



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**TRANSCRITOS INVOLUCRADOS EN LA
MADURACIÓN DEL EMBRIÓN SOMÁTICO DE *Musa***

Tesis que presenta

Adrián José Enríquez Valencia

En opción al título de

MAESTRO 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



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado **TRANSCRITOS INVOLUCRADOS EN LA MADURACIÓN DEL EMBRIÓN SOMÁTICO DE Musa**, bajo la opción de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Posgrado en Ciencias Biológicas, fue desarrollado 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 la Dra. Rosa María Escobedo Gracia-Medrano.

Atentamente,

Dr. Felipe A. Vázquez Flota

Coordinador de Docencia

Mérida, Yucatán, México, 12 de septiembre de 2013

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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

Firma: _____



Nombre: IBQ Adrián José Enríquez Valencia

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto (CONACyT-CB; No. 000060838) titulado **TRANSCRITOS INVOLUCRADOS EN LA MADURACIÓN DEL EMBRIÓN SOMÁTICO DE *Musa*** bajo la dirección del Dra. Rosa María Escobedo Gracia-Medrano.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al CICY por darme la oportunidad de realizar mi Posgrado, especialmente a la unidad de Bioquímica y Biología Molecular de plantas (UBBMP) por haberme proporcionado las instalaciones para el desarrollo del trabajo de investigación.

Al CONACYT por la beca otorgada No. 314862.

De manera especial agradezco a la Dra. Rosa María Escobedo Gracia-Medrano por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, por formarme como estudiante de posgrado, por todo el apoyo que me dio durante la realización de mi proyecto, por pasar malas noches para revisar mi documento, pero sobretodo por la confianza que ha tenido en mí.

Al comité tutorial conformado por la Dra. Rosa María Escobedo Gracia-Medrano, Dra. Ruby Alejandra Valdez Ojeda, Dra. Julia del Socorro Cano Sosa, Dr. Jorge Humberto Ramírez Prado, por sus observaciones durante mi formación académica.

Al comité evualudor para la obtención del grado precindido por la la Dra. Rosa María Escobedo Gracia-Medrano, Dra. Ruby Alejandra Valdez Ojeda, Dra. Julia del Socorro Cano Sosa, Dr. Jorge Humberto Ramírez Prado y el Dr. Santy Peraza Echeverria.

Al técnico M.C. José Roberto Ku Cauich por toda su ayuda en campo, recolección de las muestras y todo su apoyo técnico en el laboratorio.

A la técnica IQI. Wilma A. Gonzáles Kantun por proporcionar el material *in vitro* para la realizacion de los experimentos.

A mis amigos de laboratorio 22, Sadrac Baeza, Carlos Cruz, Christian Gongora, Emilia Chale, Pablo Lopez y Muhilan Mahendhiran.

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

DEDICATORIAS

A Dios por permitirme este logro, por darme la fuerza para poder realizar mi trabajo y la fortaleza para poder finalizarlo. Por iluminarte en esos momentos oscuros y enseñarme el camino correcto para emprender mi viaje.

A mi madre, por darme amor y enseñarme los valores los cuales me han permitido alcanzar mi meta, no tengo palabras que describan todo el cariño y amor que siento por ella, "GRACIAS MAMÁ".

A mi papá por esforzarse toda su vida para darme lo mejor y nunca abandonarme en los momentos difíciles. Gracias por confiar en mí durante esta etapa de mi vida.

A mi hermana por escucharme, darme consejos y sobre todo por apoyarme cuando más lo necesité, la cual es mi ejemplo a seguir y que siempre creyó en mí hasta el final.

Quiero agradecer también a mi prometida Yamily Yazmín Burgos Canul por darme todo su amor, paciencia, comprensión y por ayudarme cuando más lo necesite, por ser mi ángel y enseñarme lo que significa el amor, TE AMO flaquita.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	3
ANTECEDENTES	3
1. GÉNERO <i>MUSA</i>	3
1.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL GÉNERO <i>MUSA</i>	5
1.2. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE <i>MUSA</i>	5
1.3. PRODUCCIÓN MUNDIAL DE BANANO	6
1.4. ENFERMEDADES DEL BANANO	7
1.5. EMBRIOGÉNESIS EN PLANTAS	8
1.6. EMBRIOGÉNESIS CIGÓTICA	8
1.7. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA	10
1.8. LA MADURACIÓN DEL EMBRIÓN SOMÁTICO	12
1.9. GENES EXPRESADOS DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS DE PLANTAS	14
1.10. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES INVOLUCRADOS EN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA	15
1.11. cDNA-SRAP	16
HIPÓTESIS	18
OBJETIVO GENERAL	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
JUSTIFICACIÓN	19
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	20

BIBLIOGRAFÍA	21
CAPÍTULO II	29
EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE <i>MUSA</i>	29
2.1. INTRODUCCIÓN	29
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	29
2.2.1. COLECTA DEL MATERIAL BIOLÓGICO	29
2.2.2. PROLIFERACIÓN DE CALLO EMBRIOGÉNICO	30
2.2.3. ESTABLECIMIENTO DE SUSPENSIONES CELULARES	30
2.2.4. DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA MADURACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS	31
2.2.5 GERMINACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS	34
2.3. RESULTADOS	35
2.3.1. INDUCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA A PARTIR DE FLORES MASCULINAS INMADURAS	35
2.3.2. PROLIFERACIÓN DE CALLO EMBRIOGÉNICO	40
2.3.3. INDUCCIÓN DE SUSPENSIONES CELULARES	42
2.3.4. EXPERIMENTO DE MADURACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS	44
2.4. DISCUSIÓN	59
BIBLIOGRAFÍA	65
CAPÍTULO III	69
EXTRACCION DE RNA Y cDNA-SRAP	69
3.1. INTRODUCCIÓN	69
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	69

3.2.1. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL (CHOMCZYNSKI Y SACCHI, 1987; ITZA, 2011)	69
3.2.2. ANÁLISIS DEL RNA TOTAL EN GEL DE AGAROSA	70
3.2.3. ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN DEL RNA TOTAL	71
3.2.4. TRATAMIENTO CON DNASA	71
3.2.5. SÍNTESIS DE LA CADENA SENCILLA DE cDNA.....	71
3.2.6. SÍNTESIS DE LA DOBLE CADENA DE cDNA.....	72
3.2.7. PURIFICACIÓN DE LA DOBLE HEBRA DE cDNA	73
3.2.8. cDNA-SRAP	74
3.2.9. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA	75
3.2.10. TINCIÓN CON NITRATO DE PLATA	75
3.2.11. ANÁLISIS DE BANDAS DIFERENCIALES.....	76
3.3. RESULTADOS	77
3.3.1. ANÁLISIS DE RNA TOTAL EXTRAÍDO DE LOS TEJIDOS DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE DOS CULTIVARES DE <i>MUSA</i>	77
3.3.2. CUANTIFICACIÓN DEL RNA TOTAL EXTRAÍDO.....	78
3.3.3. SÍNTESIS DE LA HEBRA SENCILLA DE cDNA.....	79
3.3.4. DESARROLLO DEL cDNA-SRAP PARA EL ANÁLISIS DE FRAGMENTOS DE TRANSCRITOS DE LA MADURACIÓN DEL EMBRIÓN SOMÁTICO EN DOS CULTIVARES DE <i>MUSA</i> SPP	82
3.3.5. ANÁLISIS DE LAS BANDAS DIFERENCIALES	85
3.3.6. DIVERSIDAD DE TRANSCRITOS DIFERENCIALES EN TEJIDOS EMBRIOGÉNICOS Y FLORAL DE <i>MUSA ACUMINATA</i> X <i>M. BALABISIANA</i> AAB CV. MANZANO Y <i>M. A. AA</i> CV. DÁTIL	88
3.4. DISCUSIÓN	95
BIBLIOGRAFÍA	97

CAPÍTULO IV	99
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	99
4.1. CONCLUSIONES.....	99
4.2. PERSPECTIVAS.....	100
ANEXOS	103
ANEXO 1	103

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1. Clasificación de la familia Musácea dividida en secciones (Nwakanma <i>et al.</i> , 2003).	3
Figura 1.2. Distribución geográfica de las secciones de <i>Musa</i> (Guinart <i>et al.</i> , 2002).....	4
Figura 1.3. Morfología de <i>Musa</i> (Arosemena, 2007).	6
Figura 1.4. Embriogénesis cigótica en dicotiledóneas y monocotiledóneas (Hartmann <i>et al.</i> , 2010).....	10
Figura 1.5. Proceso de embriogénesis somática (Zimmerman, 1993).....	12
Figura 1.6. Extrategia experimental.....	20
Figura 2.1. Diagrama de diseño experimental para el desarrollo de la maduración de embriones somáticos de dos genotipos de plátano.....	32
Figura 2.2. Callos obtenidos cuatro meses después de inducir los explantes de flores masculinas inmaduras de Dátil (AA) con el medio MA1.	36
Figura 2.3. Callos obtenidos cuatro meses después de inducir los explantes de flores masculinas inmaduras Enano Gigante Francés (AAA) con el medio MA1.	36
Figura 2.4. Formación de diferentes tipos de callo como respuesta de las flores masculinas inmaduras del cv. Dátil a la inducción en medio con auxinas después de 4 meses.....	37
Figura 2.5. Formación de diferentes tipos de callo como respuesta de las flores masculinas inmaduras del cv. Enano gigante a la inducción en medio con auxinas después de 4 meses.....	38
Figura 2.6. Respuesta de las flores masculinas del cv. Dátil (AA) a la inducción de callo embriogénico en función de la posición de la mano en la inflorescencia.....	39
Figura 2.7. Respuesta de las flores masculinas del cv. E. Gigante (AAA) a la inducción de	

callo embriogénico en función de la posición de la mano de la inflorescencia.	40
Figura 2.8. Callos embriogénicos en proliferación, Dátil (AA).....	41
Figura 2.9. Callos embriogénicos de Enano Gigante Francés (AAA).	41
Figura 2.10. Suspensiones celulares A) Dátil (AA) y Manzano (AAB).	42
Figura 2.11. Suspensiones celulares mostrando embriones globulares y tipo corazón observadas con ayuda del microscopio invertido. A) Dátil, B) Manzano.....	43
Figura 2.12. Desarrollo y maduración de embriones somáticos de <i>Musa acuminata</i> (AA) cv. Dátil sobre medio MM1 y MM2.	44
Figura 2.13. Embriones en proceso de maduración a los 30 días..	45
Figura 2.14. Porcentaje de embriones somáticos inmaduros derivados de suspensiones embriogénicas del cv. Manzano, desarrollados después de 30 días en cultivo bajo 8 tratamientos diferentes..	46
Figura 2.15. Porcentaje de embriones somáticos maduros derivados de suspensiones embriogénicas del cv. Manzano, desarrollados después de 30 días en cultivo bajo 8 tratamientos diferentes..	47
Figura 2.16. Maduración de embriones somáticos.....	48
Figura 2.17. Porcentaje de embriones somáticos inmaduros derivados de suspensiones embriogénicas del cv. Manzano, desarrollados después de 45 días en cultivo bajo 8 tratamientos diferentes..	49
Figura 2.18. Porcentaje de embriones somáticos maduros derivados de suspensiones embriogénicas del cv. Manzano, desarrollados después de 45 días en cultivo bajo 8 tratamientos diferentes..	50
Figura 2.19. Embriones somáticos maduros e inmaduros a los 45 días.	51
Figura 2.20. Porcentaje de embriones somáticos inmaduros derivados de suspensiones	

embriogénicas del genotipo AA cv. Dátil, desarrollados después de 45 días de cultivo bajo 8 tratamientos diferentes.. 52

Figura 2.21. Porcentaje de embriones somáticos maduros derivados de suspensiones embriogénicas del genotipo AA cv. Dátil, desarrollados después de 45 días de cultivo bajo 8 tratamientos diferentes.. 54

Figura 2.22. Tasa de germinación de embriones somáticos del cv. Manzano, después de 45 días de desarrollo bajo diferentes tratamientos en medio de maduración.. 56

Figura 2.23. Tasa de germinación de embriones somáticos maduros del cv. Dátil después de 45 días en cultivo del experimento de maduración..... 58

Figura 3.1. Electroforesis en gel de agarosa al 1%.. 77

Fig. 3.2. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Síntesis de cDNA con Oligo dT.. 80

Fig. 3.3. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Síntesis de cDNA con RP..... 81

Figura 3.4. Gel de acrilamida al 6% teñido con nitrato de plata, combinación C2 con Oligo dT.. 83

Figura 3.5. Gel de acrilamida al 6% teñido con nitrato de plata, combinación C2 con cebadores aleatorios..... 84

Figura 3.6. Transcritos diferenciales visualizados en un gel de acrilamida al 6%. 86

Figura 3.7. Dendograma de la similitud genética formado del análisis de conglomerados cDNA-SRAP UPGMA, de acuerdo al coeficiente de Jaccard, para tejidos y tratamientos de maduración de Manzano, empleando Oligo dT para la síntesis de cDNA. 89

Figura 3.8. Dendograma de la similitud genética formado del análisis de conglomerados cDNA-SRAP UPGMA, de acuerdo al coeficiente de Jaccard, para tejidos y tratamientos de maduración de Manzano, empleando cebadores aleatorios (RP) para la síntesis de cDNA. 91

Figura 3.9. Dendograma de la similitud genética formado del análisis de conglomerados

cDNA-SRAP UPGMA, de acuerdo al coeficiente de Jaccard, para tejido y tratamientos de maduración de Dátil, empleando Oligo dT para la síntesis de cDNA.. 92

Figura 3.10. Dendograma de la similitud genética formado del análisis de conglomerados cDNA-SRAP UPGMA, de acuerdo al coeficiente de Jaccard, para tejido y tratamientos de maduración de Dátil, empleando cebadores aleatorios (RP) para la síntesis de cDNA.... 94

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1. Principales estados productores de banano y plátano en México (SIAP, 2011).	7
Cuadro 2.1. Tratamientos de maduración para el genotipo Dátil.	33
Cuadro 2.2. Tratamientos de maduración para el genotipo Manzano.	34
Cuadro 3.1. Material biológico para la extracción de RNA.....	69
Cuadro 3.2. Combinaciones de cebadores para el análisis mediante cDNA-SRAP.....	74
Cuadro 3.3. Concentración y relaciones de absorbancias de RNA total extraído del material biológico.....	78
Cuadro 3.4. Concentración y relación de absorbancia del cDNA de doble hebra.....	81
Cuadro 3.5. Numero de bandas diferenciales y porcentaje de polimorfismo para cada una de las 5 combinaciones de SRAP utilizadas con el cDNA generado por Oligo dT y cebadores aleatorios (RP).	87

ABREVIATURAS

cDNA: complementary Desoxirbonucleic acid.

CE: Callo embriogénico.

E in: Embrión inmaduro

E ma: Embrión maduro

EG: embrión germinado

FM: Flores masculinas

SC: Suspensión celular.

SCE: Suspensión celular embriogénica.

RESUMEN

La embriogénesis somática *in vitro* es una herramienta esencial para la propagación de plantas libres de patógenos y para el mejoramiento biotecnológica de las diferentes variedades cultivadas de banano. Sin embargo, el correcto desarrollo y la maduración del embrión es frecuentemene uno de los pasos más limitantes de la regeneración de plantas en la mayoría de los protocolos existentes para *Musa* spp.

En objetivo del presente trabajo fue identificar transcritos de genes involucrados en la maduración del embrión somático de *Musa*.

Para tal fin primero se desarrolló el protocolo de embriogénesis somática a partir de flores masculinas inmaduras de dos cultivares de musáceas. Partiendo de callo embriogénico generado de los genotipos, *Musa acuminata*, AA cv. Dátil y *M. a. x M. balabisiana*, AAB cv. Manzano, se iniciaron suspensiones embriogénicas, y de ellas se diferenciaron embriones somáticos bajo diferentes tratamientos para lograr el desarrollo y maduración del embrión somático en ausencia de reguladores de crecimiento (RG), y se probó su potencial de regenerar plantas.

Se probaron 28 tratamientos de maduración para el desarrollo del embrión somático partiendo de suspensiones embriogénicas del cv. Dátil y 8 para el cv. Manzano. Estos contemplaron la modificación del potencial de agua en el embrión en desarrollo, alterando el potencial osmótico y matricial. Los mejores tratamientos resultaron para el cv. Manzano en un 79% de embriones maduros y un 55% para el cv. Dátil. La tasa de germinación de los embriones maduros, fue de alrededor 43% para el cv. Manzano y un 12% para Dátil.

Se trabajó en optimizar el protocolo para identificar transcritos en geles de secuenciación (acrilamida) mediante la técnica de cDNA-SRAP que utiliza la síntesis de DNA complementario y la síntesis de transcritos de la población de cDNA mediante el marcador molecular de polimorfismo de secuencias amplificadas relacionadas (SRAP, por sus siglas en ingles Sequence-related amplified polymorphism).

El RNA total fue aislado de tejido floral del explante inicial, callo embriogénico, suspensiones embriogénicas, embriones inmaduros y maduros, así como embriones en

proceso de germinación. Después se realizó la síntesis de hebra sencilla de cDNA utilizando Oligo dT y cebadores aleatorios (RP), para luego sintetizar la doble cadena de cDNA. Con la doble hebra obtenida y utilizando 5 combinaciones de cebadores SRAP se sintetizaron las poblaciones de cDNA-SRAP para visualizar los transcritos en geles de acrilamida mediante tinción de nitrato de plata.

Se registró un total de 551 bandas de transcritos de posibles genes relacionados con los estadios de desarrollo de embriones somáticos analizados mediante el cDNA-SRAP, de este total, se identificaron 271 bandas diferenciales relacionadas con la embriogénesis y los estadios de desarrollo-maduración del embrión somático en los cultivares de musáceas estudiadas. Los cebadores aleatorios contribuyeron con un número mayor de bandas en comparación con el Oligo dT.

Los transcritos diferenciales (TDFs) aquí identificados pueden ser aislados, clonados y secuenciados para su análisis bioinformático, con el fin de estudiar la identidad de los transcritos de los posibles genes relacionados con el proceso del desarrollo de los estadios y tratamientos de donde se aisló el RNA durante la embriogénesis somática de *Musa*.

ABSTRACT

In vitro somatic embryogenesis is an important tool in both the propagation of pathogen-free plants and for the biotechnological improvement of banana varieties. Yet, the development and proper maturation of the somatic embryos is often one of the most limiting steps for plant regeneration in the majority of the existing protocols in *Musa* spp.

This study aims to identify transcripts of genes related to the maturation of somatic embryos in *Musa*.

To this end somatic embryogenesis was initiated using immature male flowers of two banana cultivars. Starting from the embryogenic calluses generated for the genotype *Musa acuminata*, AA cv. Datil and *M. a. x M. balabisiana*, AAB cv. Manzano, embryogenic cell suspensions (ECS) cultures were initiated, separately; from these ECS lines, somatic embryos were differentiated under different treatments on solidified media to accomplish their development and maturation in absence of growth regulators (RG), and tested their potential to regenerate complete plants.

