparar la división celular y mantener la competencia meristemática de las células para evitar la subsecuente diferenciación hasta que un número suficiente de células se haya acumulado durante organogénesis (Nishimura et al., 2004).

También en suspensiones celulares se encontró la clona 7-1-3, la cual fue homóloga a un ácido cafeico o-metiltransferasa de *Triticum aestivum*, involucrada en la lignificación de tejido vegetal. La lignina es un polímero fenólico de la pared celular covalentemente vinculados a la celulosa y hemicelulosa que son los componentes de la pared celular de plantas. La presencia de lignina se limita exclusivamente a las plantas vasculares y se supone que tuvo un importante papel en la exitosa colonización de la tierra por parte de las plantas. La lignina es principalmente depositada en las paredes de ciertas células especializadas como los elementos traqueales, esclerénquima y las fibras del floema. Proporciona rigidez y soporte estructural a la pared y asiste en el transporte de agua y nutrientes dentro del tejido del xilema mediante la disminución de la permeabilidad de la pared de la célula. Además, la lignificación de los tejidos de la planta también se produce

en respuesta a diversos estímulos medioambientales tales como estrés mecánico o ataque de patógenos (Dixon, 2001). El ácido cafeico 3-O metiltransferasa cataliza reacciones de metilación de múltiples pasos de los precursores monoméricos hidroxilados de lignina, ocupa una posición central en la ruta biosintética de la lignina. La hidroxilación de los precursores monoméricos de la lignina representa un paso crítico en la biosíntesis de lignina que influye en la estructura y composición final de lignina (Ma y Xu, 2008).

La clona 45-3-1 mostró homología con la trehalosa-6-fosfato sintasa de *Ginkgo biloba*, la 60-5-4 con una proteína cinasa tipo receptor encargada de la fosforilación de proteínas. También se encontró homología con una proteína peroxisomal de membrana de *Oryza sativa* que degrada peróxido de hidrógeno y que se ha visto expresada en células de cultivo de tejidos de *Arabidopsis thaliana* (TDF60-5-4). La membrana peroxisomal forma una interfaz entre el orgánulo y el resto de la célula (Mullen y Trelease, 1996). Actúa como mediadora no sólo del transporte de metabolitos, sino también de la importación de proteínas para mantener o modificar la identidad y la función del organelo. Es muy seguro que desarrolle un papel importante en el movimiento y división del organelo. La membrana peroxisomal (especialmente de las plantas) es una de las menos caracterizadas, principalmente debido a las dificultades para aislarlas puras y libres de contaminación por otras membranas celulares. Entre las actividades presentes en las membranas peroxisomales de plantas se encuentran la de lipasa alcalina (Maeshima y Beevers, 1985), NADH: Citocromo c reductasa, NADH: ferricianuro reductasa (Hicks y Donaldson, 1982; Fang *et al.*, 1987; Luster y Donaldson, 1987; Struglics *et al.*, 1993), NADH: ascorbato reductasa libre de radicales (Bowditch y Donaldson, 1990), Mn-superóxido dismutasa (Sandalio y del Río, 1988), y una citocromo $\beta 5$ de 18-kd (López-Huertas *et al.*, 1997). La mayoría de estas actividades se cree que están involucradas en las reacciones redox asociada con la reoxidación de NADH, o en defensa contra especies reactivas de oxígeno potencialmente dañinas como el peróxido de hidrógeno y el radical superóxido producidos en la matriz y en las membranas.

Por último, la secuencia de la clona 60-5-7 mostró un mayor porcentaje de homología con la argininosuccinato liasa de *Arabidopsis thaliana*. La argininosuccinato liasa (ASL) es una enzima que cataliza la descomposición reversible de argininosuccinato a arginina y fumarato, una reacción implicada en la biosíntesis de arginina en todas las especies y en

la producción de urea en especies ureotélicas. En *Vitis* spp. la arginina juega un papel principal en el almacenamiento de nitrógeno (Kliewer, 1967); en frutos maduros de *Vitis* spp. ha sido utilizada para indicar el estado del nitrógeno en las uvas (Kliewer y Cook, 1974). Algunos de los genes expresados en este sistema son considerados genes housekeeping.

En embrión cigótico inmaduro se encontró la clona 9-4-1 que fue homóloga a la trehalosa-6-fosfato sintasa de *Ginkgo biloba*. En embrión cigótico maduro el TDF7-1-2 mostró homología con una signal transduction histidina kinase, involucrada en la vía de transducción de señales mediada por citocininas, posiblemente como receptor de citocininas (Kakimoto, 1996), probablemente presente en el sistema analizado (embrión cigótico maduro).

En embriogénesis temprana se hallaron los TDFs 57-3-6 homólogo a la trehalosa-6-fosfato sintasa de *Ginkgo biloba*, 57-3-3 homólogo a un replication factor. El factor de replicación es importante ya que está involucrado en la replicación del DNA y en mecanismos de reparación. En *Oryza sativa* se expresa fuertemente en tejidos en proliferación y muy débilmente en tejidos maduros como es el caso de tejidos no proliferativos (Furukawa *et al*; 2003). Por último, el TDF 57-4-1 correspondió a una proteína de unión a GTP de *Zea mays*, involucrada en la regulación de la división y diferenciación celular, correspondiendo con secuencias que se esperaban encontrar en un sistema en proliferación constante (embriones cigóticos y somáticos inmaduros, y suspensiones celulares).

En embriogénesis tardía se encontró la proteína tipo CTD fosfatasa de *Hordeum vulgare* (TDF17-1-5), la cual interactúa con factores de transcripción de respuesta a ABA y estrés abiótico (Ueda *et al.*, 2008); en nuestro caso fue aislada a partir de embriones cigóticos y somáticos maduros, los cuales se presume tienen altos niveles de ABA, fitohormona que se relaciona con procesos de inhibición de la germinación.

En embriones somáticos inmaduros se encontraron diversas secuencias. La clona 27-2-1 que correspondió a un factor de replicación, involucrado en la replicación del DNA y en mecanismos de reparación. El TDF 35-2-3 a un putativo chloroplast nucleoid DNA binding protein (*Oryza sativa*), cuyo papel biológico no se encuentra completamente establecido

pero podría actuar en procesamiento o degradación de proteínas. También se encontró una proteína hordeína B1 (35-2-3) de *Hordeum vulgare*, expresada específicamente en el endospermo en desarrollo (Forde *et al.*, 1985). Una putativa actina 2 de *Musa acuminata* AAA cultivar enano gigante (TDF37-4-4). El TDF37-4-4 correspondió a proteína de unión a poly A de *Triticum aestivum*, con un papel importante durante la iniciación de la traducción; el TDF43-1-1 correspondió a una proteína tipo GRF1-interacting factor 3, con un papel importante en el control de la proliferación celular a través de la regulación del ciclo celular (Lee *et al.*, 2009); el TDF43-1-2, homólogo con una putativa calreticulina, la mayor proteína de unión a calcio implicada en una gran variedad de funciones celulares; mostrando también homología con el factor de elongación durante la traducción subunidad alfa 1 (EF-1 alpha) que desarrolla un papel central durante síntesis de proteínas por lo que su nivel se incrementa en tejidos en desarrollo. Hubo una total concordancia en las secuencias halladas en este sistema.