A total of 36 treatments were tested for the development of mature somatic embryos of the two embryogenic cell suspension (ECS) lines. A total of 28 treatments for the ECS line of cv. Datil, and 8 for cv. Manzano were tested. The treatments included media modifications to change the water potential of the developing embryos by altering the osmotic and matric potential. The best treatment outcome for cv. Datil and cv. Manzano give 55 % and 79% of mature embryos, respectively. Correspondingly, the germination rates of matured embryos, was about 12% for cv. Datil and 43% for cv. Manzano.

To identify transcripts of the developing somatic embryos that undergo the maturation treatments, the in gel technique of cDNA-SRAP (cDNA, complementary DNA; SRAP, sequence-related amplified polymorphism) was used and optimized. For that purpose, the synthesis of cDNA and the synthesis of transcripts of cDNA populations by SRAP primers was accomplished for different selected maturation treatments.

Total RNA was isolated from different tissues, i.e., immature male flowers, embryogenic callus, embryogenic cell suspensions, immature and mature somatic embryos and somatic embryos initiating the germination process. After synthesis of single strand complementary

DNA (cDNAss) using oligo-dT and Random-hexamer (RP) primers, the double stranded cDNA (cDNAds) was synthesized. The purified cDNAds was used as template for the synthesis of cDNA populations using five different SRAP primer combinations, and the expressed transcripts were visualized on sequencing gels by silver staining.

A total of 551 transcript bands of candidate genes related to the maturation of somatic embryos were detected using cDNA-SRAP. In total, 271 bands we identified as differential transcripts associated to somatic embryogenesis and embryo maturation stages of the *Musa* cultivars studied. Random primers contributed with a greater number of transcript bands compared with Oligo dT.

The transcript derived fragments (TDFs) identified herein can be isolated, cloned and sequenced, and their nucleotide sequence information used to perform a bioinformatic analysis, to study the identity of the transcripts of those candidete genes associated to the development stages and treatments from where the RNA was isolated during the somatic embryogenesis of *Musa*.

INTRODUCCIÓN

El mejoramiento genético tradicional, así como la propagación masiva de clonas élite de plátano, son importantes logros que han resultado del trabajo llevado a cabo por décadas, a pesar de la complejidad genética implícita debido a la poliploidia y la esterilidad de la mayoría de las variedades de interés comercial. Sin embargo, aún hay muchos retos por vencer, entre los cuales se encuentran la disminución del impacto de afecciones bióticas y abióticas, del uso de plaguicidas y de los costos de producción.

Las variedades de banano comestibles son partenocárpicas y no producen semilla verdadera, por lo que su propagación es vegetativa mediante hijuelos, con una tasa de multiplicación baja y un acervo genético reducido, por lo que son altamente susceptibles a plagas y enfermedades, entre otras adversidades. Es por esto que surge la necesidad de desarrollar y mejorar las herramientas alternativas para el mejoramiento biotecnológico del plátano (Hernández., 2001).

En este sentido, la embriogénesis somática (ES) es una herramienta útil para mejorar las variedades comerciales del banano (Suprassana *et al.*, 2006). La ES, es posible gracias a la totipotencia de la célula vegetal. El proceso de ES, implica la reprogramación de la célula diferenciada hacia la condición de célula embriogénica con la concomitante diferenciación de ésta para formar embriones somáticos (Oliveira-Santos *et al.*, 2005).

En el género *Musa*, la regeneración *in vitro* mediante ES de cultivares poliploides o diploides estériles, requiere de la obtención de células embriogénicas a partir de tejidos diferenciados: meristemos de flores masculinas y/o femeninas inmaduras, brácteas jóvenes de la inflorescencia masculina o meristemos en proliferación (Prasanna-Divakaran *et al.*, 2012). Unas de las principales desventajas del uso de meristemos en proliferación "scalps", es el largo periodo de tiempo requerido para obtener los embriones somáticos y su regeneración y conversión a planta completa (Strosse *et al.*, 2006).

En plátano las tasas de germinación y de conversión a planta de los embriones somáticos son muy bajas, debido a que éstos, parecen depender del genotipo y de las condiciones de cultivo *in vitro* (Youssef *et al.*, 2010). Por ello, es necesario profundizar en el conocimiento básico sobre los componentes fisiológicos y moleculares involucrados en dichos procesos, para optimizar los sistemas embriogénicos disponibles en plátano.

INTRODUCCIÓN

En este sentido, evidencias en otras especies de mono y dicotiledóneas, indican que el proceso de maduración del embrión, es clave para la correcta diferenciación de los tejidos del embrión. Durante este proceso la acumulación de reservas proteicas y lipídicas se da previo a la desecación, tal como sucede en el embrión cigótico. Sin embargo, la identificación de genes expresados y/o reprimidos durante la maduración del embrión somático *in vitro*, permitiría el planteamiento de estrategias que contribuyan a optimizar dicho proceso y sobre el cual aún no existe información disponible en plátano.

Entre las metodologías que permiten identificar genes expresados diferencialmente durante la ES, se cuentan: microarreglos basados en la hibridación con el empleo de DNA complementario (cDNA); análisis serial de expresión de genes (SAGE, sus siglas en inglés); y las basadas en huellas en gel, como cDNA-AFLP y cDNA-SRAP. De los métodos citados, las dos últimas basadas en el empleo de cDNA para la detección del polimorfismo genético por los marcadores moleculares AFLP y SRAP, los más adecuados ya que proporcionan información sobre la expresión de genes durante un proceso biológico en particular, sin previo conocimiento de la secuencia del genoma (Tang *et al.*, 2005), constituyendo un vínculo entre la fisiología y la biología molecular de los procesos biológicos.

Debido a lo antes expuesto, el presente proyecto aborda la identificación de transcritos de posibles genes involucrados en el proceso de maduración *in vitro* del embrión somático de *Musa*, mediante el uso de cDNA-SRAP.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1. Género *Musa*

El género *Musa*, perteneciente a la familia Musáceae, está representado por cerca de 40 especies silvestres diploides, nativas del sureste asiático. Las especies del género son subdivididas en cinco secciones: Eumusa ($x=11$), que comprende la mayoría de las especies y variedades cultivadas; Rhodochlamys ($x=11$); Australimusa ($x=10$); Callimusa ($x=9,10$); e Ingentimusa ($x=7$) (Figura 1). Esta clasificación se debe primordialmente: al número básico de cromosomas, las características morfológicas de la inflorescencia, así como la morfología de las semillas (Christelova *et al.*, 2011; Wong *et al.*, 2002).

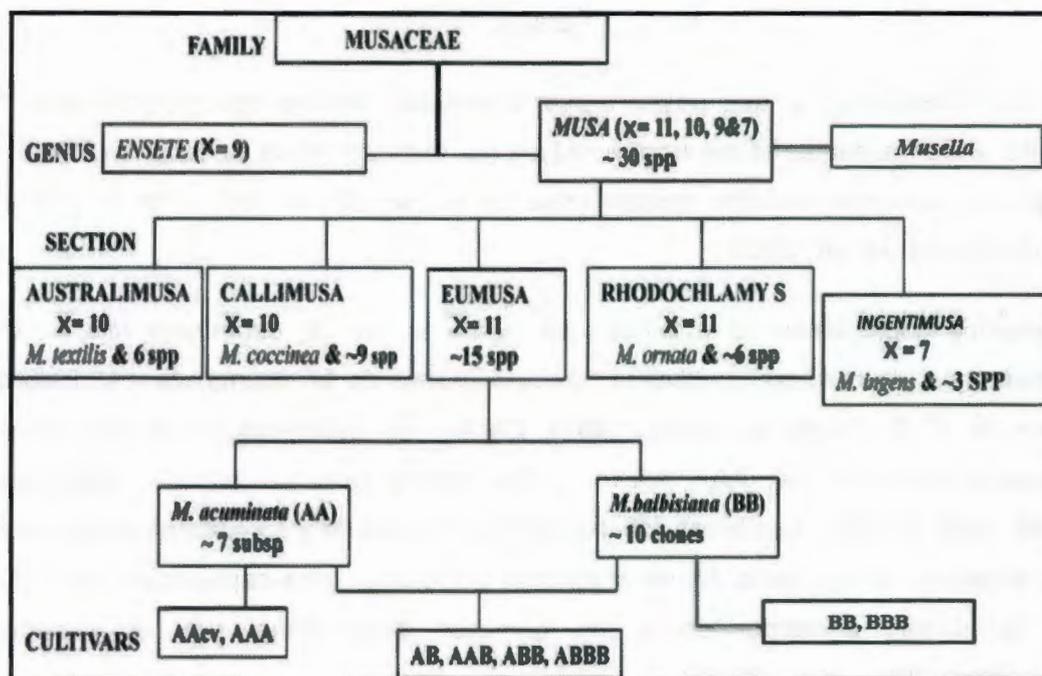


Figura 1.1. Clasificación de la familia Musáceae dividida en secciones (Nwakanma *et al.*, 2003).

La distribución geográfica y centro de origen primario del género *Musa* comprende la India, las islas del Océano Pacífico, Nepal, extendiéndose hasta el norte de Australia (Figura 1.2) (INIBAP, 2006).

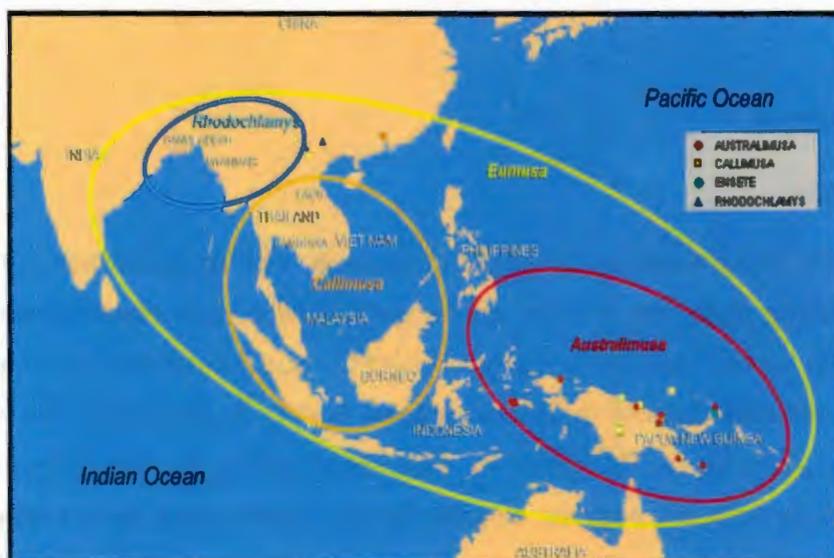


Figura 1.2. Distribución geográfica de las secciones de *Musa* (Guinart *et al.*, 2002).

La sección Eumusa es la que posee mayor diversidad, incluye aproximadamente 13-15 especies, entre las cuales se encuentran *Musa acuminata* y *Musa balbisiana* (Soto, 1992), mismas que son consideradas progenitores de la mayoría de los plátanos y bananos cultivados (Valerio *et al.*, 2002).

Los bananos comestibles se clasifican en cultivares de *M. acuminata* (clonas de *M. acuminata* x *M. acuminata*) y cultivares híbridos (clonas de *M. acuminata* x *M. balbisiana*) (Simmonds 1973; citado por Soto, 1992). Dentro los cultivares de *M. acuminata* se distinguen tres grupos: AA, AAA, AAAA. En las clonas de origen híbrido, cuatro grupos: AB, AAB, ABB y ABBB. Las letras refieren el nivel de ploidía y su composición genómica. De las especies con genoma AA se originaron por cruza intra-específicas, los triploides AAA, los cuales corresponden a los bananos comestibles que actualmente se comercializan (Pillay *et al.*, 2006).

1.1. Clasificación taxonómica del género *Musa*

La taxonomía del género *Musa* es la siguiente según Tree of Life Web Project, 2010:

Reino: Vegetal

Clase: Angiospermae

Subclase: Monocotiledoneae

Orden: Zingiberales

Familia: *Musáceae*

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

1.2. Descripción botánica de *Musa*

Las formas botánicas de las variedades comerciales de *Musa*, son muy particulares y responden al nivel de ploidía que poseen. Es por esto que las formas diploides son por lo general fértiles y de reproducción sexual. Mientras que las formas triploides, tetraploides, pentaploides, etc. son por lo general infértiles y partenocárpicas. Además de que presentan frutos más grandes y pseudotallos más gruesos. Sin embargo, de manera general las plantas de banano son herbáceas gigantes con pseudotallos aéreos, éstos se originan de cormos subterráneos de los cuales se desarrollan vegetativamente hijuelos (Figura 1.3). Las hojas tienen una distribución helicoidal y las bases foliares que circundan al tallo conforman el pseudotallo (Soto, 1992). La hoja recién emergida presenta forma de "cigarro" dentro del pseudotallo, una vez emergida se nota la coloración verde de la hoja. Al madurar la hoja está constituida por la lámina foliar, el pecíolo, la nervadura central y el ápice (Ortiz *et al.*, 1999). La inflorescencia surge a partir del meristemo apical del tallo subterráneo en la base del pseudotallo, lo cual detiene el desarrollo foliar (Soto, 1992). Los frutos se desarrollan por partenocarpia (formación del fruto en ausencia de fertilización, resultando en frutos sin semilla) dentro los ovarios de las flores pistiladas, los cuales muestran un aumento de volumen considerable (Robinson, 1996; Soto, 1992).

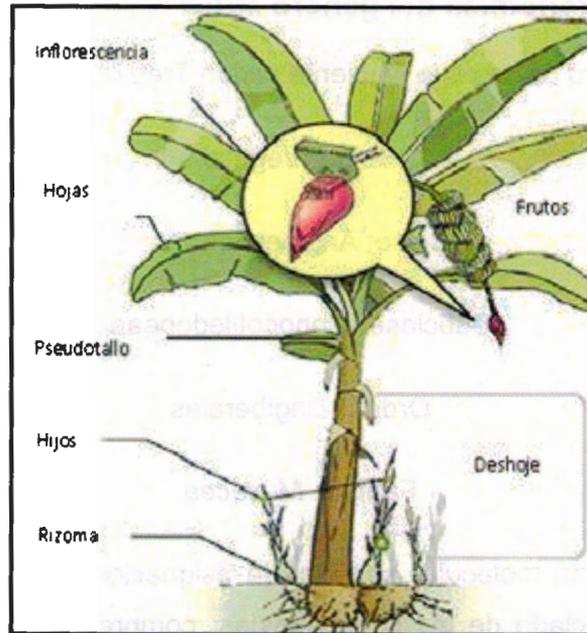


Figura 1.3. Morfología de *Musa* (Arosemena, 2007).

1.3. Producción mundial de banano

La producción de banano, se ha enfocado en la comercialización de formas triploides (estériles y partenocárpicas), las cuales han ubicado, al banano como la fruta de mayor exportación a nivel mundial en términos de volumen y; después de los cítricos, el segundo lugar en términos de valor comercial. La quinta parte de la producción mundial del cultivo de banano se comercializa internacionalmente (SIAP, 2011).

Según la FAO, en el 2010, se produjo un total de 138.42 millones de toneladas de plátano y banano en el mundo. Siendo la India, el principal productor con 29, 780,000 millones de toneladas que representan el 21.51% de la producción mundial, seguido por Uganda con una producción de 10,150,000 millones de toneladas, lo cual representa el 7.33% de la producción mundial.

El cultivo de banano en México ocupa una superficie de 77,303.66 ha que producen 2,138,686.85 millones de toneladas de fruta, de las cuales el 95% se destina para el consumo nacional y el 5% restante para exportación (SIAP, 2011). Los principales estados productores de banano son: Chiapas, Tabasco, Veracruz, Colima y Michoacán. Yucatán, aunque minoritario, también se ubica entre éstos (Cuadro 1.1).

Cuadro 1.1. Principales estados productores de banano y plátano en México (SIAP, 2011).

Estados	Producción (toneladas)	Producción (%)
CHIAPAS	792,892.43	37.074%
TABASCO	475,612.77	22.239%
VERACRUZ	270,799.61	12.662%
COLIMA	150,985.98	7.060%
MICHOACAN	142,077.90	6.643%
JALISCO	81,504.25	3.811%
GUERRERO	73,098.32	3.418%
NAYARIT	66,659.32	3.117%
OAXACA	50,090.95	2.342%
PUEBLA	29,092.01	1.360%
QUINTANA ROO	2,989.30	0.140%
YUCATAN	1,286.80	0.060%
CAMPECHE	849.3	0.040%
MORELOS	428.91	0.020%
MEXICO	295	0.014%
HIDALGO	24	0.001%
Total	2,138,686.85	

1.4. Enfermedades del banano

Las formas triploides comercializadas poseen acervo genético reducido debido a su esterilidad, principalmente. Esta disminuida variabilidad genética, ocasiona cierta susceptibilidad al ataque de diversos fitopatógenos, los cuales son los responsables en gran medida del elevado costo de producción del cultivo debido a la necesidad de utilizar fungicidas para combatirlos.

Entre las enfermedades fúngicas que afectan al banano destacan: sigatoka amarilla (*Mycosphaerella musicola*), sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*); marchitez (*Fusarium oxysporum*); mancha foliar (*Cordana musae*); punta de cigarro o "cigar-end rot" (*Verticillium theobromae*).

Entre las enfermedades bacterianas que afectan al banano se cuentan la enfermedad del moko (*Pseudomonas solanacearum*); pudrición blanca del pseudotallo y cormo (*Erwinia carotovora*); y entre las principales enfermedades virales: virus del mosaico del pepinillo y

enfermedad del rayado de Guineo (Almodóvar *et al.*, 2002).

1.5. Embriogénesis en plantas

La susceptibilidad al ataque de patógenos, ha incrementado los costos de producción del banano. Sin embargo, la embriogénesis somática (ES) es una herramienta útil para mejorar las variedades comerciales del banano (Suprassana *et al.*, 2006), que son en su mayoría partenocárpicas.

El proceso embriogénico inicia con la doble fertilización, seguido de la determinación de los tres ejes del embrión los cuales son: longitudinal, lateral y radial. Durante este proceso el embrión sufre cambios morfológicos; fase denominada morfogénesis, durante la cual el eje polar de la futura planta es definido. En esta fase son formados los tejidos embrionarios, los cuales conformarán al embrión (West *et al.*, 1993).

La segunda fase es la maduración del embrión, en la cual existe una acumulación y almacenamiento de reservas (azúcares y lípidos). En esta etapa se ha observado que el embrión sufre una pérdida de agua, lo cual provoca un proceso de desecación, el cual deriva en dormancia (West *et al.*, 1993). Este proceso de desecación es regulado por diversos factores genéticos y moleculares (Ikeda *et al.*, 2006).

La tercera fase denominada maduración tardía, implica que las macromoléculas acumuladas en la mayoría de las células embrionarias propician un crecimiento acelerado de masa y por consiguiente en el tamaño del embrión. Durante esta fase, los embriones adquieren la capacidad para resistir la desecación, reduciendo su metabolismo (quiescencia metabólica). Esta fase se puede prolongar mientras no existan las condiciones óptimas para la germinación del embrión (George *et al.*, 2008).

1.6. Embriogénesis cigótica

La embriogénesis cigótica, como ocurre en todas las angiospermas, inicia con el proceso de la doble fertilización de tres de los núcleos del saco embrionario; que involucran la fertilización de la célula huevo (ovocélula) con un núcleo espermático del polen, y de las células polares o madres del endospermo por el otro núcleo espermático, este proceso da lugar al cigoto diploide, y al endospermo triploide.

El cigoto se divide de forma asimétrica, dando lugar a las células apicales y basales, así como a la formación del suspensor. En esta fase se considera que el embrión se encuentra en un estadio globular (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006). Posteriormente ocurren una serie de eventos que garantizan la formación y adaptación de los diversos tejidos y órganos, como los meristemos, los cotiledones y el hipocotilo; dentro del embrión (Santos-Mendoza *et al.*, 2008).

En el caso de *Arabidopsis thaliana*, el embrión se encuentra en el estadio acorazonado siete días después de la fertilización. Durante este periodo ocurren los procesos de división y diferenciación celular. Esto implica que el protodermo se ha diferenciado en la epidermis para la formación de los sistemas vasculares a partir de los paquetes pro-vasculares. Posteriormente ocurre la organización de los meristemos apico-basales (brotes y raíz), y la formación de los cotiledones simétricos lo cual determina, en gran medida la forma completa del embrión (Santos-Mendoza *et al.*, 2008).

Los estadios torpedo y el cotiledonario son los últimos estadios del desarrollo del embrión (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006). Este es el caso en dicotiledóneas, sin embargo, en monocotiledóneas los procesos son idénticos, hasta la formación del embrión globular (Hartmann *et al.*, 2010).

Los estadios del desarrollo del embrión cigoto en monocotiledóneas ocurren en el siguiente orden: globular, escutelar y coleoptilar (Figura 1.4).

El estadio globular es similar en dicotiledóneas excepto que el suspensor no es unicelular y se puede observar que está menos diferenciado. El estadio escutelar se caracteriza por la presencia de un único cotiledón, al que se le llama escutelo. Esto es diferente respecto a las dicotiledóneas, en las cuales se observa un par de cotiledones. En el estadio coleoptilar el eje del embrión es diferenciado, dando origen a la plúmula y a la radícula. También se observa un tejido especializado llamado coleorhiza que rodea el tejido foliar y radicular, que contribuye a la germinación del embrión (Hartmann *et al.*, 2010).

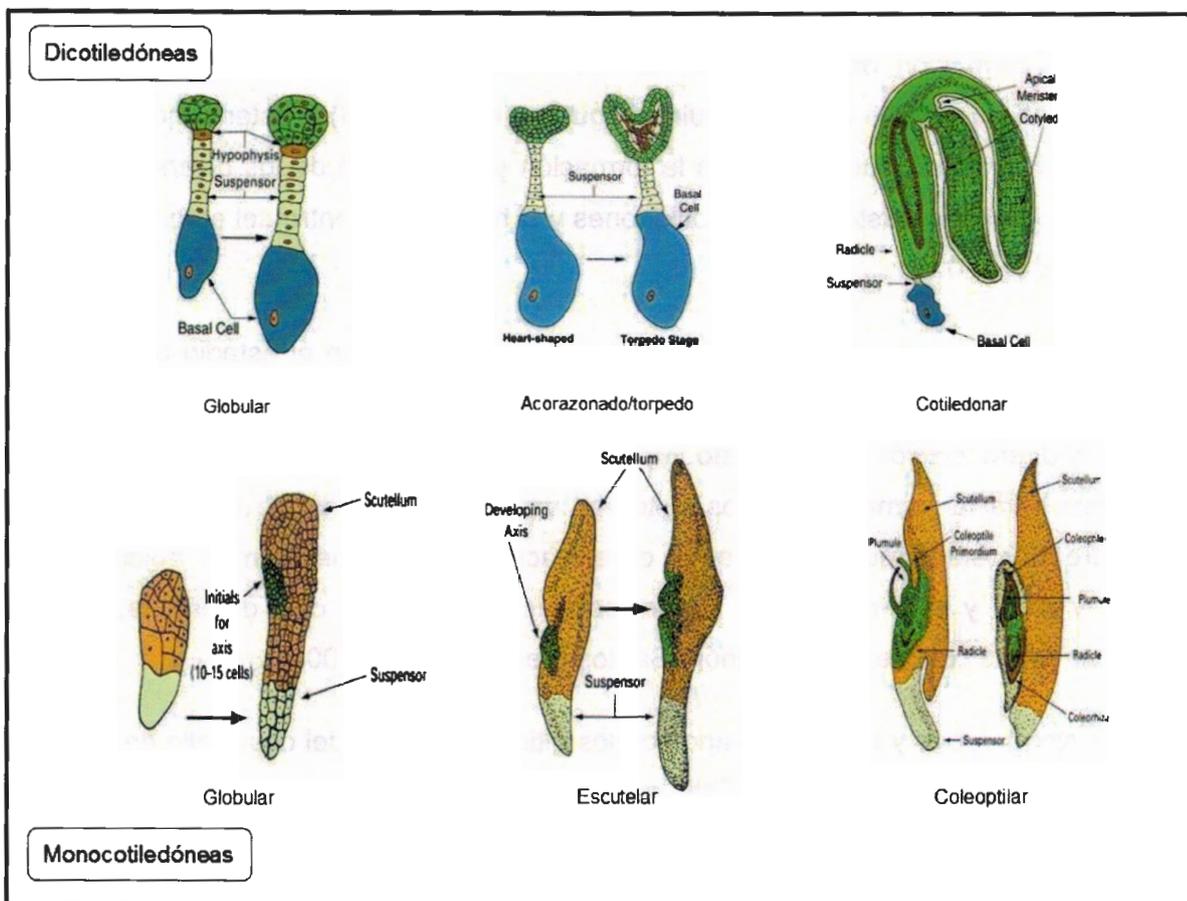


Figura 1.4. Embriogénesis cigótica en dicotiledóneas y monocotiledóneas (Hartmann *et al.*, 2010).

1.7. Embriogénesis somática

La embriogénesis somática, es el proceso de desarrollo de un embrión, a partir de una célula somática; sin la fusión de células gaméticas (Tisserat *et al.*, 1979). En un medio sintético, bajo condiciones *in vitro*, las células somáticas diferenciadas son inducidas a retornar a un estadio meristemático basal característico de células embriogénicas (Zimmerman 1993, Schmidt *et al.*, 1997, Komamine *et al.*, 2005, Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006).

Este proceso ocurre en plantas superiores debido a su “totipotencia celular”, la cual hace referencia a la capacidad que poseen las células somáticas para regenerar una planta completa (Reinert, 1959; Namasivayam, 2007). Cabe señalar, que el término “célula embriogénica” se limita a las células que han completado el proceso de transición, desde

un estadio somático a un estadio donde no requiere más estímulos endógenos, tales como la aplicación de reguladores de crecimiento, esenciales para el desarrollo de embriones somáticos (Komamine *et al.*, 1992, Jong *et al.*, 1993).

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

En la fase de expresión la célula embriogénica muestra su competencia embriogénica y se diferencia para formar el embrión somático (Jimenez, 2001). El embrión somático atraviesa estadios morfológicos similares al embrión cigótico, estos estadios son: el globular, el oblongo, el acorazonado, el torpedo y el cotiledonario (Figura 1.5) (Nakamura *et al.*, 1992). En el primer estadio, el embrión globular inicia su diferenciación celular y el establecimiento de la estructura básica de la futura planta. La primera estructura visible, en este punto, es el protodermo; la formación correcta de esta estructura permite que los embriones pasen al siguiente estadio. El estadio oblongado, observado por primera vez en zanahoria (*Daucus carota*), es un estadio en el que aún no se ha definido o formando completamente el procambium, la cual se pudiera desarrollar completamente hasta el estadio acorazonado. En el estadio torpedo se observan los cotiledones como pequeñas protuberancias en el extremo apical de los embriones somáticos (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006). Estos últimos estadios fueron definidos en Zanahoria (*Daucus carota*), una planta dicotiledónea. Sin embargo los estadios oblongado y torpedo difieren en monocotiledóneas (Zimmerman, 1993) .

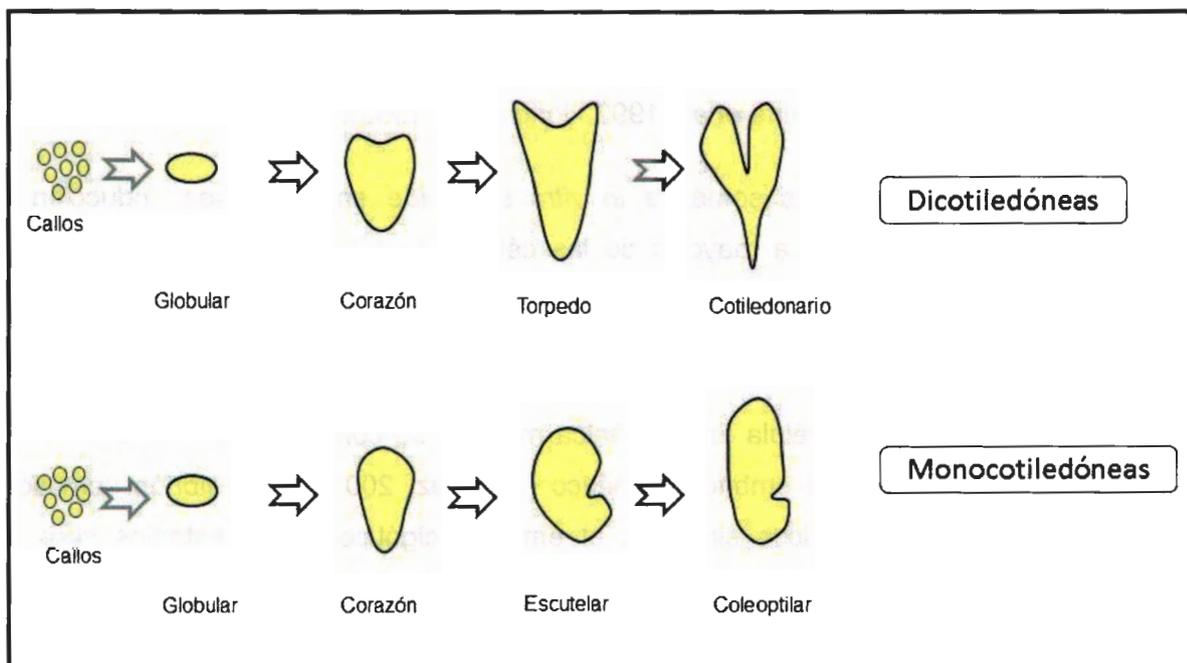


Figura 1.5. Proceso de embriogénesis somática (Zimmerman, 1993).

Los estadios en monocotiledóneas ocurren de manera diferente. En el estadio globular los embriones somáticos presentan una forma esférica, por lo que es difícil observar si la embriogénesis ha ocurrido, pero a medida que se van desarrollando dan lugar a los estadios acorazonado, escutelar y coleoptilar (George *et al.*, 2008) (Figura 1.5).

Sin embargo una de las etapas limitantes de la embriogénesis somática es la maduración del embrión. De hecho, estudios indican que una deficiente maduración en el embrión, deriva en afectaciones al proceso de germinación, y en la conversión de plántulas (Perán-Quesada *et al.*, 2004), las cuales resultan en embriones inmaduros y con anomalías morfológicas (Ammirato, 1987).

La embriogénesis somática es una herramienta muy valiosa para la propagación vegetativa de las especies, además de que a través de ella se pueden realizar estudios básicos bioquímicos, fisiológicos, morfológicos y moleculares, los cuales ayudarán a desarrollar tecnologías que puedan ser aplicadas en un futuro cercano.

1.8. La maduración del embrión somático

La maduración del embrión somático, ocurre tras numerosos cambios morfológicos y bioquímicos., que implican que los cotiledones se expandan e inicien el almacenamiento

de reservas (Thomas, 1993) en compartimientos subcelulares para su posterior movilización (Merkele *et al.*, 1995). Generalmente cuando existe una acumulación eficiente de reservas, principalmente de almidón, el embrión cambia su apariencia de color blanco-traslúcido a blanco-opaco, dependiendo de la especie (Marquez-Martin *et al.*, 2011).

Los embriones somáticos deben alcanzar un estado de madurez morfológico y fisiológico, para que la siguiente etapa de germinación sea óptima (Stasolla *et al.*, 2003). Por lo que, solo aquellos embriones que acumulen reservas necesarias, durante su maduración, se convertirán en plantas.

La relación de agua entre el embrión y el medio de cultivo es un factor importante durante la maduración del embrión somático. La reducción en la disponibilidad de agua puede estimular la inducción de maduración en el embrión (Klimaszewska *et al.*, 2000). En condiciones *in vitro*, se emplean diversas estrategias que impactan sobre la disponibilidad de agua en el medio de cultivo, por ejemplo: 1) la adición de compuestos de bajo peso molecular, tales como sales orgánicas, aminoácidos y azúcares; 2) la adición de compuestos de alto peso molecular, como el polietilenglicol (PEG) (Márquez-Martín *et al.*, 2011).

La sacarosa es un agente osmótico de bajo peso molecular, que en altas concentraciones tiene un efecto tóxico, debido a la alta permeabilidad que ejerce en el medio de cultivo (Vahdati *et al.*, 2008; Mhaske *et al.*, 1998), ocasiona un efecto negativo sobre el crecimiento de los embriones, debido a que esta molécula desplaza todo el agua del interior de la célula (Ammirato *et al.*, 1987).

Por su parte, el PEG es un agente osmótico no permeable, que al ser adicionado al medio del cultivo crea condiciones similares al proceso de la desecación, las cuales son favorables para el embrión somático (Zhang *et al.*, 2007). Por su parte

Uno de los reguladores de crecimiento que intervienen en el proceso de desecación del embrión es el ácido abscísico (ABA), cuya biosíntesis ocurre por la vía de los carotenoides. Si bien es cierto que aún no se conoce de manera precisa el mecanismo de acción de este regulador, evidencias indican que regula la expresión de genes

relacionados con la etapa de maduración (Fischerova *et al.*, 2008).

Otro compuesto que actúa como agente osmótico es el gelificante, el cual según su concentración promueve la disminución de disponibilidad de agua en el medio de cultivo, y conduce a la acumulación de lípidos y almidones para una correcta maduración de los embriones somáticos, pero a diferencia de la sacarosa este no es un agente osmóticamente activo (Ali *et al.*, 2010; Perán-Quesada *et al.*, 2004). Diversos estudios han analizado el papel del gelificante durante la maduración del embrión somático. Por ejemplo, Garin *et al* (2000) experimentaron con dos concentraciones de gelificante (Gelrite), y demostraron 1% del gelificante promueve la correcta maduración de los embriones somáticos. Perán-Quesada *et al* (2004) analizaron el efecto de diferentes concentraciones de sacarosa (175 y 263 mM) y gelificante (3.4 y 6.8 g/L) sobre la maduración de los embriones somáticos de *Persea americana*, y determinaron que 175mM de sacarosa, conduce a una mejoría en la formación y calidad de los embriones. Sin embargo concentraciones mayores de sacarosa (263 mM) ocasionan una calidad disminuida en los embriones. La concentración de 6.8g/L de gelificante condujo a la obtención de un mayor número de embriones somáticos.

Ali *et al* (2010) evaluaron cuatro concentraciones de gelificante y de PEG en medio de cultivo, durante la embriogénesis somática de *Juglans regia*. La concentración de 0.3% de gelificante dio una mejor respuesta a la maduración de los embriones. Mientras que el incremento en la concentración de PEG no resultó en una mejor respuesta de embriones maduros, debido a que disminuye la disponibilidad de agua en el medio, ocasionando anomalías en los embriones.

1.9. Genes expresados durante la embriogénesis de plantas

Durante la iniciación de la embriogénesis se da la reprogramación de la expresión de genes, para que las células diferenciadas transiten hacia el estadio de célula meristemática, recuperando su totipotencia de división. Dicha reprogramación de genes ocurre durante el proceso transcripcional o post-transcripcional, por lo que es clave la identificación de los transcritos en dichos procesos para comprender el desarrollo embriogénico somático (Fujimura *et al.*, 1980).

Se han identificado diferentes genes que participan en las etapas de la embriogénesis de

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

En estudios realizados con *Arabidopsis thaliana* se observó que el gen LEAFY COTILEDON (LEC), definido por mutaciones en tres loci: LEC1, LEC2 y Fusca 3; intervienen en diferentes funciones durante la embriogénesis: 1) el mantenimiento del suspensor, 2) la síntesis y la acumulación de reservas durante la maduración para el proceso de desecación del embrión, y 3) la inhibición de la germinación (Harada, 2001). Debido a la importancia de estos genes en la regulación de las etapas tempranas de la embriogénesis somática, se han aislado de diferentes especies, como maíz (*Zea mays*) (Zhang *et al.*, 2002), Zanahoria (*Daucus Carota*) (Yazawa *et al.*, 2004), y cacao (*Theobroma cacao* L.) (Alemanno *et al.*, 2007).

Proteínas cinasas como las proteínas SERK se ha identificado también durante la embriogénesis (Brecraft, 1998).. Dichas proteínas están involucradas en numerosos procesos de señalización y transducción de señales, las cuales son percibidas desde la membrana plasmática hasta el sitio de acción, regulando de manera negativa a los transductores (Yang *et al.*, 2010).

1.10. Análisis de la expresión de los genes involucrados en la embriogénesis somática

El análisis de la expresión de genes incluye un conjunto de metodologías, para el estudio de los procesos biológicos, moleculares y del desarrollo en plantas. Así mismo estas metodologías pueden identificar los genes involucrados en procesos *in vitro* como la embriogénesis somática (Tang *et al.*, 2005).

Entre las metodologías para analizar la expresión de genes se encuentran los microarreglos a partir de cDNA, análisis serial de la expresión génica (SAGE), hibridación sustractiva por supresión (SSH), polimorfismo de la longitud de fragmentos de amplificados usando como templado ADN complementario (cDNA-AFLP) y polimorfismo

amplificado de secuencias relacionadas a partir de ADN complementario (cDNA-SRAP). Cabe mencionar que el uso de una metodología depende del objetivo que se persigue (Tang *et al.*, 2005).

1.11. cDNA-SRAP

El cDNA-SRAP se basa en la reacción de PCR para detectar el polimorfismo de secuencias codificantes (Li y Quiros *et al.*, 2001). El método combina la técnica de ADN complementario y el marcador molecular SRAP; e inicia con la síntesis del ADN complementario, el cual se obtiene a partir del RNA total o el RNA mensajero usando una enzima llamada transcriptasa reversa (TR). Este MM (marcador molecular) utiliza un cebador sentido de 17 pb (pares de bases) y un cebador anti-sentido de 18 pb. El cebador sentido consiste en una secuencia central de 14 pb, las primeras 10 bases son secuencias variadas, seguido de una secuencia de 4 bases (CCGG) y por último 3 nucleótidos selectivos en el extremo 3'. La estructura del cebador anti-sentido es similar al cebador sentido pero con la diferencia que la secuencia central es ATTT..De tal manera que los cebadores u oligonucleótidos amplifican marcos de lectura abiertos (ORF) dentro del templado de ADN.