En embriones somáticos maduros se encontró el TDF47-1-2, que correspondió a la proteína tipo CONSTANS de *Hordeum vulgare* involucrada en la inducción y mantenimiento de la dormancia del brote (Almada *et al.*, 2009); el TDF47-1-3 correspondió a una peroxidasa 8 de *Triticum monococcum*, cuya expresión en *Oryza sativa* es mediada por una acumulación de ABA. La clona 47-1-4 tuvo homología con una GTPasa activadora involucrada en transducción de señales y la 47-1-5 fue similar a una fosfatasa ácida de *Oryza sativa*, la cual es una enzima hidrolítica que degrada el almidón del endospermo para que el embrión pueda crecer; también mostró similitud con una dTDP-D-glucosa 4-epimerasa involucrada en el remodelamiento de la pared celular de carbohidratos. La clona 55-3-3 presentó un mayor homólogo con una proteína tipo CIPK, que son similares a la familia de proteína quinasa B, altamente inducibles por diversas señales tales como etileno y citocininas (Kim *et al.*, 2003). Dos clonas (TDF55-3-2 y TDF55-3-3) mostraron homología con la trehalosa-6-fosfato sintasa de *Ginkgo biloba*, involucrada en el metabolismo de carbohidratos.

ion during induction of somatic embryogenesis
17-24.

una proteína celular es probablemente la degradación de proteínas. También se encontró una proteína conocida B1 (25-2-3) de Hordeum vulgare, expresada específicamente en el embrión en desarrollo (Forder et al., 1982). Una putativa actina 2 de Musa sapientum AAA cataliza ensayo gigante (TDF37-4-4). El TDF37-4-4 correspondió a proteína de unión a GTP A de Trichum aestivum, con un papel importante durante la iniciación de la iniciación. El TDF43-1-1 correspondió a una proteína tipo GTP-interacting factor 3, con un papel importante en el control de la proliferación celular a través de la regulación del ciclo celular (Lee et al., 2009). El TDF43-1-2, homólogo con una putativa calactina, la mayor proteína de unión a calcio implicada en una gran variedad de funciones celulares, mostraba también homología con el factor de elongación durante la traducción eucariota. El EF-1 alpha (EF-1 alpha) que desempeña un papel central durante síntesis de proteínas por su nivel se incrementa en tejidos en desarrollo. Hubo una total homología en las secuencias halladas en este sistema.

En sistemas somáticos maduros se encontró el TDF47-1-2, que correspondió a la proteína tipo CONSTANS de Hordeum vulgare involucrada en la inducción y mantenimiento de la dormancia del brote (Almada et al., 2009). El TDF47-1-3 correspondió a una proteína B de Trichum monococtum, cuya expresión en Oryza sativa se incrementa por una acumulación de ABA. La clona 47-1-4 tuvo homología con una GTPasa activadora involucrada en transducción de señales y la 47-1-5 fue similar a una proteína activadora de Oryza sativa, la cual es una enzima hidrolítica que degrada el almidón de los embriónes. En el embrión puede crecer; también mostró similitud con una proteína involucrada en el remodelamiento de la pared de los carboxilatos. La clona 22-3-3 presentó un mayor nivel de homología con la proteína tipo GTPK, que son similares a la familia de proteínas B, altamente inducidas por diversas señales tales como etileno y citoquininas (Kim et al., 2003). Dos clones (TDF22-3-2 y TDF22-3-3) en la familia B-fosfo-éster sintasa de Ginkgo biloba, en el sistema de carboxilatos.

on during induction of somatic embryogenesis

17-24

Amann R, et al. (1992). J. Chromatogr. 575: 1-10. *Enzimología y fisiología de las plantas superiores*. Ed. J. Amann. 1992. 1-10.

Amann R, et al. (1992). J. Chromatogr. 575: 1-10. *Enzimología y fisiología de las plantas superiores*. Ed. J. Amann. 1992. 1-10.

Amann R, et al. (1992). J. Chromatogr. 575: 1-10. *Enzimología y fisiología de las plantas superiores*. Ed. J. Amann. 1992. 1-10.

Amann R, et al. (1992). J. Chromatogr. 575: 1-10. *Enzimología y fisiología de las plantas superiores*. Ed. J. Amann. 1992. 1-10.

Amann R, et al. (1992). J. Chromatogr. 575: 1-10. *Enzimología y fisiología de las plantas superiores*. Ed. J. Amann. 1992. 1-10.

Amann R, et al. (1992). J. Chromatogr. 575: 1-10. *Enzimología y fisiología de las plantas superiores*. Ed. J. Amann. 1992. 1-10.

para el
glucosa tipo 4-6
molecular y en el metabolismo.
porcentaje de homología con
proteínas cinasas tipo calcineu.
como frío, luz, sales, carbohidrato.
y 55-4-2) mostraron homología con
involucrada en la regulación del metal.

BIBLIOGRAFÍA

G. Richter (1992). Gene express.

cell suspensions. Planta, 183.

- Almada R., N. Cabrera, J. Casaretto, S. Ruiz-Lara, E. González (2009) VvCO and VvCOL1, two CONSTANS homologous genes, are regulated during flower induction and dormancy in grapevine buds. *Plant Cell Reports*, 28: 1193-1203.
- Almarza J., S. Morales, L. Rincon y F. Brito (2006) Urea as the only inactivator of RNase for extraction of total RNA from plant and animal tissues. *Analytical Biochemistry*, 358: 143–145.
- Bachem C., R. Van der Hoeven, S. de Bruijn, D. Vreugdenhil, M. Zabeau y R. Visser (1996) Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. *The Plant Journal*, 5:745-753.
- Bartos J., O. Alkhimova, M. Doleželová, E. De Langhe y J. Doležel (2005) Nuclear genome size and genomic distribution of ribosomal DNA in *Musa* and *Ensete* (Musaceae): taxonomic implications. *Cytogenetic Genome Research*, 109:50-57.
- Bassman B.J., G. Caetano-Anollés y P. Gresshoff (1991) Fast and Sensitive Silver Staining of DNA in Polyacrylamide Gels. *Analytical Biochemistry*, 196:80-83.
- Boutilier K. R. Offringa, K. Sharma, H. Kieft, T. Ouellet, L. Zhang, J. Hattori, C. Liu, A. van Lammeren, B. Miki, J. Custer y M. van Lookeren (2002) Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *Plant Cell*. 14:1737-1749.
- Bowditch M.I. y R. Donaldson (1990) Ascorbate free-radical reduction by glyoxysomal membranes. *Plant Physiology*, 94: 531–537.
- Breyne P., M. Zabeau (2001) Genome-wide expression analysis of plant cell cycle modulated genes. *Current Opinion Plant Biology*, 4:136-142.
- Choi J.H., L. Liu, C. Borkird y Z. Sung (1987). Cloning of genes developmentally regulated during plant embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences the United States of America*, 84:1906-1910.
- Chomczynski P. y N. Sacchi (1987) Single step method of RNA isolation

- thiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162:156–159.
- Clark S. E., R. Williams y E. Meyerowitz (1997) The CLAVATA1 gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell*, 89: 575–585.
- D' Hont A., F. Denoeu, J.Aury, F.-C. Baurens, F. Carreel, O. Garsmeur, B. Noel, S. Bocs, G. Droc, M. Rouard, C. Da Silva, K. Jabbari, C. Cardi, J. Puolain, M. Souquet, K. Labadie, C. Jourda, J. Lengelle, M. Rodier-Goud, A. Alberti, M. Bernard, M. Correa, S. Ayyampalayam, M. R. Mckain, J. Leebens-Mack, D. Burgess, M. Freeling, D. Mbeguie-A-Mbéguie, M. Chabannes, T. Wicker, O. Panaud, J. Barbosa, E. Hribova, P. Heslop-Harrison, R. Habas, R. Rivallan, P. Francois, C. Poiron, A. Kilian, D. Burthia, C. Jenny, F. Bakry, S. Brown, V. Guignon, G. Kema, M. Dita, C. Waalwijk, S. Joseph, A. Dievert, O. Jaillon, J. Leclercq, X. Argout, E. Lyons, A. Almeida, M. Jeredi, J. Dolozel, N. Roux, A-M. Risterucci, J. Weissenbach, M. Ruiz, J-C. Glaszmann, F. Quetier, N. Yahiaoui and P. Wincker (2012) The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. *Nature*, 488: 213–219, doi:10.1038/nature11241.
- De Jong A.J., J. Cordewener, F. Schiavo, M. Terzi, J. Vandekerckhove, A. Van Kammen y S. De Vries (1992) A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. *Plant Cell*, 4:425–433.
- Deeken R. y R. Kaldenhoff (1997) Light-repressible receptor protein kinase: a novel photo-regulated gene from *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 202: 497–486.
- Ditt R.F., E. W. Nester y L. Comai L (2001) Plant gene expression response to *Agrobacterium tumefaciens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98:10954–10959.
- Dixon R.A. (2001) Natural products and disease resistance. *Nature*, 411:843–847.
- Dolezel J., M. Dolezelová y F. Novák (1994) Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *M. balbisiana*). *Biologia Plantarum*, 36:351–357.