La finalidad de utilizar la secuencia de "CCGG" en la secuencia del cebador sentido, es para alinearse a los exones de las regiones dentro de los marcos de lectura abiertos, este fundamento se basa a que los exones contienen regiones ricas en GC. El cebador anti-sentido contiene secuencias "AATT" debido a que la región 3' contiene secuencias ricas en AT. Esta secuencia es encontrada con frecuencia en los promotores e intrones del genoma de eucariotes (Li y Quiroz, 2001).

Las ventajas de este MM es la simplicidad, la alta reproducibilidad y la facilidad de aislar bandas para su posterior secuenciación. El uso del cDNA_SARP como marcador de eventos fisiológicos y evolutivos se sustenta en diversos estudios, tales como: el mapeo del transcriptoma y genómica funcional en *Brassica oleracea* (Li *et al.* 2003); el transcriptoma de especies diploides y tetraploides de *Dioscorea zingibirensis* en respuesta a temperatura (Xu *et al.* 2011); y las alteraciones en la expresión de genes en diferentes alotetraploides naturales de *Brassica*, por ejemplo, *B. napus*, *B. carinata* y *B. juncea* (Gui *et al.* 2009). En otro estudio, Choochai *et al* (2007) empleando la

metodología de cDNA-SRAP lograron identificar genes responsivos de fotoperiodo en *Oriza sativa*. Entre los estudios realizados en embriogénesis somática de banano se cuenta con el reportado por Itza (2011), el cual con la ayuda del cDNA-SRAP, identificó los transcritos de genes involucrados durante diferentes etapas de la embriogénesis somática en *Musa*.

HIPÓTESIS

Si el embrión somático de *Musa* spp., se desarrolla bajo condiciones limitantes de disponibilidad de agua durante su maduración, y con ello se logra incrementar la tasa de germinación de estos, entonces es posible identificar genes que sean clave para dicho proceso mediante su análisis diferencial.

OBJETIVO GENERAL

Analizar los perfiles de transcritos involucrados en la maduración del embrión somático de *Musa*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desarrollar el protocolo de embriogénesis somática a partir de flores masculinas inmaduras de *Musa acuminata* cv. Dátil (AA), cv. Enano gigante francés (AAA) y/o Manzano (AAB).

Analizar los transcritos diferenciales de la maduración del embrión somático y del análisis de resultados proponer los fragmentos de transcritos diferenciales (TDFs) que deban ser clonados y secuenciados.

JUSTIFICACIÓN

La embriogénesis somática es una herramienta valiosa en la biotecnología del banano para la clonación masiva de cultivares elite como alternativa a la propagación convencional y el desarrollo de semillas sintéticas de utilidad en la movilización de germoplasma libre de patógenos, e indispensable para la transferencia de genes en el mejoramiento genético de cultivares comerciales estériles. Además puede servir de sistema modelo para estudios básicos de la embriogénesis en *Musa*, donde se dispone de diferentes sistemas de embriogénesis *in vitro* que permiten obtener embriones somáticos (ES), sin embargo, contar con sistemas altamente eficientes es el objetivo más deseado, ya que en la actualidad se está lejos de este ideal, en particular para los cultivares de interés comercial. En el embrión cigótico, la maduración es un estadio transitorio, y sin embargo, esencial entre la fase de desarrollo del embrión y la fase de germinación del mismo, ya que la frecuencia con que se regeneran plantas es mayor cuando se parte de embriones maduros. En el caso de banano, las evidencias apuntan al papel que tienen la disponibilidad de agua y el estrés osmótico sobre la maduración del embrión cigótico y los embriones somáticos (Borges y Escobedo, en preparación). La importancia de ahondar en el conocimiento del proceso de maduración del embrión somático en Musáceas y de los factores que lo afectan, tal conocimiento servirá de base para desarrollar estrategias de mejora de los protocolos de ES disponibles para genotipos pocos responsivos a tal proceso.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Estrategia experimental a seguir para lograr desarrollar todos los objetivos planteados.

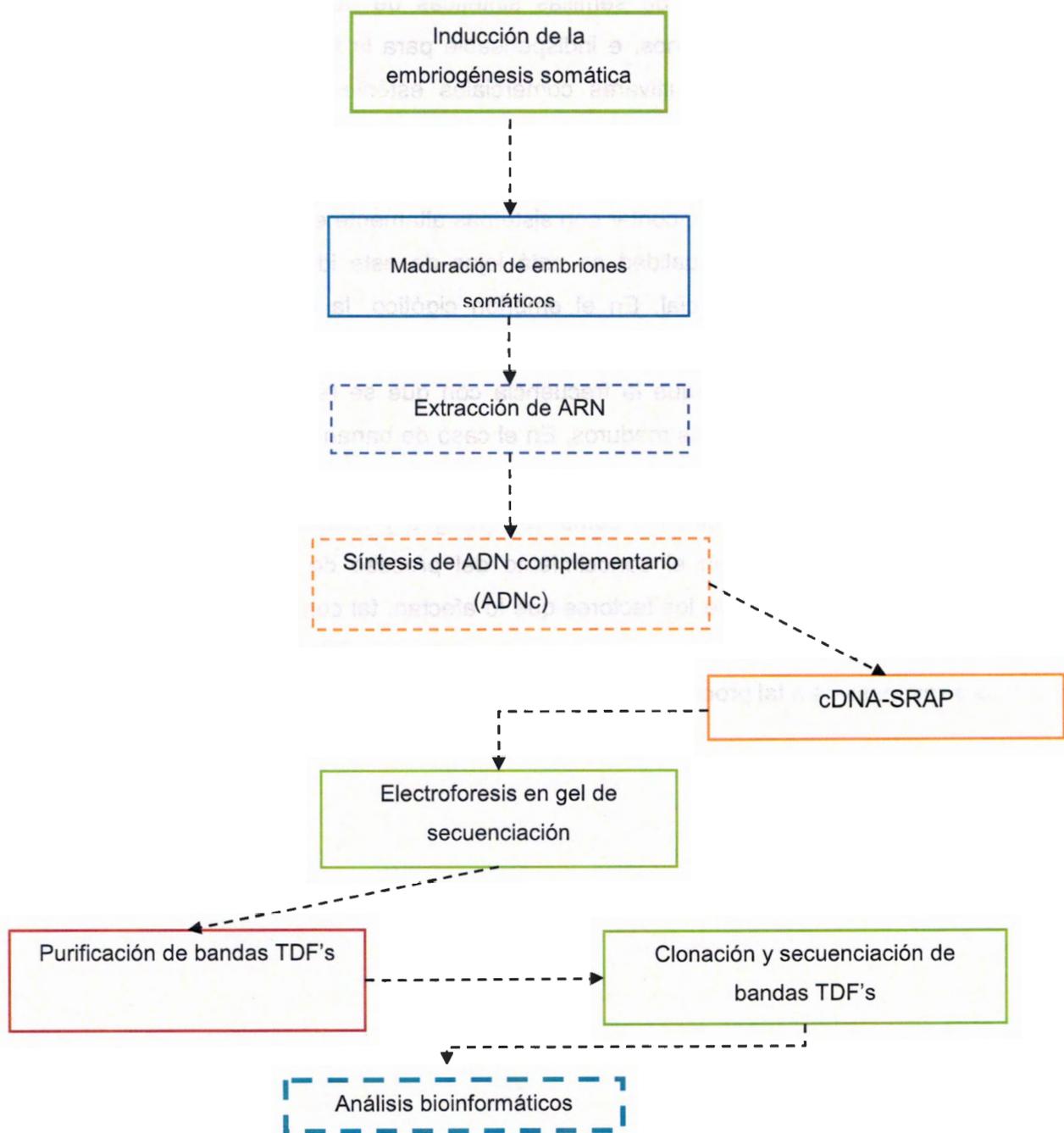


Figura 1.6. Estrategia experimental.

BIBLIOGRAFÍA

- Alemanno, A., Devic, M., Niemenak, N., Sanier, C., Guilleminot, J., Rio, M., Verdeil J-L y P. Montoro (2007). Characterization of leafy cotyledon1-like during embryogenesis in *Theobroma cacao* L. *Planta*, 227: 853-866.
- Ali, S., Kourosch, V., Hassan, B., Siamak K. y L. Charles (2010). Enhancement of maturation and germination of somatic embryos in Persian walnut (*Juglans regia* L.) using osmolites, hormones and cold treatments. *African Journal of Food Science*, 12: 735-743.
- Almodóvar, W., Díaz M. y A. Alvarado (2002). Enfermedades de plátano y guineo [online] Disponible <http://www.uprm.edu/agricultura/sea/clinica/PLAT&GUINEO2002.pdf> (071109). [Acceso 9 Junio 2011]
- Ammirato P. (1987). Organizational events during somatic embryogenesis. En: *Plant tissue and cellular culture*. (ed). *Plant cell and tissue culture*. pp. 57-81.
- Arosemena G. (2007). El comercio exterior de Ecuador, leyes y estadísticas del banano ecuatoriano, San José, 1: 1-20.
- Becraft P.W. (1998). Receptor kinases in plant development. *Trends Plant Science*, 3: 384-388.
- Choochai N. y P. Padrit (2007). Detection responsive gene in KDML, 105 rice (*Oryza sativa* L.) using cDNA-SRAP technique. *Natural Science*, 41:651-659.
- Christelova, P., Valarik, M., Hribova, E., De Langhe E. y J. Dolezel (2011). A multi gene sequence-based phylogeny of the Musaceae (banana) family. *BMC Evolutionay Biology*, 11: 103.
- Dodeman V.L., Ducreux G. y M. Kreis (1997). Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany*, 48: 1493-1509.
- FAO. (2010). Producción mundial de banano y plátanos [online]. Disponible en : http://faostat3.fao.org/home/index_es.html?locale=es.

- Fischerova, L., Vondrakova Z. y Vagner (2008). Expression of the gene encoding transcription factor PaVP1 differ in *Picea abies* embryogenic lines depending on their ability to develop somatic embryos. *Plant cell reports*, 27: 435-441.
- Fukimura T. y A. Komamine (1980). Mode of action of 2,4.D and zeatin on somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *Z pflanzenphysiol*, 99: 1-8.
- Garin, E., Bernier-Cardou, M., Isabel, N., Klimaszewska K. y A. Plourde (2000). Effects of sugars, amino acids, and culture technique on maturation of somatic embryos of *Pinus strobus* on medium with two gellan gum concentrations. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 62: 27-37.
- George, M., Hall M y G-J De Klerk (2008). *Plant propagation by tissue culture*. 3. ed, Springer. pp. 283-333.
- Gui, Q., Wang, J., Xu Y. y J. Wang (2009). Expression Changes of Duplicated Genes in Allotetraploids of *Brassica* Detected by SRAP-cDNA Technique, GENOMICS TRANSCRIPTOMICS, PROTEOMICS. *Molecular Biology*, 43: 1-7.
- Guinard, O., Arnaud E. y S. Sharrock (2002). Preliminary analysis of the *Musa* Germplasm Information System data for Southeast Asia using the Geographical Information System software DIVA-GIS. INIFAB.
- Harada J.J. (2001). Role of *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON genes in seed development. *Journal of Plant Physiology*, 158: 405-409.
- Hartmann, H., Kester, D., Davies F. y R. Geneve (2010). *Plant propagation: principles and practices*. 7ta ed. Prentice Hall. pp. 1-12.
- Hernandez A. (2001). Reaction of Banan and plantains cultivars to Black Sigatoka disease caused by *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Epidemiological components of the resistance. *Fitosanidad*, 5: 9-19.
- Ikeda, M., Umehara M. 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. 2006. Global conservation strategy for *Musa* (Banana and plantains) [online]. Disponible en: <http://www.croptrust.org/documents/web/Musa-Strategy-FINAL30Jan07.pdf>
- Itza, J. (2011). Polimorfismo de transcritos en la embriogénesis somática de *Musa* cv. AAA, mediante cDNA-SRAP. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México. 81 p.
- Jimenez V.M. (2001). Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones. *Revista Brasileña de Fisiología Vegetal*, 13: 196-223.
- Jong, A. J., Schmidt E.D.L y S.C. Vries (1993). Early events in higher plant embryogenesis. *Plant Molecular Biology*, 22: 367-377.
- Klimaszewska, K., Bernier-Cardou, M., Cyr DR. y BCS. Sutton (2000). Influence of gelling agents on culture medium gel strength, water availability, tissue water potential, and maturation response on embryogenic cultures of *Pinus strobus* L. *In vitro Cellular and Development Biology Plant*, 36:279-286.
- Komamine, A., Murata N. y K. Nomura (2005). Mechanisms of somatic embryogenesis in carrot suspension cultures, morphology, physiology, biochemistry, and molecular biology. *In vitro Cellular and Development Biology Plant*, 41: 6-10.
- Li, G., Gao, M., Yang B. y C.F. Quiros (2003). Gene for gene alignment between the *Brassica* and *Arabidopsis* genomes by direct transcriptome mapping. *Theoretical Applied Genetics*, 107:168-180.
- Li G. y C.F. Quiros (2001). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system base on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *Theoretical Applied Genetics*, 103: 455-461.
- Márquez-Martín, B., Sesmero, R., Quesada, M., Pliego-Alfaro F. y C. Sánchez-Romero (2011). Water relations in culture media influence maturation of avocado somatic embryos. *Journal of plant physiology*, 168: 2028-2034.
-

- Merkele, S., Parrott W. y B. Flinn (1995). Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. En: *In vitro embryogenesis in plants*. (ed). Kluwer Academic Publiser, Dordrecht. pp. 155-203.
- Mhaske, V., Chengalrayan K. y S. Hazra (1998). Influence of osmotica and abscisic on triglyceride accumulation in peanut somatic embryos. *Plant Cell Reports*, 17:742-746.
- Nakamura, T., Taniguchi T. y E. Maeda (1992). Studies on somatic embryogenesis of coffee by scanning electron microscope. *Japanese Journal of Crop*, 61: 476-486.
- Namasivayam P. (2007). Acquisition of embryogenesis competence during somatic embryogenesis. *Plant Cell and Tissue Culture*, 90: 1-8.
- Nwakanma, D. C., Pillay M. y B.E. Okoli (2003). Sectional relationships in the genus *Musa* L. inferred from the PCR-RFLP of organelle DNA sequences. *Theoretical and Applied Genetics*, 107: 850-856.
- Oliverira-Santos, M., Romano, E., Yotoko, K., Tinoco, M., Dias B. y F. Aragao (2005). Characterisation of the cacao somatic embryogenesis receptor-like kinase (SERK) gene expressed during somatic embryogenesis. *Plant science*, 168:723-729.
- Ortiz, R., López, A., Ponchner S. y A. Segura (1999). *El cultivo del banano*. EUNED, 186.
- Park S. y Harada J.J. (2008). *Arabidopsis* embryogenesis. *Methods in Molecular Biology*, 427: 3-16.
- Péran-Quesada, R., Sánchez-Romero, C., Barceló-Muñoz A. y F. Pliego-Alfaro (2004). Factors affecting maturation of avocado somatic embryos. *Scientia Horticulturae*, 102: 61-73
- Pillay, M., Ogundiwin, E., Tenkouano A. y J. Dolezel (2006). Ploidy and genome composition of *Musa* germplasm at the International Institute of Tropical Agriculture (IITA). *African Journal of Biotechnology*, 13: 1224-1232.

-
- Prasanna-Divakaran S. y N.A. Sankarankutty (2012). Somatic embryogenesis from bract cultures in diploid *Musa acuminata* cultivars from India. *Scientia Horticulturae*, 131:99-102
- Quiroz-Figueroa, F. R., Rojas-Herrera, R., Galaz-Avalos R.M. y V.M. Loyola-Vargas (2006). Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell and Tissue Organ Culture*, 86: 285-301.
- Reinert J. (1959). Untersuchungen u"ber die Morphogenese an Gewebekulturen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 71: 15.
- Robinson J. (1996). *Banana and plantains*. CAB international, 103-110.
- Santos-Mendoza, M., Dubreucq B., Baud S., Parcy, F., Caboche M. y L. Lepiniec (2008). Deciphering gene regulatory Networks that control seed development and maturation in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 54: 608–620
- Schmidt, E. D. L., Toonen M.A.J. y S.C. de Vries (1997). A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cell competent to form embryos. *Development*, 124: 2049-2062.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera) (2011). Producción nacional en México [online]. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/>
- Soto M. (1992). *Banano, cultivo y comercialización*. 2da ed. Litografía e imprenta Lil. Tibas. Pp. 627
- Stasolla, C., Katahira, R., Thorpe TA. y H. Ashihara (2003). Purine and pyrimidine nucleotide metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology*, 160: 1271-1295
- Strosse, H., Schoofs, H., Panis, B., André, E., Reyniers K. y R. Swennen (2006). Development of embryogenic cell suspensions from shoot meristematic tissue in bananas and plantains (*Musa* spp.). *Plant Science*, 170: 104-112.
- Suprassana P.B. (2006). Differential gene expression during somatic embryogenesis.

- Somatic embryogenesis. En: Plant Cell Monographs. (ed). Springer-Verlag. pp. 305-320.
- Tang W. y R.J. Newton (2005). Genome-Wide expression analysis of genes involved in somatic embryogenesis. En: Plant Cell Monographs. (ed). Springer-Verlag. pp. 69-83.
- Thomas W. (1993). Gene expression during plant embryogenesis and germination: An overview. Plant Cell, 5: 1401-1410.
- Tisserat B.E.E. y T. Murashige (1979). Somatic embryogenesis in angiosperms. Horticultural Reviews, 1: 1-78.
- Tree of Life Web Project. (2010). [online]. Disponible en: <http://tolweb.org/Dothideales/29321/2007.03.19> (101109).
- Vahdati, K., Bayat, S., Ebrahimzadeh, H., Jariteh M. y M. Mirmasoumi (2008). Effect of exogenous ABA on somatic embryo maturation and germination in Persian walnut (*Juglans regia* L.). Plant Cell Tissue and Organ Culture, 93:163-171.
- Valerio, R., Lindorf H. y E. García (2002). Anatomía foliar comparada de ocho cultivares de banano con relación a la resistencia o susceptibilidad a la Sigatoka (amarilla y negra). Agronomía tropical, 4: 507-521.
- West M.A.L. y J.J. Harada (1993). Embryogenesis in higher plants: An overview. The Plant Cell, 5: 1361-1369.
- Wong, C., Kiew, R., Argent, G., Ohn, S., Lee K.S. y Y.Y. Gan (2002). Assessment of the validity of the section in *Musa* (musaceae) using AFLP. Annals of Botany, 90:231-238.
- Xu, Y., Yang, F., Tian, X., Zhang, W., Wang X. y G. Ma (2011). Different patterns of transcriptomic responses to high temperature between diploid and tetraploid *Disocorea zingiberensis*. African Journal of Biotechnology, 44:8847-8854.
- Yang X. y X. Zhang (2010). Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. Critical

Reviews in Plant Science, 29: 36-57.

- Yazawa, K., Takahata K. y H. Kamada (2004). Isolation of the gene encoding carrot leafy cotyledon1 and expression analysis during somatic and zygotic embryogenesis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42: 215–223.
- Youssef, M., James, A., Rivera-Madrid, R., Ortiz, R. y RM. Escobedo-GM (2010). Musa genetic diversity revealed by SRAP and AFLP. *Molecular Biotechnology*, 47: 189-199.
- Zhang, C., Li Q. y L. Kong (2007). Induction, development and maturation of somatic embryos in Bunge's pine (*Pinus bungeana* Zucc. ex Endl). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 91: 273-280.
- Zhang, S., Wong, L., Meng L. y PG. Lemaux (2002). Similarity of expression patterns of Knotted1 and ZmLEC1 during somatic and zygotic embryogenesis in maize (*Zea mays L.*). *Planta*, 215: 191–194.
- Zimmerman J.L. (1993). Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants, *Plant Cell* 5: 1411-1423.

CAPÍTULO II

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE *MUSA*

2.1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo se describirán los procedimientos realizados para la inducción de la embriogénesis somática en *Musa*, el experimento de maduración de embriones somáticos a partir de suspensiones embriogénicas

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Colecta del material biológico

Se colectaron inflorescencias masculinas inmaduras (2 semanas de edad después de la antesis) según Youssef (2011) de dos cultivares los genotipos Dátil (AA) y Enano gigante (AAA) clon Francés de la Colección de Germoplasma de Musáceas del CICY, ubicada en la Estación Experimental del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, INIFAP-Uxmal (20° 24' 40.10" y 89° 45' 24.90"), con una altitud de 8.0 metros sobre el nivel del mar (msnm).

El procesamiento que se siguió con las muestras de inflorescencias colectadas fue el siguiente: primero se lavaron con agua destilada estéril y el exceso de agua fue retirado con toallas absorbentes, posteriormente se redujeron en tamaño hasta 6 y 8 cm. Las inflorescencias reducidas fueron esterilizadas con etanol al 80% durante 20 minutos. Posteriormente se redujeron las inflorescencias a un tamaño de 3 cm de largo x 1cm de ancho, mediante la eliminación sucesiva de las brácteas con ayuda del estereoscopio y en condiciones de asepsia. Las manos con flores inmaduras fueron aisladas de la posición 12 a la 8, siendo la posición 0 el meristemo apical de la inflorescencia. Las 5 manos aisladas de cada inflorescencia fueron depositadas sobre medio de cultivo de inducción semi-sólido MA1 (Anexo 1), contenido en frascos de vidrio. La composición del medio es la siguiente: sales y vitaminas MS (Murashige and Skoog, 1962), suplementando con 5.71 μM de IAA, 18 μM de 2, 4-D, 5.4 μM de NAA, 4.1 μM de biotina, 87 mM de sacarosa, el pH del medio se ajustó a 5.7, se aforó y añadió 2 g/L del gelificante (Gelrite). El medio se dosificó a razón de 25 mL por frasco cuya capacidad es de 100 mL. Los frascos se cubrieron con tapas de plástico y fueron esterilizados en autoclave a 120°C por 20 min.

Las condiciones de cultivo fueron: $27 \pm 2^\circ\text{C}$ en completa oscuridad durante 3 meses. Los cultivos fueron examinados 2 veces por semana para observar cambios en los explantes y visualizar la formación de callos durante el cultivo.

2.2.2. Proliferación de callo embriogénico

Para la proliferación de callo embriogénico, primero se partió de la evaluación del callo formado a los tres meses de haber inducido los explantes. Una vez evaluados los materiales y reconocidos los diferentes tipos de callo, se procedió a seleccionar solo callo embriogénico (CE) de color blanco-cremoso con expresión de pequeños embriones somáticos para su proliferación. Cabe señalar que durante esta etapa de la investigación se introdujo un nuevo genotipo para la proliferación de callo embriogénico, el genotipo Manzano (AAB), cabe mencionar que en el grupo de la Dra Escobedo ya se contaba con la línea embriogénica en proliferación, misma que partió de explantes procedentes de la proliferación de meristemos florales (comunicación personal Dra. Escobedo).

Los CE se proliferaron en medio M1/30 y M1/60 (Anexo 1) basado en Navarro *et al* (1997), el cual contiene la $\frac{1}{2}$ de la fuerza iónica de las sales MS, suplementado con vitaminas de Morel (Morel *et al.*, 1950), $4.5 \mu\text{M}$ de 2-4 D, 200 mg/L de KH_2PO_4 y 174 mM de sacarosa. El pH del medio se ajustó a 5.8, se aforó y añadió 2 g/L del gelificante (Gelrite). Los callos embriogénicos fueron transferidos a frascos de vidrio con 25 mL del medio. El medio de cultivo fue renovado aproximadamente cada 30 días. Las condiciones de cultivo fueron: $27 \pm 2^\circ\text{C}$ en completa oscuridad.

2.2.3. Establecimiento de suspensiones celulares

Para el establecimiento de las suspensiones celulares embriogénicas (SCE) se partió de CE de los genotipos Dátil (AA) y Manzano (AAB), esto debido a que no se conto con suficiente material embriogénico del genotipo Enano gigante francés (AAA). El establecimiento de suspensiones inició con su inducción, para lo cual se pesó 1 g de CE y se transfirió a un matraz erlemeyer de 25 mL , el cual contenía 10 mL de medio M2 (Anexo 1) (Cote *et al.*, 1996), vitaminas y minerales MS, suplementado con 87.64 mM de sacarosa, $4.52 \mu\text{M}$ de 2-4 D, $4.1 \mu\text{M}$ de biotina, $680 \mu\text{M}$ de glutamina y, 100 mg/L de extracto de malta. El pH del medio se ajustó a 5.3. Las suspensiones se agitaron a 90 rpm a 27°C en oscuridad, y el medio se renovó cada semana durante un mes. Posteriormente

las células se transfirieron a matraces de 125 mL que contiene 20 mL de medio M2, con renovación del medio cada 15 días. Luego de haber renovado 3 veces el medio, las células en suspensión se transfirieron a un matraz de 250 mL que contiene 50 mL de medio, el cual fue renovado cada 15 días. Posteriormente las suspensiones celulares son filtradas, renovando el medio cada semana.

2.2.4. Diseño experimental para la maduración de embriones somáticos

Para los experimentos de maduración del embrión somático, se probaron cuatro factores y sus respectivos niveles, que son: i) 2 medios de cultivo MM1 y MM2 (Anexo 1) que difieren en que el medio MM2 contiene extracto de malta; ii) 2 concentraciones de sacarosa , 87.64 y 131.2 mM; iii) 4 concentraciones, 0.2, 0.3 0.4 y 0.6 % del gelificante (Gelrite), y iv) 2 condiciones de soporte de la suspensión celular sobre el medio de cultivo con y sin papel filtro Whattman No. 1.

A partir de SCE del genotipo Dátil (AA) y Manzano (AAB), se realizaron dos experimentos independientes por genotipo, cada uno con 5 réplicas por tratamiento como se muestra en el Cuadro 2.1-2.2. Cada tratamiento con sus respectivas réplicas consistió de unidades experimentales (UE) representadas por cajas petri divididas a la mitad, cada mitad representa una UE, por lo que a cada UE se inoculó con suspensión embriogénica fina (Figura 2.1). Para ello previamente la suspensión embriogénica de 2 meses fue filtrada con malla de ~ 250 μ m, y una vez transcurridos 15 días posteriores a la filtración, las suspensiones celulares se ajustan a una densidad de 3 % del paquete de volumen celular (PVC) para la inoculación de cada UE para los diferentes tratamientos.

Por lo cual cada experimento constó de 160 UE (Figura 2.1). A cada UE (división de una caja Petri) se le añadió 12.5 mL de medio (25 mL por caja), además, una vez gelificado el medio, una mitad de cada caja fue cubierta con papel filtro (Whatman No. 1). A continuación cada UE se inoculo con 250 μ L de la suspensión celular embriogénica con una densidad de 3% PVC a cada división (500 μ L por caja) y se esparció homogéneamente en la superficie del medio de cultivo o del papel filtro. Las condiciones de cultivo fueron en oscuridad a 27 ± 2 °C por 30 y 45 días.

La varianza de los resultados (análisis de varianza, ANOVA) se analizó con el paquete estadístico SAS 9.0 (SAS Institute Inc. Cary, NC 27513 EE.UU.). Para los experimentos

se empleo un diseño completamente al azar y los resultados se sometieron a un análisis factorial (ANOVA $p \leq 0.01$). Las comparaciones múltiples de medias se desarrollaron en base a la prueba de Tukey y se calculo al nivel de 1% de probabilidad.

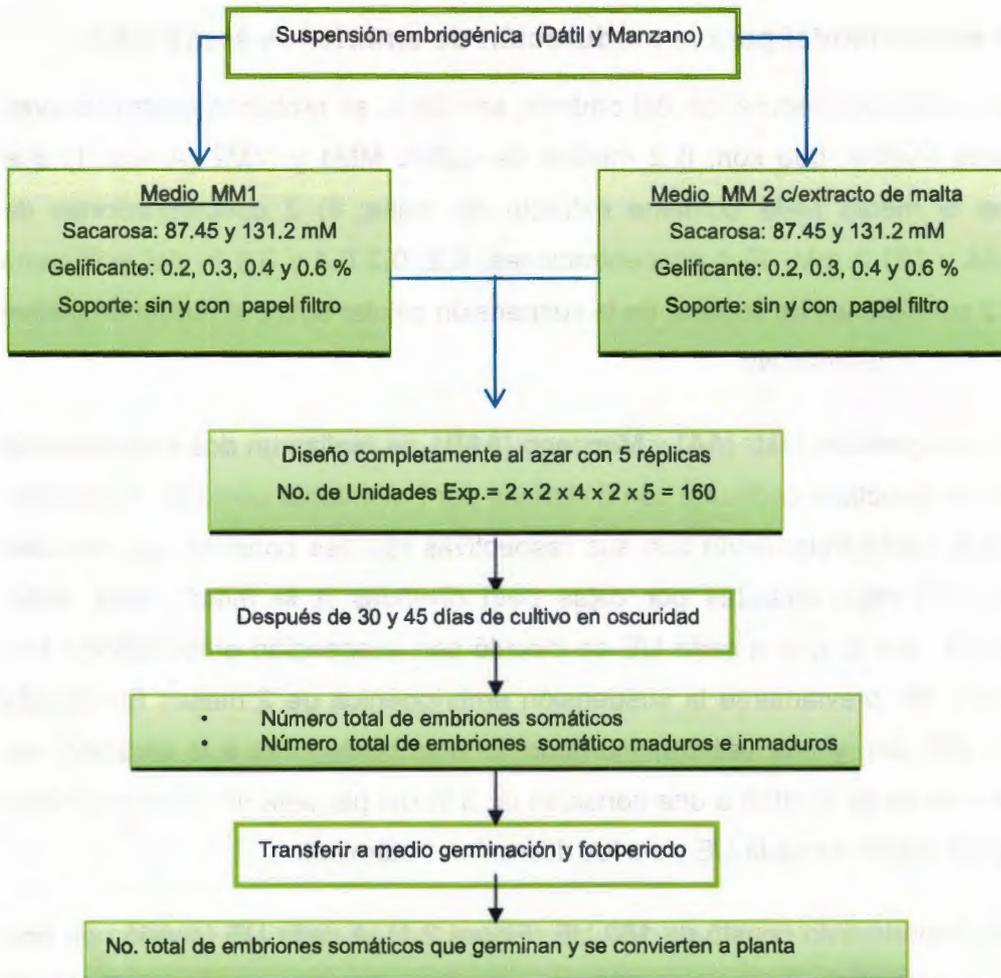


Figura 2.1. Diagrama de diseño experimental para el desarrollo de la maduración de embriones somáticos de dos genotipos de plátano.

Cuadro 2.1. Tratamientos de maduración para el genotipo Dátil.

Tratamientos	Gelificante (% p/v)	Sacarosa (mM)	Extracto de malta	Soporte
T1-D	0.20	87.45	-	s/f
T2-D	0.20	87.45	x	s/f
T3-D	0.20	87.45	-	c/f
T4-D	0.20	87.45	x	c/f
T5-D	0.20	131.2	-	s/f
T6-D	0.20	131.2	x	s/f
T7-D	0.20	131.2	-	c/f
T8-D	0.20	131.2	x	c/f
T9-D	0.30	87.45	-	s/f
T10-D	0.30	87.45	x	s/f
T11-D	0.30	87.45	-	c/f
T12-D	0.30	87.45	x	c/f
T13-D	0.30	131.2	-	s/f
T14-D	0.30	131.2	x	s/f
T15-D	0.30	131.2	-	c/f
T16-D	0.30	131.2	x	c/f
T17-D	0.40	87.45	-	s/f
T18-D	0.40	87.45	x	s/f
T19-D	0.40	87.45	-	c/f
T20-D	0.40	87.45	x	c/f
T21-D	0.40	131.2	-	s/f
T22-D	0.40	131.2	x	s/f
T23-D	0.40	131.2	-	c/f
T24-D	0.40	131.2	x	c/f
T25-D	0.60	87.45	-	s/f
T26-D	0.60	87.45	x	s/f
T27-D	0.60	131.2	-	s/f
T28-D	0.60	131.2	x	s/f

Cuadro 2.2. Tratamientos de maduración para el genotipo Manzano.

Tratamientos	Gelificante (% p/v)	Sacarosa (mM)	Extracto de malta	Soporte
T1-M	0.30	87.45	-	s/f
T2-M	0.30	87.45	×	s/f
T3-M	0.30	87.45	-	c/f
T4-M	0.30	87.45	×	c/f
T5-M	0.30	131.2	-	s/f
T6-M	0.30	131.2	×	s/f
T7-M	0.30	131.2	-	c/f
T8-M	0.30	131.2	×	c/f

2.2.5 Germinación de embriones somáticos

La germinación de los embriones somáticos se llevó a cabo, a los 30 y 45 días posteriores a su inoculación en medio de maduración. Los embriones se seleccionaron tomando en consideración la coloración blanco-opaco para embriones maduros y la presencia visible de la hendidura cotiledonaria en estos (Burgos, 2010). Para cada tratamiento se transfirió 8 embriones por UE en réplicas de 5, cada UE consistió de un vial de cristal conteniendo 25 ml de medio semisólido MG (Anexo 1), el medio contiene sales y vitaminas, MS suplementado con 87 mM de sacarosa y 200 mg/L de KH_2PO_4 . El pH del medio se ajustó a 5.8 y se agregó 2.5 g/L de gelificante (gelrite). Las condiciones de cultivo fueron en oscuridad a 27 ± 2 °C durante 8 días y posteriormente se transfirieron a fotoperiodo (16h:8h, luz: oscuridad).

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Inducción de embriogénesis somática a partir de flores masculinas inmaduras

La respuesta *in vitro* del explante (flores masculinas inmaduras) a la inducción para la formación de callo embriogénico se valoró semanalmente registrando el número de explantes que presentaron evidencias de des-diferenciación por la formación de callos.

La inducción de embriogénesis a partir de flores masculinas inmaduras tiene una duración de entre 3 a 5 meses. Después de 3 meses de inducción y durante las dos siguientes resiembras mensuales, se observó la formación de cuatro diferentes tipos de callo, que a saber son: callo embriogénico de color blanco-cremoso, callo amarillo con potencial embriogénico ya que sobre de este tipo de callo se diferencian numerosos embriones globulares, callo blanco compacto y callo translúcido hídrico, y la oxidación del tejido del explante que no respondió (Figura 2.2 y 2.3). El tipo y frecuencia de formación de cada tipo de callo varió según el genotipo.

En el genotipo Dátil se observó que el callo consta de dos partes: la inferior en contacto con el medio de cultivo presentó un color amarillo tenue con evidencias de ligera fenolización; y en la superior el callo es de color amarillo intenso, donde se apreció la presencia de diminutos embriones somáticos, los cuales en su mayoría estaban en estadio globular (Figura 2.2).

En el caso del cv. Enano Gigante el callo constó de tres partes: una parte de color amarillo en la parte inferior y en la parte media una zona más friable con células poco unidas entre sí, las células mostraron tendencia a la oxidación (necrosis). Finalmente en la parte superior, el callo es blanco-cremoso con numerosos embriones globulares, considerado callo embriogénico ideal para su proliferación y establecimiento de suspensiones celulares. Se observó dos tipos de callos amarillos, uno con coloración amarillo fuerte y otro con coloración amarillo tenue, este último puede dar una respuesta a la formación de callo embriogénico si se mantiene la presión de auxina, por lo que es vital la correcta manipulación de este callo durante el proceso de proliferación.



Figura 2.2. Callos obtenidos cuatro meses después de inducir los explantes de flores masculinas inmaduras de Dátil (AA) con el medio MA1.

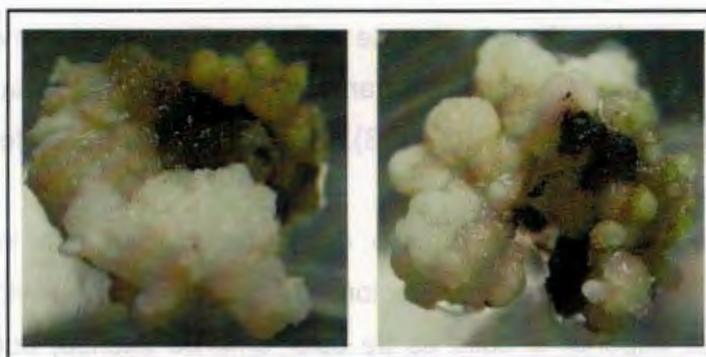


Figura 2.3. Callos obtenidos cuatro meses después de inducir los explantes de flores masculinas inmaduras Enano Gigante Francés (AAA) con el medio MA1.

La respuesta a formación de los diferentes tipos de callos para el cv Dátil fue del 16 % de callo embriogénico, 52 % de callo amarillo, mientras que la formación de callo traslúcido fue del 2 %. En este genotipo no se observó la formación de callo blanco compacto. Sin embargo el 30 % de los explantes no respondieron al tratamiento de inducción de embriogénesis somática (Figura 2.4).