Fang T.K., R. Donaldson y E. Vigil (1987) Electron transport in purified glyoxysomal membranes from castor bean endosperm. *Planta*, 172:1–13.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2008.

Furukawa T., T. Ishibashi, S. Kimura, H. Tanaka, J. Hashimoto y K. Sakaguchi (2003) Characterization of all the subunits of replication factor C from a higher plant, rice (*Oryza sativa* L.), and their relation to development. *Plant Molecular Biology*, 53(1-2):15-25.

Gaj M.D., S. Zhang, J. Harada y P. Lemaux (2005) Leafy cotyledon genes are essential for induction of somatic embryogenesis of *Arabidopsis*. *Planta*, 222: 977–988.

Gómez, L.D., A. Gilday, R. Feil, J. Lunn, y I. Graham (2010). AtTPS1-mediated trehalose 6-phosphate synthesis is essential for embryogenic and vegetative growth and responsiveness to ABA in germinating seeds and stomatal guard cells. *Plant Journal*, 64: 1–13.

Gómez L., S. Baud, A. Gilday, Y. Li y A. Graham (2006). Delayed embryo development in the *ARABIDOPSIS* *TREHALOSE-6-PHOSPHATE SYNTHASE1* mutant is associated with altered cell wall structure, decreased cell division and starch accumulation. *Plant Journal*, 46:69–84.

Hecht V., J. Vielle, M. Harog, E. Schmidt, U. Boutilier, U. Grossniklaus y S. de Vries (2001) The *Arabidopsis* *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1* Gene Is Expressed in Developing Ovules and Embryos and Enhances Embryogenic Competence. *Culture Plant Physiology*, 127, 803–816.

Hicks D.B. y R. Donaldson (1982) Electron transport in glyoxysomal membranes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 215: 280–288.

Hong S.W., J. Jon, J. Kwak y H. Nam (1997) Identification of a receptor-like protein kinase gene rapidly induced by abscisic acid, dehydration, high salt, and cold treatments in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 113: 1203–1212.

Ikeda M., M. Umehara y H. Kamada (2006) Embryogenesis-related genes; Its expression

- and roles during somatic and zygotic embryogenesis in carrot and Arabidopsis. *Plant Biotechnology*, 23: 153–161.
- Inoue, T., M. Higuchi, Y. Hashimoto, M. Seki, M. Kobayashi, T. Kato, S. Tabata, K. Shinozaki y T. Kakimoto (2001). Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from Arabidopsis. *Nature*, 409:1060–1063.
- Jakubowska A, M. Ostrowski, S. Kowalczyk (2007) Plant receptor kinases. *Postepy Biochemii*, 53(2):133-142.
- Jiang J., S. Clouse (2001) Expression of a plant gene with sequence similarity to animal TGF-beta receptor interacting protein is regulated by brassinosteroids and required for normal plant development, 26(1):35-45.
- Kakimoto, T.(1996). CKI1, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science*, 274: 982-985.
- Kim K.N, Y. Cheong, J. Grant, G. Pandey y S. Luan (2003) CIPK3, a calcium sensor-associated protein kinase that regulates abscisic acid and cold signal transduction in Arabidopsis. *Plant Cell*, 15 411-423.
- Kiyosue, T., K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki, K. Higashi, S. Satoh, H. Kamada y H. Harada (1992) Isolation and characterization of a cDNA that encodes ECP31, an embryogenic-cell protein from carrot. *Plant Molecular Biology*, 19: 239–249.
- Kiyosue, T., K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki, H. Kamada, y H. Harada (1993) cDNA cloning of ECP40, an embryogenic-cell protein in carrot, and its expression during somatic and zygotic embryogenesis. *Plant Molecular Biology*, 21: 1053–1068.
- Kliewer W.M. (1967) Annual cyclic changes in the concentration of free amino acids in grape vines. *American Journal of Enology and Viticulture* ,18: 126-137
- Kliewer W.M. y J.A. Cook (1974) Arginine levels in grape canes and fruits as indicators of nitrogen status of vineyards. *American Journal of Enology and Viticulture*, 25:111-118.

- Lee B., J. Ko, S. Lee, Y. Lee, J. Pak y J. Kim (2009) The Arabidopsis GRF-INTERACTING FACTOR Gene Family Performs an Overlapping Function in Determining Organ Size as Well as Multiple Developmental Properties. *Plant Physiology*, 151(2):655–668.
- Li J. y J. Chory (1997) A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell*, 90: 929-938.
- Lievens S., S. Goorichtig, y M. Holsters (2001) A critical evaluation of differential display as a tool to identify genes involved in legume nodulation: looking back and looking forward. *Nucleic Acids Research*, 29:3459-3468.
- Liu J., C. Goh, C. Loh, P. Liu y E. Pua (1998) A method for isolation of total RNA from fruit tissues of banana. *Plant Molecular Biology Reporter*, 16: 1–6.
- Logeman J., J. Schell y L. Willmitzer (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissue. *Analytical Biochemistry*, 163: 16–20.
- López H. E., L. Sandalio, M. Gomez y L. del Río (1997) Superoxide radical generation in peroxisomal membranes: evidence for the participation of the 18-kD integral membrane polypeptide. *Free Radical Research*, 26:497–506.
- Lotan T., M. Ohto, K. Yee, M. West, R. Lo, R. Kwong, K. Tamagishi, R. Fisher, R. Goldberg, J. Harada. (1998). Arabidopsis LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell*, 93:1195-1205.
- Luster D.G. y R. Donaldson (1987) Orientation of electron transport activities in the membrane of intact glyoxysomes isolated from castor bean endosperm. *Plant Physiology*, 85:796–800.
- Ma Q. H., y Y. Xu (2008) Characterization of a caffeic acid 3-O-methyltransferase from wheat and its function in lignin biosynthesis. *Biochimie* 90(3): 515-524.
- Maeshima M. y H. Beevers (1985) Purification and properties of glyoxysomal lipase from castor bean. *Plant Physiology*, 79:489–493.

- 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.
- Mullen R.T. y R. Trelease (1996) Biogenesis and membrane properties of peroxisomes: does the boundary membrane serve and protect? *Trends Plant Science*, 1: 389–394.
- Murashige T. y F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant*, 1962, 15: 473-497.
- Muschietti J.Y. Eyal y S. McCormick (1998) Pollen tube localization implies a role in pollen-pistil interactions for the tomato receptor-like protein kinases LePRK1 and LePRK2. *Plant Cell*, 10: 319–330.
- Nishimura, C., Y. Ohashi, S. Sato, T. Kato, S. Tabata, y C. Ueguchi (2004) Histidine kinase homologs that act as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16: 1365–1377.
- Novak F., R. Afza, M. Van Duren, M. Perea, B. Conger y X. Tang (1989) Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB) bananas (*Musa* spp.). *BioTechnology*, 7:154-159.
- Parkinson, J.S. (1993) Signal transduction schemes of bacteria. *Cell*, 73: 857-871.
- Polesani M., F. Desario, A. Ferrarini, A. Zamboni, M. Pezzotti, A. Kortekamp y A. Polverari (2008) cDNA-AFLP analysis of plant and pathogen genes expressed in grapevine infected with *Plasmopara viticola*. *BMC Genomics*, 9:142.
- Sachs, A.B., P. Sarnow, y M. Hentze (1997) Starting at the beginning, middle, and end: translation initiation in eukaryotes. *Cell*, 89: 831–838.
- Sandalio L.M. y L.A. del Río (1988) Intraorganellar distribution of superoxide dismutase in plant peroxisomes (glyoxysomes and leaf peroxisomes). *Plant Physiology*, 88:1215–1218.
- Schmidt E., A. De Jong y S. De Vries (1994) Signal molecules involved in plant

embryogenesis. *Plant molecular Biology*, 26:1305-13013.

Schmidt E., F. Guzzo, M. Toonen y S. de Vries (1997) A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development*, 124: 2049–2062.

Schmitz A. y D. Riesner (2006) Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. *Analytical Biochemistry*, 354:311-313.

Sharp W.R., M.R. Sondhal, L.S. Caldas, y S.B. Maraffa (1980) The physiology of in vitro asexual embryogenesis, *Horticulture, Rev*, 2 :47–54.

Simonds N.W. y K. Shepherd (1995) The taxonomy and origins of the cultivated bananas. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 55:302-312.

Somleva M., E. Schmidt y S. de Vries (2000) Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by SERK expression. *Plant Cell Reports* 19: 718–726.

Sterk P., H. Booij, G. Schellekens, A. Van Kammen y S. de Vries (1991) Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. *Plant Cell*, 3:907-921.

Song W. Y., G. Wang, L. Chen, H. Kim, L. Pi, T. Holsten, J. Gardner, B. Wang, W. Zhai y L. Zhu (1995). A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21. *Science*, 270: 1084–1086.

Stone S., L. Kwong, K. Yee, J. Pelletier, L. Lepiniec, R. Fischer, R. Goldberg, J. Harada (2001) LEAFY COTYLEDON2 encodes B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 98, 11806–11811.

Struglics A., K. Fredlund, A. Rasmusson y I. Moller (1993) The presence of a short redox chain in the membranes of intact potato tuber peroxisomes and the association of malate dehydrogenase with the peroxisome membrane. *Physiology Plant*, 88:19–28.

- Swanson R.V., L.A. Alex y M.I. Simon (1994) Histidine and aspartate phosphorylation: two-component systems and the limits of homology. *Trends in Biochemical Sciences*, 19:485–490.
- Torii K. U., N. Mitsukawa, T. Oosumi, Y. Matsuura, R. Yokoyama, R. Whittier y Y. Komeda (1996) The Arabidopsis ERECTA gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular leucine-rich repeats. *Plant Cell*, 8: 735–746.
- Ueguchi, C., S. Sato, T. Kato y T. Tabata, T. (2001). The AHK4 gene involved in the cytokinin-signaling pathway as a direct receptor molecule in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology*, 42: 751–755.
- Van der Knaap E., M. Sauter, R. Wilford y H. Kende (1996) Identification of a gibberellin-induced receptor-like kinase in deepwater rice (accession no. Y07748). *Plant Physiology*, 112: 1397–1397.
- Vos P., R. Hogers, M. Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee y T. Hornes (1995). AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407–4414.
- Walker J.C. (1994) Structure and function of the receptor-like protein kinases of higher plants. *Plant Molecular Biology*, 26(5):1599-609.
- Wang X., Y. Tian y Y. Li (2008) Development of an Efficient Protocol of RNA Isolation from Recalcitrant Tree Tissues. *Molecular Biotechnology*, 38: 57–64.
- Wilde H., W. Nelson, H. Booij, S. de Vries y T. Thomas (1988) Gene expression programs in embryonic and non-embryonic carrot cultures. *Planta*, 176: 205–211.
- Wurtele, E.S., H. Wang, S. Durgerian, B. Nikolau, y T. Ulrich (1993) Characterization of a gene that is expressed early in somatic embryogenesis of *Daucus carota*. *Plant Physiology*, 102: 303–312.
- Xia, H., Y. Xiao, T. Jie, K. Jie, M. Xue, X. Wang, P. Ya, F. Yun y L. Xue (2010) MaSERK1 Gene Expression Associated with Somatic Embryogenic Competence and Disease Resistance Response in Banana (*Musa* spp.). *Plant Molecular Biology Reporter*, 28 (2): 309-316.

Youssef M., James A.C., Rivera-Madrid R., Ortiz R., Escobedo G-M R.M. (2010). Musa genetic diversity revealed by SRAP and AFLP. Molecular biotechnology. DOI 10.1007/s12033-010-9328-8.

Zimmerman J.L. (1993) Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants, Plant Cell 5:1141–1423.

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

4.1. CONCLUSIONES

- Se requiere de auxina, particularmente pulsos de 2, 4-D ($4.52 \mu\text{M}$) para mantener el potencial embriogénico del callo y suspensiones embriogénicas formadas a partir de embriones cigótico inmaduros.
- Se determinó que una concentración de 87.64 mM de sacarosa y papel filtro como barrera entre los embriones somáticos y el medio es suficiente para incrementar la germinación en un 90%.
- Se observó una mayor expresión de genes en embriogénesis somática que en cigótica. En total se obtuvieron 253 TDFs, de los cuales 21 mostraron ser expresados diferencialmente.
- El 33% de los TDFs analizados mostró homología con proteínas desconocidas o no caracterizadas, principalmente de *Musa acuminata*, *Musa balbisiana*, *Oryza sativa* y *Pinus radiata*.
- El 67% de los TDFs mostró homología con proteínas caracterizadas, de las cuales el 17% corresponden a estadios tempranos de desarrollo.

4.2. PERSPECTIVAS

- Obtener la secuencia completa de algunos de los transcritos expresados tanto en embriogénesis cigótica como somática de *M.a.m.*
- Caracterizar algunas de las proteínas encontradas en este trabajo y establecer tanto su función en embriogénesis como su relación con otras proteínas.
- Por los resultados obtenidos se considera que el cDNA-AFLP es una técnica apropiada para analizar los perfiles de transcritos siendo recomendable incrementar el

número de pares de cebadores.

ANEXOS

PROTOCOLO PARA LA OBTENCIÓN DE CALLO EMBRIOGÉNICO A PARTIR DE EMBRIONES CIGÓTICOS EN ESPECIES DIPLOIDES DE MUSA

1. El material vegetal consiste de embriones cigóticos inmaduros obtenidos a partir de semillas del diploide *M. a. m.* (AA) de la colección del INIFAP, Uxmal. Se utilizaron embriones cigóticos inmaduros para inducir la formación de callos embriogénicos, ya que en trabajos anteriores se había reportado que los embriones en estado inmaduro (45-60 d) muestran una mayor capacidad para la formación de callo por lo que fueron seleccionados (Escobedo, 1996).
2. Los frutos inmaduros fueron lavados con jabón y agua corriente. Posteriormente en condiciones estériles se realizó:
 - Un lavado con extrán 5% durante 5 minutos y un enjuague con agua destilada estéril.
 - Un lavado con etanol al 80% durante 5 min y dos enjuagues con agua destilada estéril.
 - Un lavado con cloro durante 15 minutos y 3 enjuagues con agua destilada estéril.
 - Se flamearon después de sumergirlos en etanol absoluto para obtener una máxima desinfección.
3. Los embriones fueron extraídos con bisturí y aguja de disección con ayuda de microscopio estereoscópico, en algunos casos por el tamaño del embrión inmaduro se aislaron con parte del tegumento interno. Se llevó a cabo la inducción de la embriogénesis somática en un periodo no mayor de 5 días.
4. Las semillas fueron extraídas de los frutos bajo condiciones de esterilidad.
5. Los embriones cigóticos fueron extraídos de la región micropilar de la semilla y

colocados en un medio de inducción de embriogénesis somática; la composición del medio, las condiciones de cultivo y la duración de cada etapa se indican en el Cuadro 1.

6. Para la inducción de la embriogénesis, los embriones fueron sembrados en medio semisólido preparado en frascos gerber en donde se colocaron 5 embriones cigóticos por recipiente; siendo un total de 10 frascos por replica y realizándose 3 réplicas por experimento.

7. Para la proliferación del callo, se transfirieron a frascos gerber colocando 5 callos por frasco. Los componentes del medio y las condiciones de cultivo se mencionan en el cuadro 1.