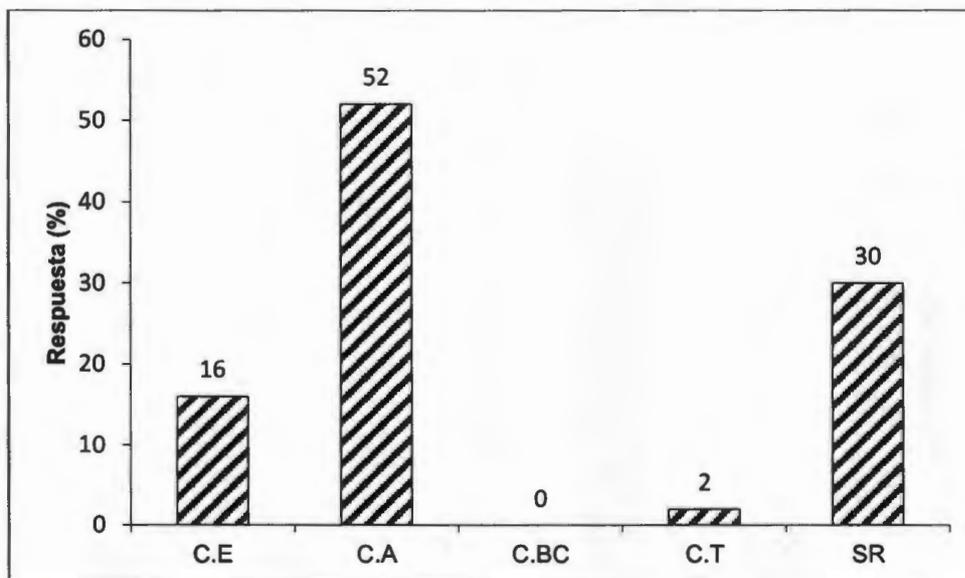


Figura 2.4. Formación de diferentes tipos de callo como respuesta de las flores masculinas inmaduras del cv. Dátil a la inducción en medio con auxinas después de 4 meses. C.E= callo embriogénico, C.A= callo amarillo, C.BC= callo blanco-compacto, C.T= callo traslúcido, SR= sin respuesta.

En el caso del cv Enano gigante la respuesta a formación de callo embriogénico fue del 10.9 %, y la de callo amarillo fue del 71.82 %. Con las resiembras sobre el callo amarillo se puede observar la formación de callo embriogénico, por lo que se resembró tanto el callo embriogénico como el callo amarillo. En este genotipo se presentó la formación de callo blanco compacto (4.55 %) y callo traslúcido (2.73 %), además de que un 10% de los explantes no presento respuesta a la inducción, estos se oxidaron con el tiempo de cultivo (Figura 2.5).

En general al comparar la respuesta a la inducción de la embriogénesis de ambos genotipos, AA cv. Dátil vs AAA cv Enano gigante, se observó menor oxidación de los explantes del segundo, la formación de callo embriogénico fue mayor en Dátil (16%) que en Enano gigante (10.9%). Sin embargo, es importante señalar que durante el proceso de inducción algunos de los explantes de Dátil se oxidaron y posteriormente en la parte superior se observó la formación de los diferentes tipos de callos, en contraste Enano gigante se observó menos oxidación de los explantes.

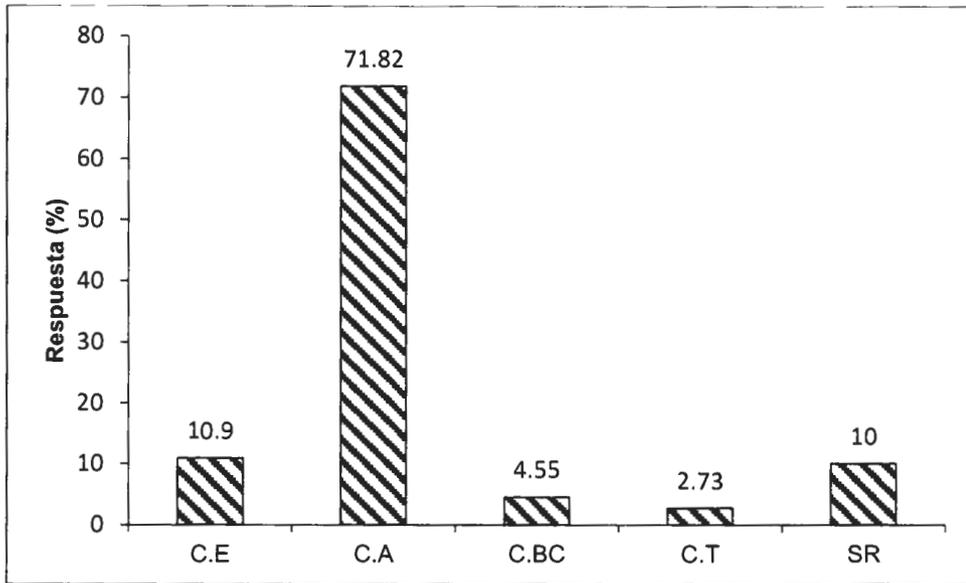


Figura 2.5. Formación de diferentes tipos de callo como respuesta de las flores masculinas inmaduras del cv. Enano gigante a la inducción en medio con auxinas después de 4 meses. C.E= callo embriogénico, C.A= callo amarillo, C.BC= callo blanco-compacto, C.T= callo traslúcido, SR= sin respuesta.

Cuando se valoró la respuesta embriogénica de las flores inmaduras en función de la posición 8 a la 12 de las manos en la inflorescencia masculina de una semana de edad, e inducidas durante el periodo de septiembre-octubre del 2011, se observó que para el genotipo AA cv Dátil la mejor respuesta a formación de callo embriogénico fue para las flores de las manos 8 y 9 con un 30 %, contrariamente, las manos 10 y 11 presentaron solo un 10 % de respuesta. Mientras que las de manos en posición 12, no mostraron formación de callo embriogénico, a su vez se observó que el 60 % de las flores inmaduras para la posición 12 se oxidaron (Figura 2.6).

La formación de callo amarillo mostró altos porcentajes que van del 50 % al 70 %, sin embargo este callo amarillo si se manipula adecuadamente puede dar la formación de callo embriogénico. De tal manera que se seleccionó ambos callos, el embriogénico y el amarillo para su proliferación. Las manitas de flores masculinas inmaduras que presentaron la mayor respuesta a oxidación de los explantes al final del proceso de inducción son las manos 11 y 12 con un porcentaje del 40 %. Esto es algo que se observó desde los primeros días de la inducción del cv Dátil, que la mayoría de explantes se

oxidan y luego hay la formación de los diferentes tipos de callos.

En el genotipo cv Dátil las manitas que responden mejor al proceso de inducción para la formación de callo embriogénico son las manos 8 y 9 (Figura 2.6). Sin embargo, en este experimento no se indujeron manitas de las posiciones inferiores, por ejemplo, 6 y 7.

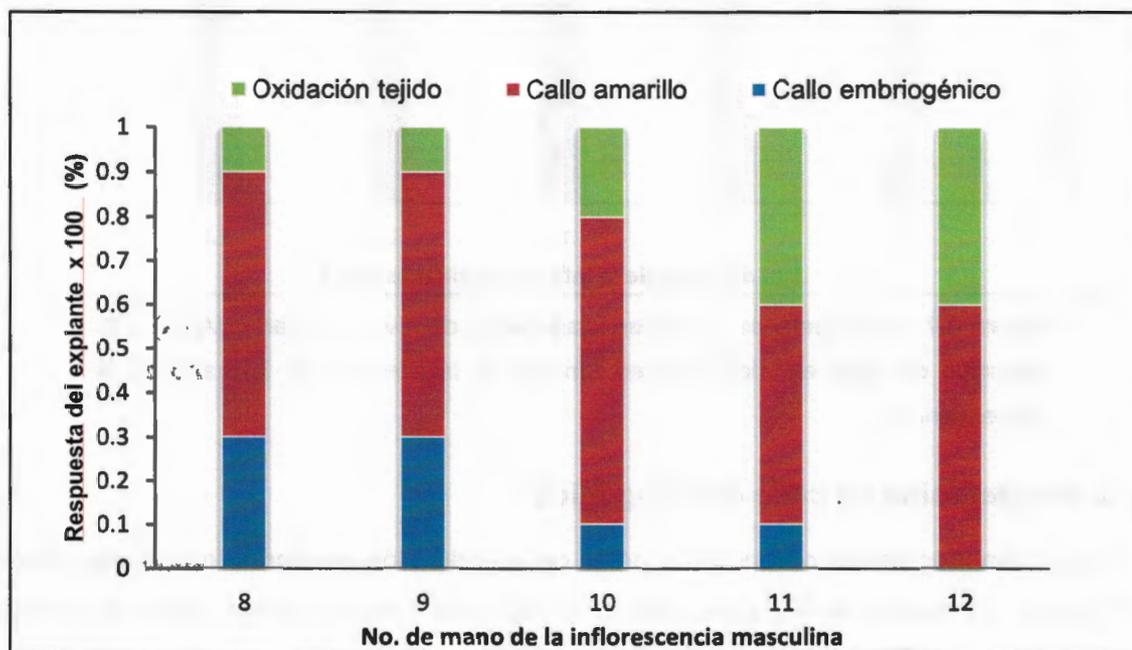


Figura 2.6. Respuesta de las flores masculinas del cv. Dátil (AA) a la inducción de callo embriogénico en función de la posición de la mano en la inflorescencia.

En el caso de Enano gigante las manos 8, 10 y 12, fueron las más responsivas a la formación de callo embriogénico, con una respuesta del 16%, 20% y 12%, respectivamente; en tanto que las manos 9 y 11 su respuesta fue menor (Figura 2.7). A continuación se observó una elevada formación de callo amarillo que va de 56 % a 80 %. En cuanto a la oxidación de los explantes se observó que este tiene menor incidencia en comparación con el genotipo Dátil, compárense las figuras 2.6 y 2.7, respectivamente.

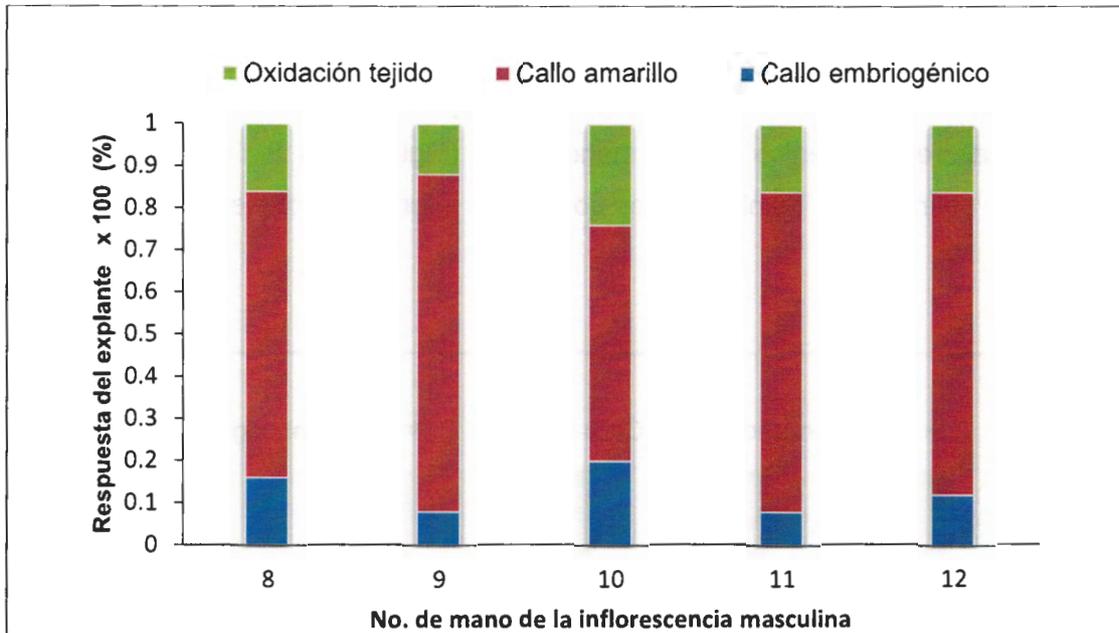


Figura 2.7. Respuesta de las flores masculinas del cv. E. Gigante (AAA) a la inducción de callo embriogénico en función de la posición de la mano de la inflorescencia.

2.3.2. Proliferación de callo embriogénico

Los callos embriogénicos obtenidos a partir de la inducción de flores inmaduras, fueron proliferados en medios M1/30 para dátil y M1/60 para Enano gigante. Para el genotipo Dátil, los callos proliferados presentaron un color amarillo en la parte inferior, pero en la parte superior se observó embriones somáticos en un estadio globular, el cual indica la expresión de embriones (CEE) (Figura 2.8). Los callos con expresión de embriones fueron resebrados cada mes, para lo cual se dividieron en dos partes y cada parte se sembró en un vial de cristal con medio nuevo. Este procedimiento permitió incrementar la masa embriogénica y evitar la oxidación de este, además de que se empleó para retirar los embriones maduros que se van diferenciando sobre la parte superior del callo, los cuales mostraron un color blanco-opaco y una consistencia dura. Cabe mencionar que los callos de Dátil se oxidan con facilidad, si el medio contiene un exceso de agua se observó un oscurecimiento de la parte inferior de los callos a la semana de la resiembra, por lo que se retiró el exceso de agua del medio, esto se realizó invirtiendo el vial de cristal durante aproximadamente 15 segundos para retirar este exceso de agua. .

En el caso del genotipo Enano gigante clon francés, los callos obtenidos fueron de un

color blanco-cremoso, amarillo, así como una parte necrosada luego del proceso de inducción, el callo embriogénico de color blanco-cremoso se eligió para proliferar (Figura 2.9). Sin embargo se observó que posterior a 2 o 3 resiembras, algunos callos embriogénicos blancos-cremosos se tornaron blancos y compactos, por lo que fueron retirados del medio y únicamente se proliferaron los callos de tipo blanco-cremoso. Es importante señalar que la proliferación del callo de Enano Gigante es un poco lento, esto se observó por el crecimiento de la masa embriogénica, cada mes que se resembró había un pequeño crecimiento en la masa embriogénica, a comparación del genotipo dátil que al mes la masa embriogénica había crecido casi un 50 % aproximadamente.

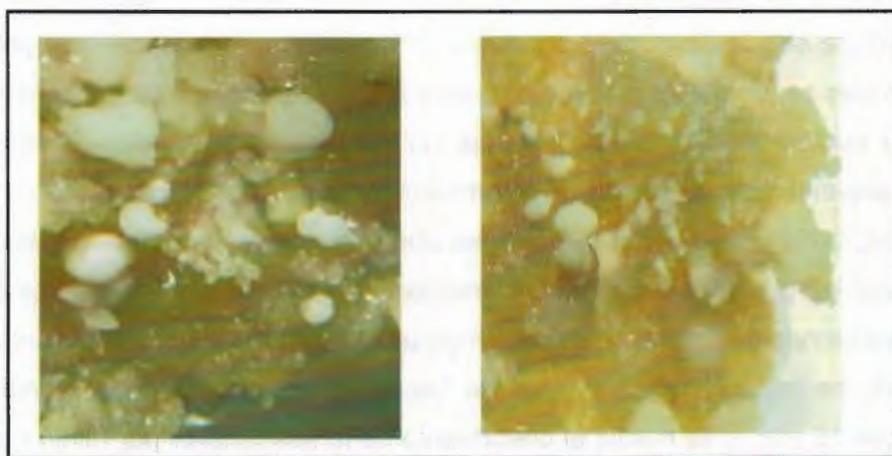


Figura 2.8. Callos embriogénicos en proliferación, Dátil (AA).

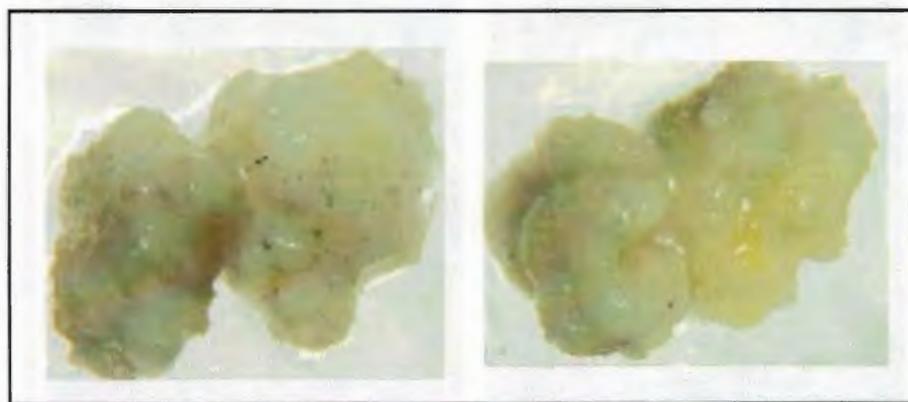


Figura 2.9. Callos embriogénicos de Enano Gigante Francés (AAA).

2.3.3. Inducción de suspensiones celulares

Debido a que la proliferación del callo embriogénico de Enano gigante fue muy lenta y no se logró obtener suficiente masa de callo embriogénico no fue posible iniciar suspensiones celulares de este genotipo. Por ello, se utilizó una línea embriogénica del cultivar Manzano (AAB) mantenida en el laboratorio, para paralelamente con la línea de genotipo Dátil (AA) iniciar las suspensiones embriogénicas.

La inducción de las suspensiones inició con la disgregación en el medio de cultivo de los callos embriogénicos de ambos genotipos. La oxidación de las suspensiones, se evitó mediante resiembras semanales, principalmente en la línea de Dátil. Después de la tercera resiembra se observaron agregados embriogénicos y pro-embriones globulares en las suspensiones celulares. Al mes de inducidas las suspensiones, se observó arenilla en el fondo del matraz (Figura 2.10), esto es un parámetro que indica la formación de numerosos pro-embriones globulares y embriones somáticos tipo corazón y escutelar (Strosse *et al.*, 2003), así mismo también se observó agregados heterogéneos, con una forma irregular pero conformados por numerosas células pequeñas en activa división, para la suspensiones de Dátil y Manzano (Figura 2.11). Para valorar el crecimiento de las suspensiones, se realizó transferencias de las suspensiones a tubos Falcón, se dejó sedimentar por 15 min, y se midió el crecimiento de la suspensión por midió del aumento del paquete de volumen celular (PVC).

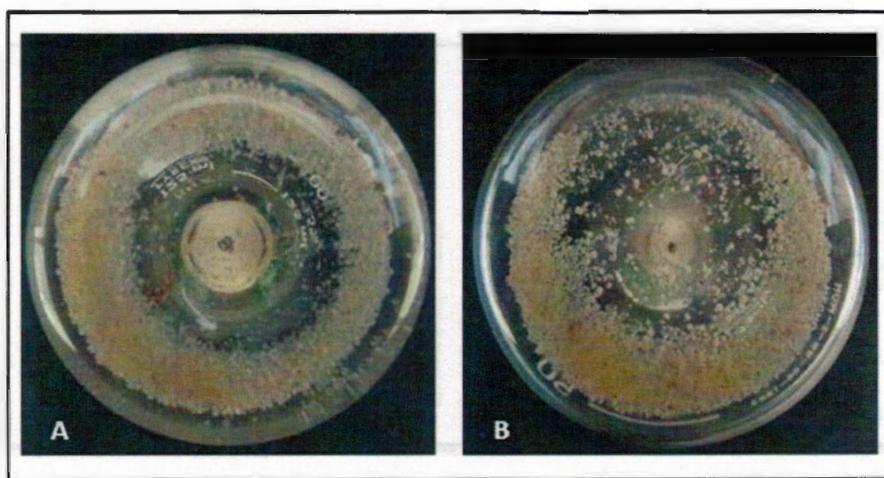


Figura 2.10. Suspensiones celulares A) Dátil (AA) y Manzano (AAB).