Cuadro 1. Componentes del medio de cultivo utilizados durante la inducción y proliferación del callo embriogénico de *M.a.m.*

Componentes del medio de cultivo	Inducción del callo	Proliferación del callo
Macroelementos	½ MS ^a	MS ^a
Microelementos	MS	MS
KH ₂ PO ₄ (mg l ⁻¹)	200	200
Sacarosa (gl ⁻¹)	60	30
Vitaminas	Morel ^b	Morel ^b
2,4-D (mM)	4.5	4.5
Zeatina (mM)	1	0
Gel Rite (gl ⁻¹)	2	2
pH	5.7	5.7
Fotoperiodo	oscuridad	Oscuridad
Tiempo (semanas)	8-12	3-4

Cuadro 2. Formulación de sales de Murashige y Skoog (1962)

Macroelementos	Concentración
NH_4NO_3	1650 (mg l^{-1})
KNO_3	1900
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
KH_2PO_4	170
Na_2EDTA	37.3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8
Microelementos	Concentración
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3 (mg l^{-1})
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
H_3BO_3	6.2
KI	0.83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025

Cuadro 3. Formulación de las vitaminas de Murashige y Skoog (1962)

Vitaminas	Concentración
Tiamina. HCl	10.00 (mg l ⁻¹)
Ácido Nicotínico	0.50
Piridoxina. HCl	0.50
Mio-inositol	100.0
Glicina	2.0

Cuadro 4. Formulación de las vitaminas de Morel (1950)

Vitaminas	Concentración
Pantotenato de calcio	1.00 (mg l ⁻¹)
Mio-inositol	100.00
Ácido nicotínico	1.00
Piridoxina. HCl	1.00
Tiamina. HCl	1.00
Biotina	0.01

PROTOCOLO PARA PREPARAR MUESTRAS PARA OBSERVACIÓN POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)

- 1.- Fijar las muestras en FAA por 72hrs (cambiar cada 24 hrs.).
- 2.- Desechar el FAA y adicionar etanol al 30%; dejar por 1 hr a 4° C.
- 3.-Desechar etanol al 30% y adicionar etanol al 50; dejar por 1 hr a 4° C.
- 4.-Desechar etanol al 50% y adicionar etanol 70; dejar por 1 hr a 4° C.
- 5.-Desechar etanol al 70% y adicionar etanol al 90%; dejar por 1 hr a 4° C.
- 6.-Desechar etanol al 90% y adicionar etanol al 100% (2 veces por 1 hr. cada vez).
- 7.- SECADO A PUNTO CRÍTICO: Sustitución del etanol por dióxido de carbono.
- 8.- RECUBRIMIENTO: película conductora (oro).
- 10.- Observación en MEB.

PROTOCOLO PARA PREPARAR MUESTRAS EN RESINA Y REALIZAR CORTES HISTOLÓGICOS

PREPARACION DE FAA.

Etanol 500 ml

Ácido Acético glacial 50 ml

Formaldehido 100 ml

H₂O 350 ml

FIJACION (poner las muestras en la burbuja, aplicar vacío por 15 minutos aprox. y dejar en frío).

DESHIDRATACION (en todos los pasos aplicar vacío a las muestras y dejar en frío)

- 1.- Fijar las muestras en FAA por 72hrs (cambiar cada 24 hrs.).
 - 2.- Desechar el FAA y adicionar etanol al 30% (2 veces por 2 hrs. cada vez).
 - 3.-Desechar etanol al 30% y adicionar etanol al 50% (2 veces por 2 hrs. cada vez).
 - 4.-Desechar etanol al 50% y adicionar etanol 70 (2 veces, 1 hora la primera y 24 hrs la segunda)
 - 5.-Desechar etanol al 70% y adicionar etanol al 85% (2 veces por 2 hrs. cada vez).
 - 6.-Desechar etanol al 85% y adicionar etanol al 96% (2 veces por 2 hrs. cada vez).
 - 7.-Desechar etanol al 96% y adicionar etanol al 100% (2 veces por 2 hrs. cada vez).
 - 8.- Preparar una mezcla de solución A + catalizador (por cada 100 ml de solución A adicionar 0.9 g de catalizador y mezclar perfectamente en oscuridad).
- Adicionar a las muestras hasta cubrir una solución 2:1 de la mezcla (etanol absoluto y solución A + catalizador). Aplicar vacío y dejar por 48 hrs. en frío.
- 9.- Mezclar perfectamente en oscuridad, 100 ml de solución A + 0.9 g del catalizador.
- Desechar la solución 2:1 y adicionar una solución 1:1(etanol absoluto y solución A+catalizador). Aplicar vacío y dejar por 5 días en frío.
- 10.- Desechar la solución 1:1 (etanol absoluto y solución A+catalizador) y mezclar perfectamente en oscuridad, 100 ml de solución A + 0.9 g del catalizador y adicionar a las muestras, aplicar vacío y dejar por 72 hrs. en frío.
 - 11.- Mezclar muy bien en oscuridad 100 ml de solución A + 1.25 g del catalizador. A 25 ml de la mezcla anterior adicionar 1.25 ml de la solución B (por la antigüedad del reactivo, se adicionó 0.25 ml más de la solución B, ya que en el manual se recomienda 1 ml); mezclar muy bien en oscuridad y adicionar a los moldes.

Nota.- Primero adicionar un poco de la mezcla en el molde y colocar la muestra cuidando quede en el fondo en el centro. Cuando la resina forme un hilo de 2 a 3 cm al meter y

sacar la espátula colocar con mucho cuidado el holder y terminar de rellenar el molde.

Dejar por 24 hrs. en el laboratorio con el aire acondicionado para que la resina endurezca, pasado este tiempo colocar las muestras en la burbuja con sílica y al vacío por X días para que adquieran la consistencia adecuada para el corte.

PROTOCOLO PARA INCLUSIÓN DE MUESTRAS EN PARAFINA PARA REALIZAR CORTES HISTOLÓGICOS

- **FIJACION:** colocar las muestras en la burbuja, aplicar vacío por 15-30 min y dejar en frío.

- **DESHIDRATACION:** en todos los pasos aplicar vacío a las muestras por 15-30 min y dejar en frío.

- 1.- Fijar las muestras en FAA por 72hrs (cambiar cada 24 hrs.).

- 2.- Desechar el FAA y adicionar etanol al 30% (2 veces por 2 hrs. cada vez).

- 3.-Desechar etanol al 30% y adicionar etanol al 50% (2 veces por 2 hrs. cada vez).

- 4.-Desechar etanol al 50% y adicionar etanol 70% (2 veces, 1 hora la primera y 24 hrs la segunda).

- 5.-Desechar etanol al 70% y adicionar etanol al 85% (2 veces por 2 hrs. cada vez).

- 6.-Desechar etanol al 85% y adicionar etanol al 96% (2 veces por 30 min. cada vez).

- 7.-Desechar etanol al 96% y adicionar butanol 100% I por 24 hrs a temperatura ambiente.

- 8.- Desechar butanol 100% y adicionar butanol 100% II por 24 hrs a temperatura ambiente.

- 9.- Desechar butanol 100% y adicionar butanol + 15 hojuelas de parafina y colocar en agitación toda la noche a temperatura ambiente (40-50°C). Colocar diversos frascos con hojuelas de parafina en estufa a 60°C para contar con parafina líquida pura para los cambios posteriores.

10.- Al día siguiente poner en estufa a 60°C (no exceder ni disminuir la temperatura), ya derretida la parafina agregar más hojuelas cada 2-3 hrs (2-3 veces en todo el día). NOTA: poner un mantel de papel aluminio en la parte inferior del horno o estufa para posibles derrames de parafina.

11.- Al día siguiente primer cambio de parafina líquida (todo en estufa a 60°C), tirar la mitad del volumen y agregar parafina líquida pura previamente colocada en la estufa a 60°C 2 días antes (2 cambios por día). NOTA: todos los cambios son en la estufa a 60 °C lo más rápido posible para evitar que la temperatura disminuya.

12.- Al día siguiente continuar con los cambios de parafina de la misma manera que el día anterior, tirar la mitad del volumen y agregar parafina líquida (2 cambios por día).

13.- Al día siguiente últimos cambios de parafina líquida, tirar la mitad del volumen y agregar parafina líquida (2 cambios por día). NOTA: En total se deben hacer de 4-6 cambios de parafina líquida por no más de 4 días.

14.- Colocar los moldes de aluminio en la estufa a 60°C 1 hr antes de empezar la inclusión final de la muestra. Tomar la muestra con pinzas, colocar en el centro del molde y cubrir con parafina líquida pura, cerrar la puerta de la estufa para mantener la temperatura constante; posteriormente agregar más parafina al molde y colocar la tapa para adherir el diamante de parafina con la muestra incluida.

15.- Sacar los moldes de la estufa y enfriar a temperatura ambiente, posteriormente separar del molde al endurecer la parafina.

16.- Realizar cortes en micrótopo.

DOBLE TINCIÓN DE LOS CORTES HISTOLÓGICOS

APS+ Naphtol blue black

Acido periódico-Schiff (APS) + Azul-Negro de Naftol

APS + Napthol blue black

Cuadro 5. Protocolo para preparación de muestras en parafina y resina para su tinción.

Pasos a seguir	Parafina*	Resina+
1.- Hidrolizar cortes en ácido periódico	5' min	20' min
2.- Lavar en agua corriente con piseta y dejar secar		20-30' min
3.- Tefir (x goteo*) en reactivo de Schiff en oscuridad	<1' min	
4.- Lavar en agua hasta que el agua quede incolora y secar		
5.- Tefir en solución de azul-negro de naftol al 1% en ácido acético al 7% a RT* o calentada previamente a 60° C+.	<1' min	10' min
6.- Lavar rápidamente y abundantemente en agua y secar		
7.- **Opcional: regresar al ácido acético al 7% para examinar la tinción al microscopio		
8.- Deshidratar en serie etanol 50% y 100% y secar*		
9.- Secar y montar en Permount		

Resultados de la Tinción:

- Las paredes celulares y sus componentes tiñen + a APS, particularmente las reservas de almidón tiñen de color rojo.
- El nucléolo y núcleo tiñen de color azul verdoso.
- Reservas proteínicas tiñen de color azul oscuro.

Preparación de colorantes**1) Reactivo de Schiff**

Pararosalinine chloride (fucsina básica) 1.0 g

Metabisulfito de sodio 3.0 g

ANEXOS

Carbón activado	0.5 g
HCl 1N	30 ml
H ₂ O destilada	cbp 200.0 ml

- 2) **Ácido periódico** (Sigma 7875), para hidrólisis 15' a 20' temperatura ambiente*.

Ácido periódico	1.0 g
H ₂ O	cbp 100.0 ml

- 3) **Naphtol blue black** (Sigma N3005), se usa para contrastar la tinción PAS

Ácido acético al 7%	100.0 ml
Naphtol blue black	1.0 g

METODOLOGÍA PARA LA EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL

Se estandarizó un protocolo de extracción de RNA, cuyos componentes se mencionan a continuación:

Amortiguador de extracción: Fenol en amortiguador saturado al 38%, tiocianato de guanidina 0.8M, tiocianato de amonio 0.4M, acetato de sodio 0.1M pH 5.0, glicerol al 50%.

Mezcla Fenol/Cloroformo/Alcohol isoamílico en una proporción 25/24/1 v/v. Lavados con cloroformo frío, isopropanol, acetato de sodio 3M pH 5.2 a 60° C y etanol al 70%, todos los reactivos preparados con agua tratada con DEPC.

El protocolo de extracción de RNA consiste en los siguientes pasos:

1. Retirar el RNA later a los embriones tanto cigóticos como somáticos almacenados en tubos de 1.5 ml a -20°C con micropipeta. Debido a que los embriones maduros tienen gran cantidad de almidón lavar con agua libre de DNasas y RNasas, cambiar 3-4 veces o

las que sean necesarias para remover y eliminar la mayor cantidad de almidón (polisacáridos) acumulado en el tubo.

2. Dentro del mismo tubo agregar el amortiguador de lisis (Trizol), en una proporción de 150 μ l por cada 5 mg de tejido (fenol en amortiguador saturado al 38%, tiocianato de guanidina 0.8M, tiocianato de amonio 0.4 M, acetato de sodio 0.1M pH 5.0, glicerol al 50%). Homogenizar a temperatura ambiente con pistilo de polipropileno y homogenizador portátil manual. Centrifugar 20 min a 12 000 x g a 4°C.

3. Separar el sobrenadante en un tubo limpio, mezclar e incubar a temperatura ambiente con un volumen de la mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico en proporción 25/24/1, v/v (50 μ l de fenol y 50 μ l de la mezcla cloroformo/alcohol isoamílico) por 5 min. Centrifugar 20 min a 12 000 x g a 4°C. Extraer la fase acuosa y transferir a un tubo limpio.

4. Adicionar un volumen de cloroformo, agitar vigorosamente e incubar por 2-3 min a temperatura ambiente (15-30 °C). Centrifugar las muestras a 12000 x g por 15 min a 4 °C.

5. Separar el sobrenadante y precipitar con un volumen de isopropanol. Incubar toda la noche a -20°C.

6. Centrifugar 30 min a 6500 g (8270 rpm) a 4°C. Disolver el precipitado con vortex en presencia de 1 volumen de acetato de sodio 3.0 M pH 5.2 a 60°C. Centrifugar inmediatamente a máxima velocidad en una microcentrífuga por 5 min.

7. Decantar el sobrenadante y lavar la pastilla con 1 volumen de acetato de sodio 3M pH 5.2 bajo las mismas condiciones y centrifugar de la misma manera.

8. Lavar la pastilla de ARN con 2 volúmenes de etanol al 70% dos veces y resuspender en 30 μ l de agua tratada con DEPC y almacenar a -80° C hasta su uso.

METODOLOGÍA PARA LA REALIZACIÓN DE cDNA-AFLP

Se realizó la extracción del ARN y se lleva a cabo la electroforesis en gel de agarosa al 1% (2 μ l de ARN, 2 μ l de agua tratada con DEPC y 1 μ l de buffer de carga) durante 50 min

a 80 volts.

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD Y CANTIDAD DE ARN EXTRAÍDO

Se evaluó la calidad del ARN mediante espectrofotometría (A260-A280) mediante la siguiente fórmula:

$\mu\text{g/ml de RNA} = \text{D.O.} \cdot (40 \mu\text{g/ml}) \cdot (\text{F.D.})$

D.O.= densidad óptica (260 nm, de 1.8 a 2.0)

Factor de dilución (250 y 500 μl)

499 μl de agua DEPC + 1 μl de RNA (FD=500 μl) + 1 μl de RNA (FD 250 μl)

Celda de un ml.

TRATAMIENTO CON DNase I (INVITROGEN)

Se requiere una Concentración final de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en un volumen final de 30 μl . Se realiza de la siguiente manera:

10 μl RNA

2.5 μl DNase I

2.5 μl del buffer de la enzima

15 μl de agua DEPC

30 μl

Se deja durante 15 min a temperatura ambiente. Se adiciona 3 μl de EDTA (25 mM), se incuba a 65°C durante 10 min. Posteriormente se cuantifica en el espectrofotómetro nuevamente y se hacen los cálculos de la misma manera que al cuantificar el RNA.

SÍNTESIS DE LA 1ª. CADENA DEL cDNA CON SUPERScript II REVERSE TRANSCRIPTASE (INVITROGEN)

Se requieren 5 µg en un volumen de 20 µl. Los componentes y las concentraciones se mencionan a continuación:

1 µl de Random Primers

1 µl de DNTPs

16 µl de RNA

2 µl de agua DEPC

20 µl

Se mezcla y se deja a 65°C por 5 min en hielo.

Posteriormente adicionar:

2 µl de DTT (0.1 M)

4 µl de 5X first strand buffer

1 µl de RNase Out

7 µl

Mezclar lento y dejar durante 2 min a temperatura ambiente (~25° C).