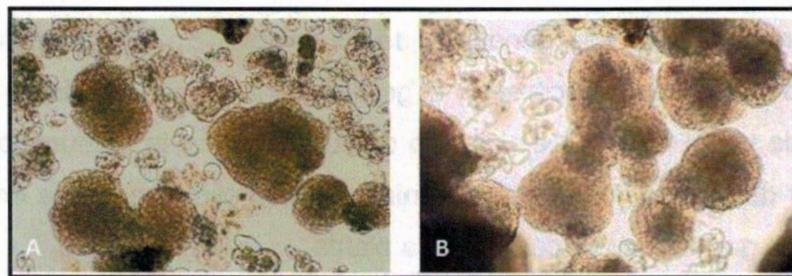


Figura 2.11. Suspensiones celulares mostrando embriones globulares y tipo corazón observadas con ayuda del microscopio invertido. A) Dátil, B) Manzano.

El experimento de maduración de los embriones somáticos, inició con la filtración (15 días antes de su maduración), de las suspensiones embriogénicas de Dátil y Manzano, a través de una malla de nylon ~200-250 micras. Se realizó para separar los embriones de mayor grado de diferenciación de los agregados embriogénicos de menor tamaño. De tal manera, que permite una mejor sincronización del cultivo y de los embriones (Ibaraki *et al.*, 2001). Otro factor de gran importancia es la densidad de la suspensión celular o PVC del inoculo, ya que estudios indican que una densidad elevada en la fase de maduración conduce a una proliferación excesiva del cultivo, limitando los nutrientes y el espacio para el correcto desarrollo de los embriones somáticos (Montalban *et al.*, 2010); por tal razón se seleccionó un PVC del 3% para el experimento de maduración. 2.3.4. Experimento de maduración.

Las evidencias con semillas verdaderas de *Musa acuminata ssp. malaccensis* (AA, variedad local Selengor), indican que el embrión cigoto globular de 65 días post-antesis (dpa) posee un contenido relativo de agua del 64%, y conforme crece y se desarrolla, el contenido relativo de agua disminuye hasta un 30% a los 105 dpa. Concomitante a este cambio, también se observa el incremento en peso seco de la semilla, el cual aumenta hasta casi 5 veces el peso inicial a los 105 dpa (datos por publicar por el grupo de la Dra. Escobedo). Lo anterior, sugiere que la desecación del embrión cigótico acompañada del incremento de peso, son eventos de suma importancia y que también pudiesen ocurrir previo a la maduración del embrión somático *in vitro*.

Las evidencias mencionadas del embrión cigótico, sugirieron el planteamiento del experimento de maduración de embrión somático, y con ello la selección de los factores que debían ser considerados para inducir el desarrollo y su maduración más apropiada

del embrión somático para dos genotipos de *Musa* spp. En este sentido, se propuso evaluar el efecto que tienen la sacarosa y el gelificante, así como la adición de extracto de malta y el uso de papel filtro sobre el medio de cultivo, sobre la maduración del embrión somático a partir de suspensiones embriogénicas, y esto como se refleja en el porcentaje de embriones que germinan y se convierten a planta.

2.3.4. Experimento de maduración de embriones somáticos

Alícuotas de 250µl de suspensiones celulares embriogénicas (2% o 3% del PVC) de los cultivares Dátil (AA) y Manzano (AAB), de 15 días de edad posteriores a su filtración, y de 8 días después de su resiembra, se inoculó en medios de cultivos MM1 y MM2, sobre el medio de cultivo con y sin papel filtro, el cual sirvió de soporte para las suspensiones celulares; se mantuvieron bajo dichas condiciones durante los primeros 15-20 días de cultivo, posteriormente se observó el desarrollo de los embriones somáticos (Figura 2.12).

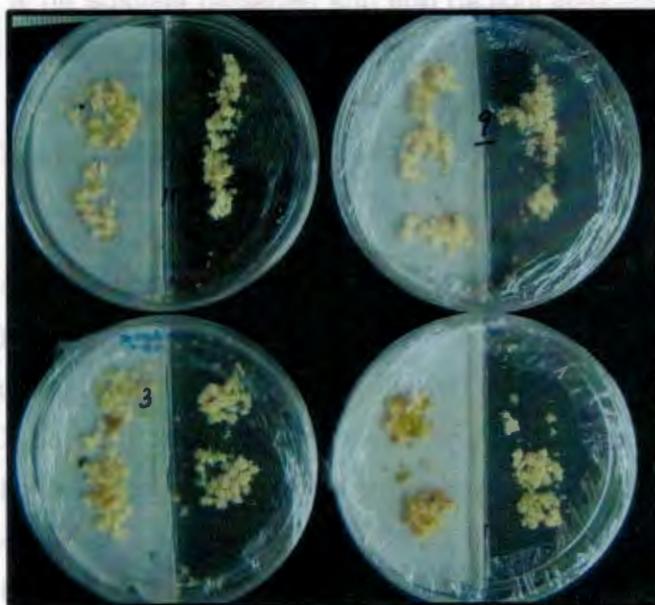


Figura 2.12. Desarrollo y maduración de embriones somáticos de *Musa acuminata* (AA) cv. Dátil sobre medio MM1 y MM2; con y sin papel filtro, a los 20 días posteriores a la siembra de 250 µl de la suspensión embriogénica.

Transcurridos 15-20 días de haber iniciado el experimento de maduración se observó el desarrollo de embriones inmaduros de forma globular-acorazonada y apariencia traslucido. Asimismo se visualizaron algunos embriones en forma acorazonada-

cotiledonar con indicios de coloración blanca-opaca muy tenue, lo cual evidenciaba el inicio de acumulación de almidón y otros componentes de reserva, siendo esto un indicativo del que embrión empezó el proceso de maduración. Estos eventos surgieron dejar proseguir el experimento hasta los 30 días para ambos genotipos y realizar la evaluación del desarrollo de embriones bajo los diferentes tratamientos.

Transcurridos los 30 días de cultivo del experimento de maduración del cv Manzano, se observó embriones somáticos de coloración blanco-opaca, indicativa de la acumulación de almidón y reserva, así como presencia de embriones traslúcidos en un estado inmaduro (Figura 2.13).

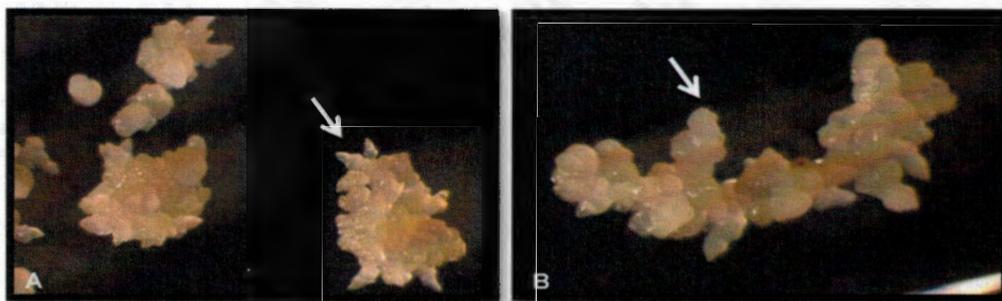


Figura 2.13. Embriones en proceso de maduración a los 30 días. A) Embriones inmaduros del cv. Manzano en el tratamiento T1-M , B) Embriones inmaduros del cv. Manzano en el tratamiento T2-M.

Entonces a los 30 días de cultivo se contabilizó el número de embriones somáticos formados; registrándose la proporción embriones somáticos inmaduros y/o maduros, para cada uno de los 8 tratamientos evaluados del cv. Manzano (AAB) del experimento de maduración (Figura 2.14 y 2.15).

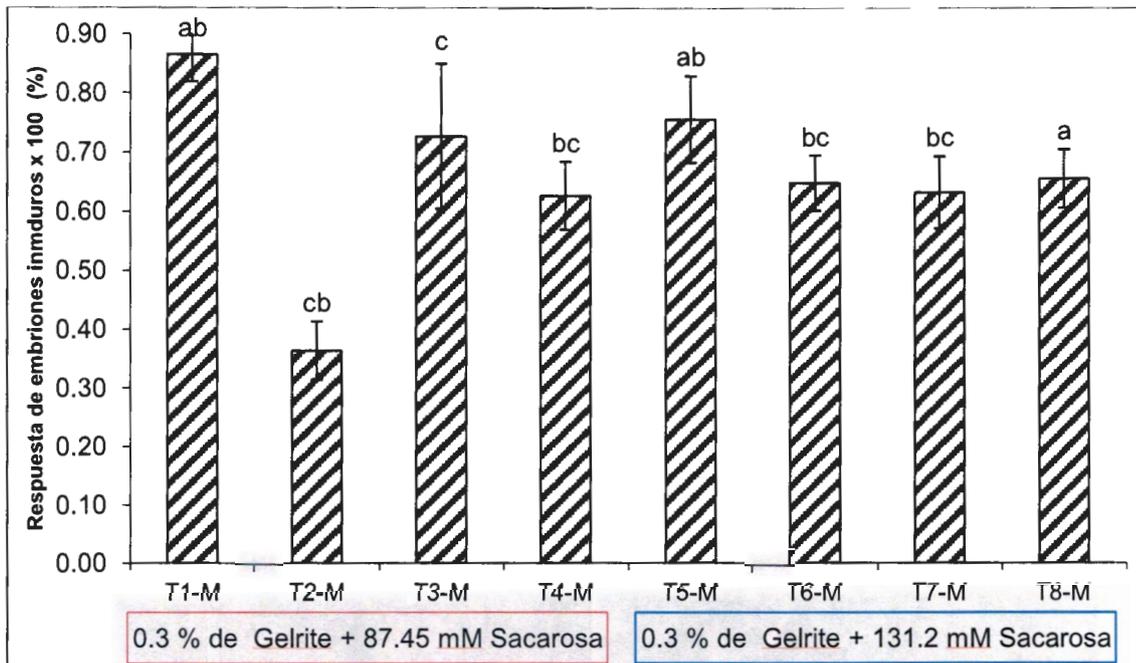


Figura 2.14. Porcentaje de embriones somáticos inmaduros derivados de suspensiones embriogénicas del cv. Manzano, desarrollados después de 30 días en cultivo bajo 8 tratamientos diferentes. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos, ANOVA al 1%.

El desarrollo de embriones somáticos derivados de suspensión embriogénica del cv. Manzano a los 30 días de iniciado el experimento mostró que bajo los tratamientos T1-M y T5-M se obtuvo un 86 y 75% de embriones somáticos que aun permanecían inmaduros, respectivamente. Estos tratamientos con un mayor porcentaje de embriones inmaduros, fueron seguidos por el tratamiento T3-M con un 73%. Por su parte los tratamientos T4-M, T6-M y T7-M presentaron porcentajes similares que van del 63% a 65%, se observó que el tratamiento T8-M obtuvo un 66% de embriones inmaduros (Figura 2.14).

El tratamiento con un menor porcentaje de embriones inmaduros fue el T2-M con solo un 36% (Figura 2.14). De igual manera se valoró el porcentaje de embriones maduros de total de embriones desarrollados bajo cada tratamiento (Figura 2.15).

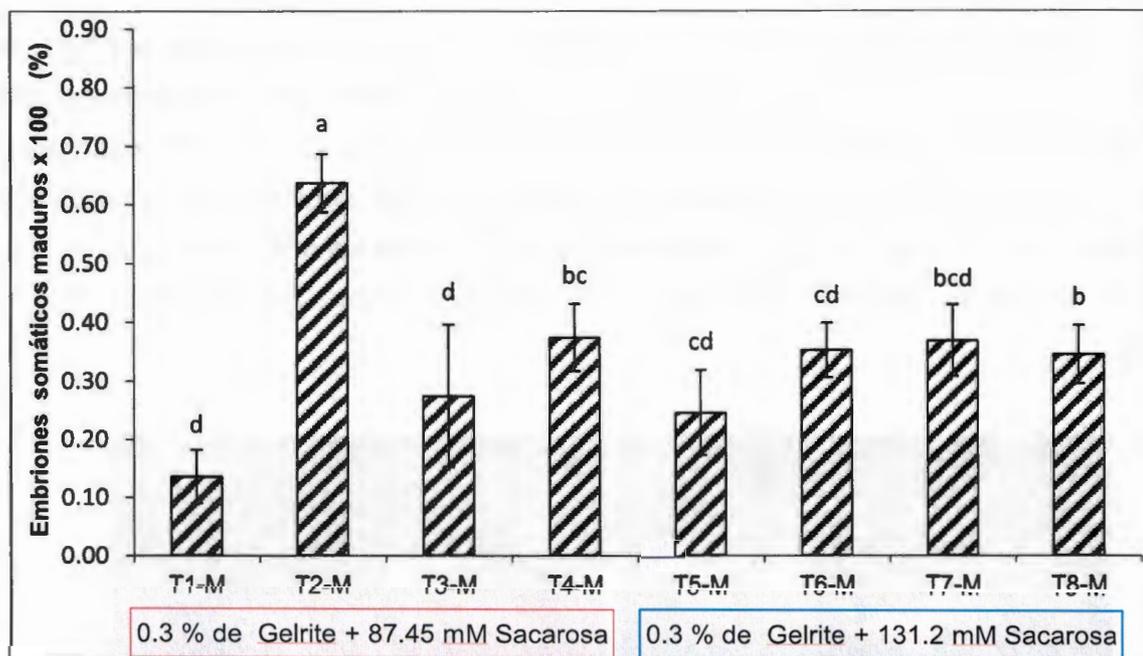


Figura 2.15. Porcentaje de embriones somáticos maduros derivados de suspensiones embriogénicas del cv. Manzano, desarrollados después de 30 días en cultivo bajo 8 tratamientos diferentes. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos, ANOVA al 1%.

La figura 2.15 muestra el análisis de resultados a los 30 días de cultivo bajo los tratamientos de maduración, observándose que bajo el T2-M se alcanzó un 64% de embriones maduros, lo que nos sugiere que el extracto de malta tiene un efecto favorable en la maduración de los embriones. Como se mostró en la Figura 2.14 solo el 36% de embriones permanecía inmaduros para este tratamiento. En contraste bajo el tratamiento T1-M, solo el 14% de embriones somático logró madurar a los 30 días. Esta fue la respuesta más baja con respecto a los demás tratamientos. A su vez dicha respuesta refleja que efectivamente el extracto de malta está jugando un papel importante en la maduración de los embriones, ya que la única diferencia entre el tratamiento T1-M y T2-M fue la adición de extracto de malta Sin embargo, para evitar el sesgo de los resultados debido a la "asincrónica" en el desarrollo de embriones globulares de la suspensión celular se utilizó en el experimento y la influencia de los diferentes tratamientos, el experimento se dejó correr más tiempo.

Transcurridos los 45 días de haber iniciado el experimento de maduración se evaluó el

porcentaje de embriones somáticos que permanecían inmaduros y aquellos que habían alcanzado la madurez. En esta etapa del cultivo, los embriones somáticos presentaban una forma globular-acorazonada y color blanco-opaco para el caso de embriones maduros, lo cual indica la acumulación de almidón y otros componentes de reserva. Asimismo, fue evidente y visible la hendidura cotiledonaria en los embriones maduros, de esta en gran número de embriones emergería la plúmula o primera hoja verdadera (Figura 2.16).

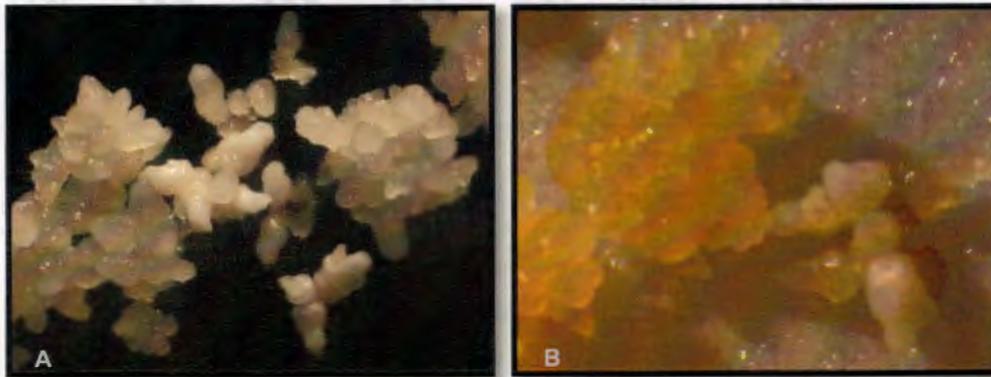


Figura 2.16. Maduración de embriones somáticos. Embriones inmaduros e inmaduros del cv. Manzano en el tratamiento T2-M (A) y tratamiento T3-M (B).

También se observó embriones inmaduros de coloración blanco traslúcidos, por lo que se contabilizó ambos estadios a los 45 días (Figura 2.17 y Figura 2.18).

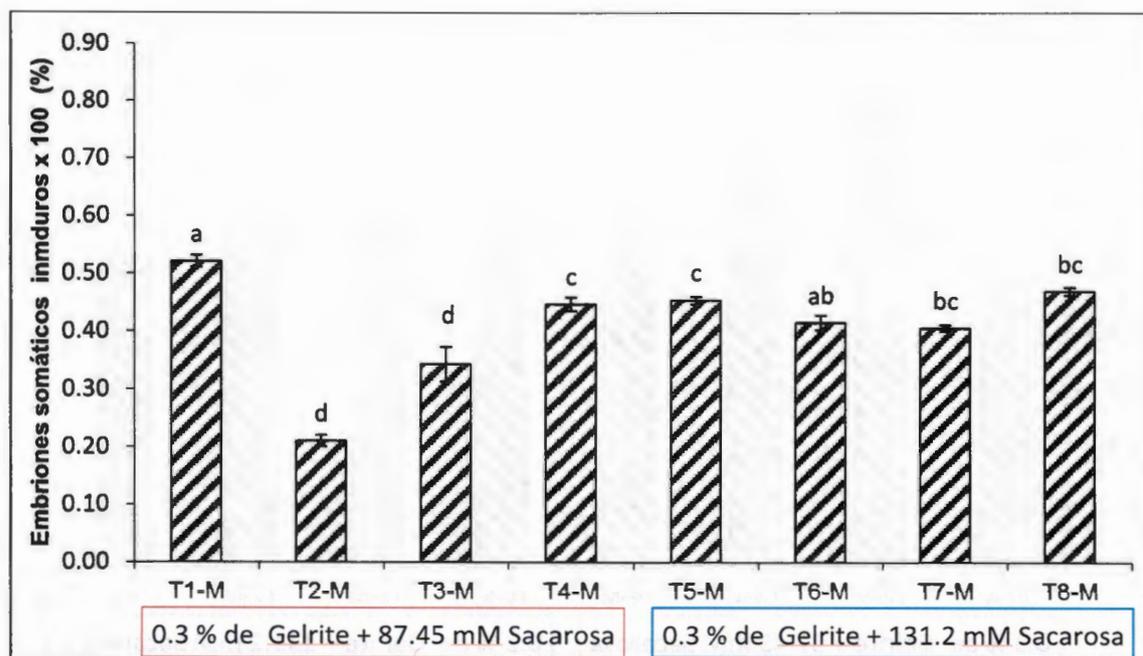


Figura 2.17. Porcentaje de embriones somáticos inmaduros derivados de suspensiones embriogénicas del cv. Manzano, desarrollados después de 45 días en cultivo bajo 8 tratamientos diferentes. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos, ANOVA al 1%.