Adicionar 1µl de Superscript II, mezclar lento, dejar durante 10 min a temperatura ambiente, transferir a 42°C durante 50 min, posteriormente a 70°C durante 15 min para inactivar la enzima.

Se cuantificó el cDNA en el nanodrop utilizando 1 µl, se obtuvo de rendimiento de 300 a 600 ng/ µl.

AMPLIFICACIÓN DE GENES CONSTITUTIVOS

Para la amplificación de genes constitutivos se utilizó un fragmento del gen 18S, actina y 5S con cebadores a 20 pmolar. Las condiciones de amplificación se mencionaron en materiales y métodos del capítulo 4 y fueron las siguientes: desnaturalización previa a 94° C por 30 s, 20 ciclos de: desnaturalización a 94° C por 30 s, alineación a 60° C por 20 s y extensión a 72° C por 30 s, con una extensión final de 72° C por 7 min.

REALIZACIÓN DEL AFLP (Vos *et al.*, 1995)

Se requiere para la técnica de AFLP 50 ng/ μ l en un volumen final de 100 μ l. a continuación se muestra un ejemplo de cómo se realizaron las diluciones del cDNA:

Si tenía 815.9 ng-----1 μ l

Requiero 50 ng-----X ($X=0.06 \times 100 \mu\text{l} = 6.13 \mu\text{l}$)

Δ 6.13 μ l de cDNA + 93.87 μ l de agua

DIGESTIÓN

Como se necesitan 300 ng/ μ l para digerir se utilizan:

50 ng/ μ l $\times$ 6 μ l = 300 ng

Adicionar:

2 μ l de Buffer de MseI (10X)

0.2 μ l enzima MseI (50 u/ μ l)

11.8 μ l de agua

14 μ l + 6 μ l de cDNA = 20 μ l de volumen final.

Se deja a 37°C durante 3 horas. Posteriormente agregar:

0.2 μ l de enzima EcoRI

0.41 μ l de NaCl

Se deja a 37°C durante 3 horas. Inactivar a 70°C durante 15 min.

LIGACIÓN DE ADAPTADORES

20 μ l de cDNA digerido

6 μ l de buffer de ligasa

1 μ l de adaptador MseI

1 μ l de adaptador EcoRI

1 μ l de enzima ligasa

29 μ l, poner a 20°C durante 12 hr.

PREAMPLIFICACIÓN

Realizar una dilución 1:10 en un volumen de 50 μ l (5 μ l de cDNA ligado + 45 μ l de agua= 50 μ l). Utilizar 5 μ l para la reacción. La preamplificación fue llevada a cabo con cebadores para AFLP que tenían una base selectiva. La reacción de preamplificación consistió en un volumen de 25 μ l con 2.5 μ l de buffer de PCR 10X, 0.75 μ l de 50 mM de cloruro de magnesio, 0.75 μ l de 30 μ M de cada cebador, 2.5 μ l de 2 mM de dNTPs, 5 μ l del cDNA ligado y diluido (1:10) y 0.125 μ l de 5U de Taq-DNA polimerasa (Invitrogen). El PCR se realizó por 20 ciclos de 92°C por 1 min, 56 °C por 30 s y 72 °C por 1 min.

AMPLIFICACIÓN SELECTIVA ó ESPECÍFICA

Nuevamente para la amplificación selectiva ó específica realizar una dilución 1:10 en un volumen de 50 μ l (5 μ l de cDNA preamplificado + 45 μ l de agua= 50 μ l). Se utilizaron cebadores para AFLP con tres nucleótidos selectivos que resultaron ser mas polimórficos para las especies diploides de Musa (Youssef et al., 2010). Cada 20 μ l de amplificación selectiva consistió de: 2 μ l de buffer de PCR 10X, 0.6 μ l de 50 mM de cloruro de magnesio, 0.2 μ l de 20 μ M del primer para Eco RI, 0.3 μ l de 20 μ M del primer para Mse I,

2 μ l de 2 mM de dNTPs, 5 μ l de la reacción de preamplificación diluida (1:10) y 0.25 μ l de 5U de Taq-DNA polimerasa (Invitrogen). El PCR consistió de 11 ciclos de 94°C por 30 s, 65 °C por 30 s (-0.7 °C por ciclo) y 72 °C por 1 min; así como 24 ciclos adicionales de 94°C por 30 s, 65 °C por 30 s y 72 °C por 1 min.

Los productos de PCR fueron diluidos con igual cantidad de buffer de carga (98% de formamida, 10 mM de EDTA, azul de bromofenol y xylene cyanol), se colocaron durante 5 min a 90° C y posteriormente en hielo. Se realizó un gel de poliacrilamida al 6% teñido con plata. Una vez realizada la lectura de las bandas, el gel fue escaneado para realizar el conteo manual de las mismas.

PROTOCOLO PARA LA PREPARACIÓN DE GEL DE POLIACRILAMIDA DESNATURALIZANTE

Para el montaje de los placas de vidrio, primeramente los vidrios se lavaron con jabón y luego con una solución al 70% (v/v) de etanol, y se secó con papel absorbente. Se agregó 2 ml de Repel (comercial), se esparció sobre la placa de vidrio grande, 2 a 3 veces, con el fin de evitar que el gel se adhiriera a la placa grande; se adicionó 1ml de solución con binding silane (100 μ l binding silane, 24.25 ml etanol al 96% y 750 μ l ácido acético) a la placa más corta, se esparció totalmente sobre ella y se dejó secar por 10-15 min. Se colocaron los espaciadores laterales sobre la placa grande, se colocó la placa más corta sobre la anterior, sin tocarla, se colocó el tercer espaciador en la base y se sujetaron con broches (clips). Se preparó una solución de poliacrilamida al 12%, (14 ml Acrilamida-Bisacrilamida (Stock 29-1, 30%), 31.50 g Urea (8M), 7 ml TBE 10X, aforar a 40 ml con H₂O destilada, se adicionó 245 μ l de APS al 25% (v/v) y 40 μ l de TEMED) posteriormente se vertió entre ambas placas de vidrio. El peine se puso en la parte superior del gel con su parte plana hacia la solución de acrilamida, y se dejó polimerizar por 2h. Se quitó los broches, peines y el espaciador inferior; con el fin de eliminar el exceso de urea, se lavó la placa de vidrio con detergente líquido y agua, y se secó con papel absorbente. Las placas con el gel se colocaron en la unidad del equipo de electroforesis (S3S Owl Thermo Scientific). Una vez que se sujetaron las placas se vertió el amortiguador TBE 1X en el reservorio superior y en la charola inferior. Se conectó la fuente de poder, y se establecieron las condiciones constantes de pre-corrida, fuerza W= 50 watts, 1700 voltios y 35 miliamperios, hasta que la temperatura del gel alcance ~ 45°C.

Se insertó el peine hasta que los dientes tocaron el gel (1mm dentro), y se cargo aprox. 10 μ l de las muestras del amplificado, desnaturalizadas previamente (90° C durante 5 minutos, después se adicionó 20 μ L del amplificado más 5 μ L de amortiguador de carga con formamida y se almacenó a 4° C durante 2 hrs).

PROTOCOLO PARA LA TINCIÓN CON NITRATO DE PLATA

Una vez que terminó la corrida, justo cuando el frente del colorante salió del gel, se apagó la fuente de poder, se desmontó el gel del equipo de electroforesis, se retiró el peine y los espaciadores, y se separó cuidadosamente la placa grande de vidrio del gel. La placa corta de vidrio, con el gel, se puso en una charola y se fijó con una solución, de ácido acético al 10% v/v, hasta la remoción total del Repel, el gel se lavó tres veces durante cinco minutos con agua destilada. Se agregó la solución de tinción de nitrato de plata (1g/l nitrato de plata con 1.5 ml de formaldehído al 37%, el cual se agregó justo antes de iniciar la tinción) y se puso a agitar durante 35 min. Se retiró la solución de tinción y se lavó brevemente con agua destilada por 5-10 segundos. Se decantó el agua y se reemplazó por una solución reveladora fría de carbonato de sodio (30g/l) que contiene 1.5 ml/l de formaldehído al 37% y 8 μ l/l de solución de 0.2 g/ml de tiosulfato de sodio preparada en fresco el mismo día. El revelado se realizó de la siguiente manera: se agregó la mitad (~750 mL) de la solución reveladora fría al gel y se agitó fuertemente hasta que las primeras bandas se hicieron visibles en el gel (aprox. 5), posteriormente, se reemplazó esta solución por la otra mitad (~750 mL) hasta que todas las bandas fueron visibles (aprox. 10 min). Se reemplazó la solución por solución fijadora (de ácido acético) y se dejó en agitación por 3 min. Se enjuagó el gel con agua destilada por 5 min y dejó secar aprox. 6hrs para su evaluación.

A continuación se anexa un Cuadro en donde se mencionan las combinaciones de cebadores utilizadas y los TDFs diferenciales detectados en cada estadio de desarrollo. Los estadios corresponden a lo siguiente: 1: Embrión cigótico inmaduro, 2: Embrión somático inmaduro, 3: Suspensión celular embriogénica, 4: Embrión cigótico maduro, 5: Embrión somático maduro, 6: Embrión somático germinado.

Cuadro 6. Número de bandas diferenciales obtenidas mediante distintas combinaciones de cebadores.

ESTADIOS DE DESARROLLO	Combinación de cebadores				
	E4-M1	E1- M3	E4c-M10	E7c-M10	E15c-M10
1	0	0	0	1	0
2	3	5	1	1	0
3	1	1	2	2	2
4	2	0	0	0	0
5	1	1	3	0	1
6	0	1	0	0	0

PROTOCOLO DE PURIFICACIÓN DE ADN DE GELES DE AGAROSA CON EL KIT QUIAGEX DE PROMEGA

1. Cortar el fragmento amplificado colocándolo en tubos eppendorf de 1.5 ml.
2. Adicionar 300 µl de buffer Qx1 y 20 µl de sílica
3. Incubar a 50°C por 10 minutos (*Si la muestra se pone de color púrpura, se le adiciona 10 µl de NaOAc pH5 3M)
4. Centrifugar 1 minuto a 10000 prm
5. Decantar el sobrenadante y resuspender la pastilla con 500 µl de buffer Qx1
6. Centrifugar 1 minuto a 10000 rpm
7. Decantar el sobrenadante y resuspender la pastilla con 500 µl de buffer PE
8. Centrifugar 1 minuto a 10000 rpm
9. Decantar el sobrenadante y lavar la pastilla con 500 µl de buffer PE si resuspender la pastilla
10. Centrifugar 1 minuto a 10000 rpm
11. Decantar el sobrenadante y dejar secar la pastilla

12. Eluir la pastilla con 10 μ l de agua ultrapura estéril
13. Centrifugar 2 minutos
14. Tomar el sobrenadante cuidando no tomar parte de la pastilla que se centrifugó y pasar a un tubo nuevo
15. Realizar proceso de ligación al vector

PROTOCOLO DE TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS E. coli DE LA CEPA DH5 α

1. Mezclar en picofuga, la reacción de ligación del vector pGem-Teasy con el fragmento de ADN que se desee ligar
2. Agregar todo el contenido de la reacción de ligación a los tubos que contienen las cepas bacterianas de E. coli de la cepa DH5 α sin sacar estos tubos del hielo
3. Mezclar la reacción dando pequeños golpes, cuidando el tiempo en que los tubos están fuera del hielo
4. Dejar incubando los tubos en hielo por 20 minutos
5. Llevar a cabo el proceso de heatshock: incubar 45 segundos las cepas a 42°C e inmediatamente incubar en hielo por 2 minutos.
6. En campana de flujo laminar previamente limpiada y utilizando material estéril: Añadir 900 μ l de medio SOC
7. Dejar incubando en agitación a 37°C en un orbitador a 170 rpm por 2 h
8. Centrifugar a 5000 rpm las muestras y decantar sobrenadante, cuidando la pastilla formada con poco volumen de medio.
9. En campana de flujo laminar: Plaquear 20 μ l de X-gal (Concentración: 50 μ g/ml) y dejar secar. Resuspender (con ayuda de puntas estériles y micropipeta) la pastilla formada de la centrifugación con el medio que le quedó y plaquear 100 μ l en cajas petri con medio de cultivo LB (20 ml) adicionado con 20 μ l de ampicilina (Concentración:

50µg/ml) como antibiótico de selección

10. Dejar en la estufa de incubación a 37°C por 14 a 16 hrs.

SELECCIÓN DE COLONIAS DE BACTERIAS TRANSFORMADAS

1. Seleccionar colonias de bacterias que presenten el color blanco para llevar a cabo el crecimiento de estas en medio LB líquido
2. Llenar con 4 ml de medio LB adicionado con 4µl de ampicilina (50 µg/ml) como antibiótico de selección los tubos de cultivo estériles
3. Picar la colonia de bacteria seleccionada con un palillo de dientes o con puntas de micropipeta estériles y, agregar este inmediatamente al tubo de cultivo
4. Dejar en crecimiento los tubos de cultivo en agitación a 150 prm por no más de 16 hrs

EXTRACCIÓN DEL ADN PLASMÍDICO (MINIPREPARACIONES MÉTODO SÍLICA)

1. Colectar 2.5 ml de cultivo de bacterias crecidas 16 hrs previas a este proceso por 1 min a 13 000 rpm a 10° C.
2. Resuspender la pastilla por vortexeo en 200 µl de solución de resuspensión (50 mM de Tris pH 8.0; 10 mM de EDTA: 100 µg mL⁻¹ RNAsa A) y colocar en hielo.
3. Adicionar 200 µl de solución de lisis (200 mM NaOH, 1% SDS), mezclar por inversión lenta (aproximadamente 5 veces), poner en hielo.
4. Adicionar 200 µl de solución de neutralización (3M de acetato de potasio pH 5.5 con ácido acético) y mezclar nuevamente por inversión lenta. Centrifugar a 13 000 rpm por 10 min a 10° C.
5. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo y agregar 200 µl de solución de sílica y mezclar por inversión. Centrifugar a 13 000 rpm por 5 min a 10° C. Desechar el

sobrenadante.

6. Adicionar 0.5 ml de solución de lavado (50 mM de NaCl, 10 mM Tris, pH 7.5, 2.5 mM de EDTA, 50% de etanol). Resuspender en vortex y centrifugar a 13 000 rpm por 2 min a 10° C.
7. Lavar la pastilla 2 veces con 0.5 ml de etanol al 70% a 13 000 rpm durante 2 min a 10° C. Dejar secar la pastilla a temperatura ambiente.
8. Resuspender la pastilla en 45 µl de agua ultrapura, centrifugar por 2 min a 13000 rpm a 10 C. Tomar 40 µl y pasar a un tubo nuevo.
9. Realizar la digestión con Eco-RI.

AMPLIFICACIÓN DE BANDAS A PARTIR DEL GEL DE POLIACRILAMIDA

1. Se remarca el contorno de la banda con ayuda de un bisturí sobre el vidrio, se colocan 5 µl de buffer de PCR al 2X tratando de cubrir toda la banda.
2. Se esperan 5 min y con el bisturí se empieza a levantar la banda en todo su contorno, se toma con una pinza y se coloca en un tubo de 600 ml.
3. Se adiciona al tubo 20 µl de buffer de PCR 2X. Se puede realizar la reamplificación de la banda después de 1 hr o se puede almacenar a 4° C hasta su uso.
4. Se toman 5 ml del sobrenadante y se realiza la reamplificación de la manera acostumbrada.
5. Al terminar la reamplificación, tomar 5 ml del producto de PCR y reamplificar nuevamente para obtener una cantidad de producto amplificado.
6. Realizar una electroforesis en gel de agarosa al 1X y cortar las bandas sobre transiluminador.
7. Llevar a cabo la purificación de las bandas siguiendo el protocolo del kit Quiagex (Promega).