En la figura 2.17 se observa el porcentaje de desarrollo de embriones somáticos después de 45 días bajo los diferentes tratamientos de maduración, el tratamiento con menor porcentaje de embriones que aun permanecían inmaduros fue el T2-M con solo 21%. Por otra parte, el tratamiento T1-M fue el que menos favoreció la maduración de los embriones ya que bajo dicha condición se presentó un porcentaje más elevado, 52%, de embriones inmaduros. Los demás tratamientos resultaron en porcentajes intermedios que van desde el 34% al 47%.

Si comparamos los resultados analizados a los 30 y 45 días de cultivo se observa una disminución del porcentaje de embriones inmaduros. Por ejemplo, en el caso del tratamiento T1-M a los 30 días se observó un 86% de embriones inmaduros, en contraste a los 45 días se tiene un 52%, esta es una disminución de más del 30%. Esto es importante debido a que conforme pasa los días la cantidad de embriones inmaduros disminuye, y se espera que esto se refleje en el número de embriones maduros. Por ello se contabilizó los embriones maduros a los 45 días (Figura 2.18).

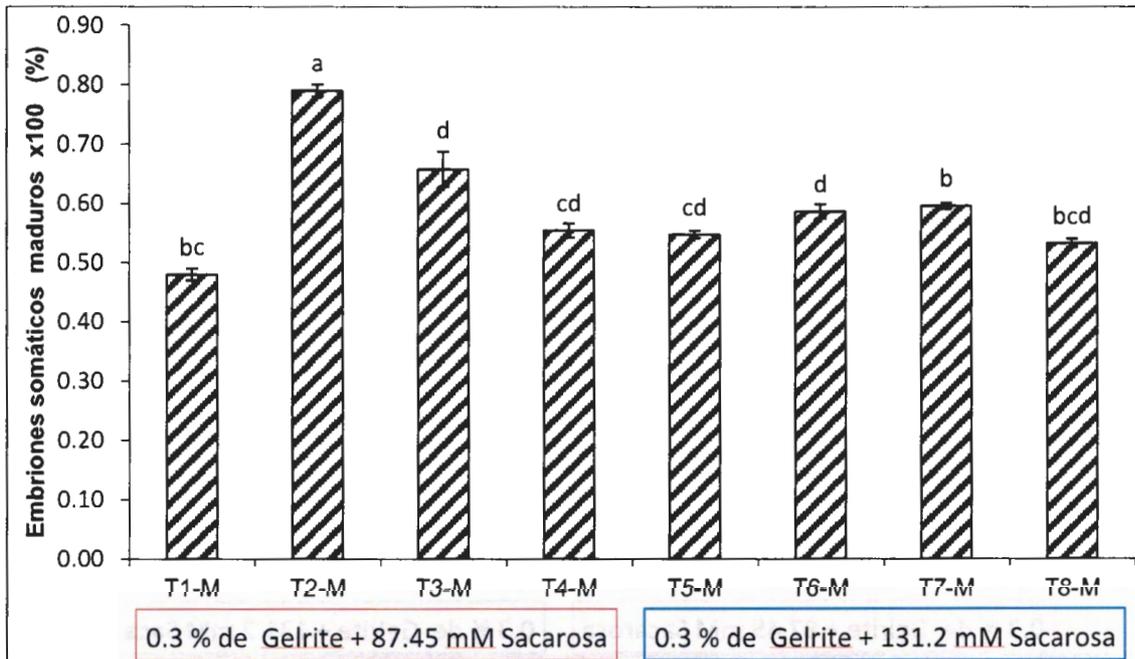


Figura 2.18. Porcentaje de embriones somáticos maduros derivados de suspensiones embriogénicas del cv. Manzano, desarrollados después de 45 días en cultivo bajo 8 tratamientos diferentes. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos, ANOVA al 1%.

Después de 45 días de cultivo se observó que bajo el tratamiento T2-M, el 79% de los embriones somáticos había madurado, y por un 66% en el T3-M. Si comparamos el tratamiento T1-M contra T2-M, cuya única diferencia fue la adición de extracto de malta en el segundo, observamos tan solo un 48% de embriones maduros en el primero. Ello sugiere que los componentes del extracto de malta favorecen la maduración de los embriones. El T3-M no tuvo extracto de malta pero la disponibilidad de agua hacia el tejido se vio restringida por el uso papel filtro, y se observó un efecto favorable, sin embargo su contraparte el tratamiento T4-M solo obtuvo un 55% de embriones maduros, ello sugiere que la conjunción de extracto de malta y el uso de papel filtro de soporte puede estar inhibiendo la correcta maduración de los embriones (Figura 2.18).

A su vez en los tratamientos T5-M, T6-M, T7-M y T8-M, que a diferencia de los 4 primeros tuvieron una concentración de 131.2 mM de sacarosa, se observó que solo entre 53 a 60% de embriones alcanzaron a madurar. No hubo diferencias entre ellos por lo que se observó que el aumento de la concentración de sacarosa no favorece de manera importante la maduración de los embriones (Figura 2.18).

En el caso del genotipo AA cv. Dátil también se realizaron observaciones del desarrollo de los embriones a los 30 días de cultivo en medio de maduración bajo diferentes tratamientos, sin embargo las observaciones mostraron resultados muy pobres, por lo que se decidió esperar hasta los 45 días para registrar la respuesta de este genotipo al experimento de maduración.

Transcurrido los 45 días del experimento de maduración, se observó embriones somáticos del cv. Dátil con una coloración blanco-opaco indicativo de embriones que están maduros, también se pudo observar embriones inmaduros con una coloración blanco translúcido (Figura 2.19 A). Así mismo en algunos tratamientos se registro la oxidación del tejido, por lo que se puede decir que este no es embriogénico, sin embargo en la parte superior de este se encontró a embriones maduros e inmaduros (Figura 2.19 B).

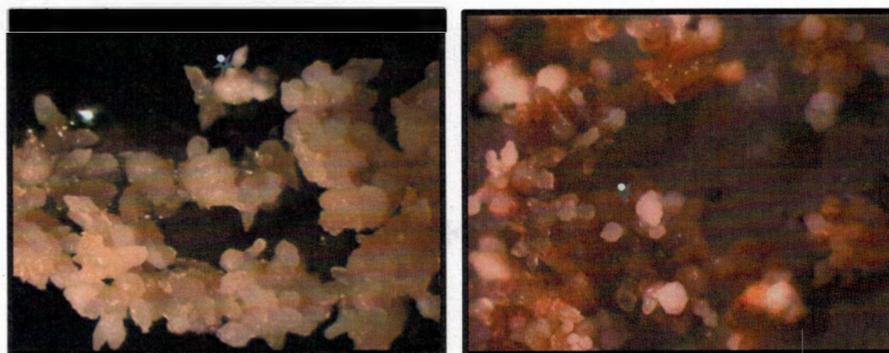


Figura 2.19. Embriones somáticos maduros e inmaduros a los 45 días. A) T1-D, B) T3-D. (La estrella marca los embriones maduros)

Por lo que de igual manera que el genotipo manzano, fueron contabilizados los embriones maduros e inmaduros a los 45 días del experimento de maduración.

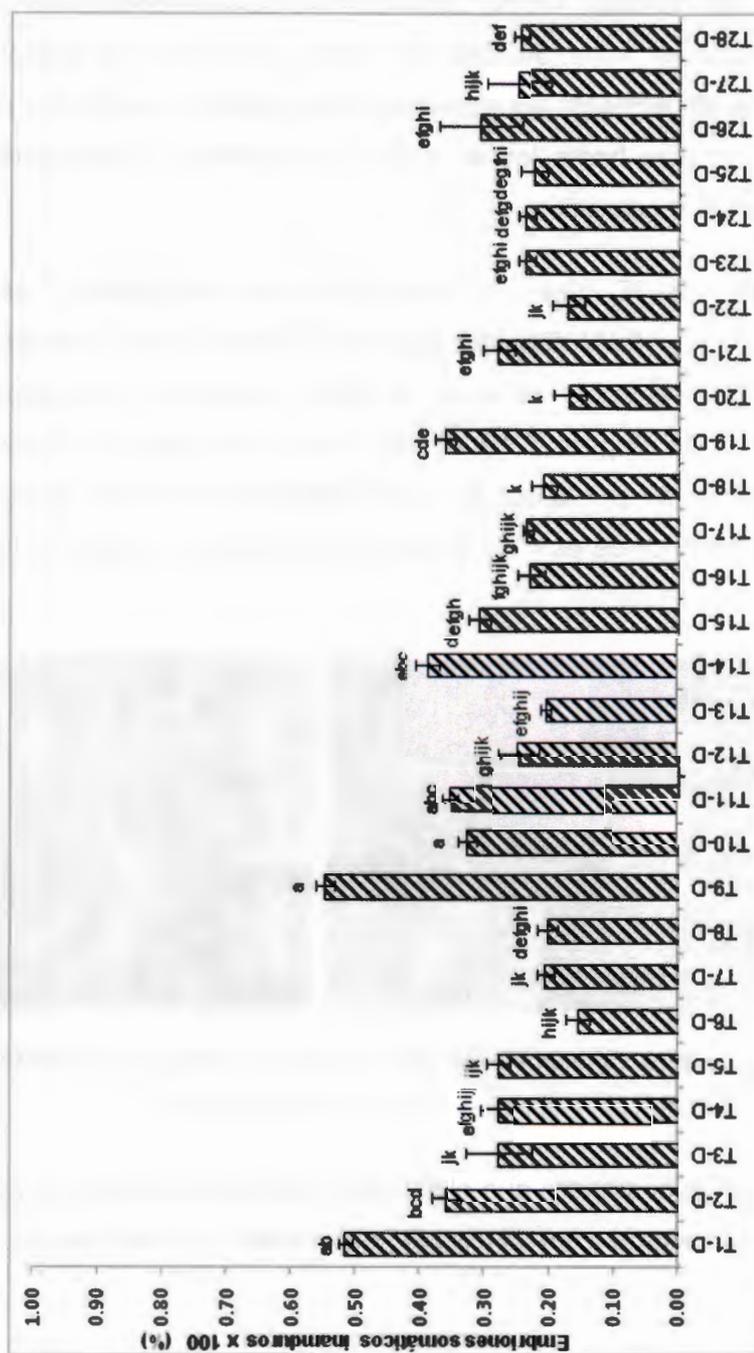


Figura 2.20. Porcentaje de embriones somáticos inmaduros derivados de suspensiones embriogénicas del genotipo AA cv. Dátil, desarrollados después de 45 días de cultivo bajo 8 tratamientos diferentes. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos, ANOVA al 1%.

A los 45 días de plaqueada la suspensión celular del genotipo Dátil sobre el medio de maduración, se contabilizaron los embriones inmaduros que se habían formado y se observó que el tratamiento T9-D dio el mayor porcentaje, 55%, seguido del tratamiento T1-D con un 52% (Figura 2.20). Lo anterior representa un elevado porcentaje de embriones somáticos inmaduros. En contraste los tratamientos en que se desarrollo menor porcentaje de embriones somáticos inmaduros fueron los tratamientos T6-D con un 15% (Figura 2.20), seguido de los tratamientos T20-D y T22-D con un 17%. El tratamiento T6-D que contenía extracto de malta, 131.2 mM de sacarosa y 0.2% de gelrite, dio un menor desarrollo y maduración de los embriones. Los tratamientos T20-D y T22-D de igual manera contienen extracto de malta pero además una concentración más elevada de gelificante (0.4%), lo cual para afectar el desarrollo de los embriones de tal manera que permanecieron inmaduros. A su vez los demás tratamientos alcanzaron porcentajes considerables que van del 23 al 30% de embriones inmaduros. Sin embargo para poder corroborar los datos obtenidos a continuación se presenta los porcentajes de embriones maduros para los tratamientos del cv. Dátil (Figura 2.21).

La Figura 2.21 presenta los porcentajes de embriones somáticos del cv. Dátil que alcanzaron la madurez a los 45 días de cultivo bajo 26 diferentes tratamientos. Se observó que el tratamiento T6-D favoreció que el 85% de los embriones somáticos alcanzaran su madurez a 45 días, seguido de los tratamientos T20-D y T22-D con un 83% de respuesta (Figura 2.21). Estos tratamientos alcanzaron un elevado porcentaje de respuesta a la maduración, tal vez debido a la adición de extracto de malta, ya que el tratamiento T6-D se adiciono con extracto de malta y una concentración de sacarosa de 131.2 mM, lo cual podría estar actuando como osmótico favoreciendo la desecación del embrión somático y promoviendo la acumulación de compuestos de reserva.

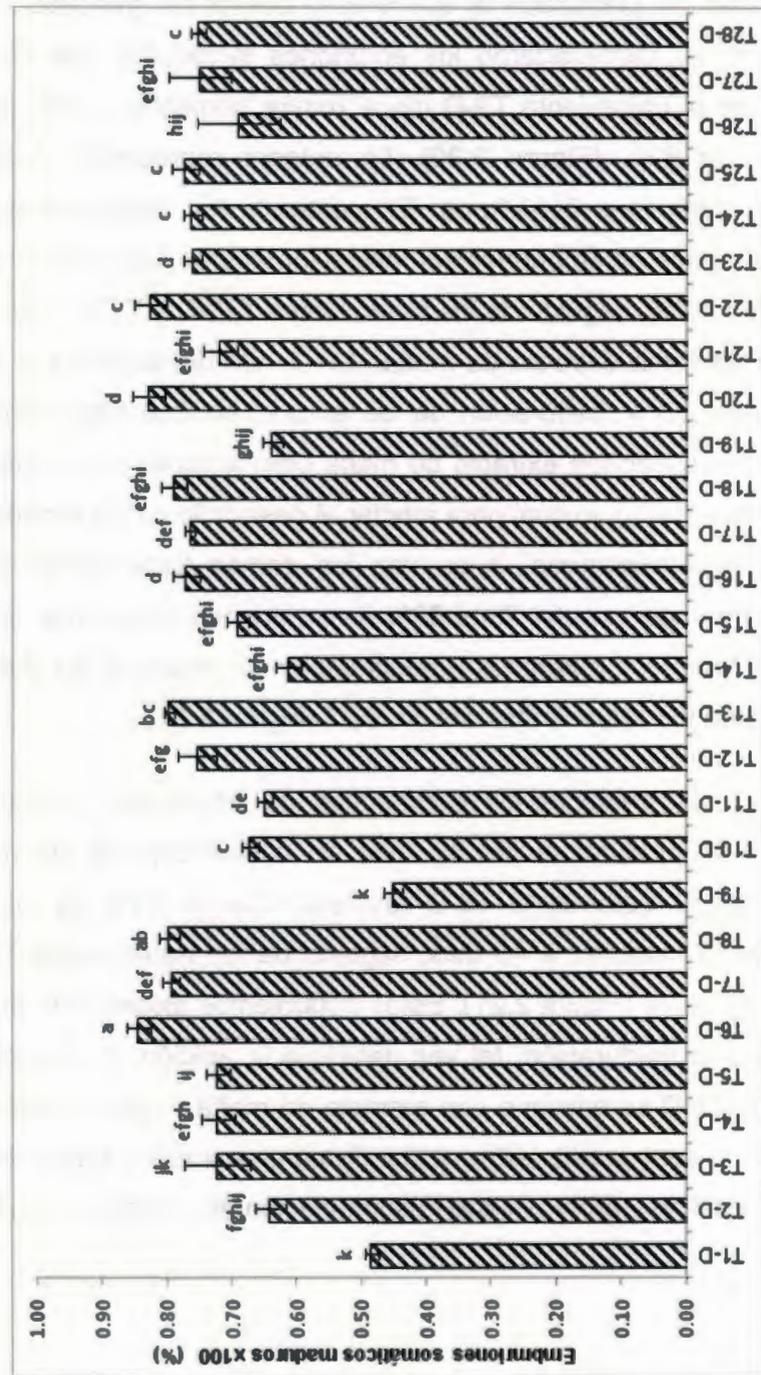


Figura 2.21. Porcentaje de embriones somáticos maduros derivados de suspensiones embriogénicas del genotipo AA cv. Dátil, desarrollados después de 45 días de cultivo bajo 8 tratamientos diferentes. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos, ANOVA al 1%.

.De igual manera el tratamiento T20-M contenía una concentración significativa de gelificante (0.4% y 87.45 mM de sacarosa), los embriones no se encontraban en contacto con el medio por efecto del papel filtro, lo que apunta a que la restricción en disponibilidad de agua tal vez promovió la desecación del embrión. A su vez el tratamiento T22-M contenía una concentración de gelificante del 0.4%, sacarosa 131.2 mM y extracto de malta, por lo que esto tal vez favoreció la maduración de los embriones somáticos (Figura 2.21).

En contraste los tratamientos T1-D y T9-D fueron los que tuvieron una respuesta de maduración de los embriones somáticos más baja, 48 y 45%, respectivamente. La diferencia de estos tratamientos radica en que el tratamiento T9-D contenía una concentración del 0.3% de gelificante, en tanto que el tratamiento T1-D tuvo un 0.2%, sin embargo ambos no fueron adicionados con extracto de malta ni una concentración superior de sacarosa, lo que se sugiere que en ausencia de estos compuestos la maduración de embriones se ve disminuida.

De igual manera, en la figura 2.21 se puede apreciar que la gran mayoría de los tratamientos favorecieron la maduración de los embriones somáticos igual o superior al 60%, por lo que parecen ser de importancia a ser considerados para futuros experimentos.

Es importante señalar que aun cuando se observaron buenas respuestas en los diferentes tratamientos para la maduración de los embriones somáticos en ambos genotipos, AAB cv. Manzano y AA cv. Dátil, sin embargo, ello no quiere decir que sea correlativo con la tasa de germinación y conversión a planta, por lo cual se evaluó ambos parámetros para los embriones que maduraron bajo los diferentes tratamientos para ambos genotipos, ello con el fin de definir cuál es el mejor tratamiento de maduración de embriones somáticos para obtener altas tasas de germinación y conversión a planta.

Como se mencionado en el apartado de materiales y métodos, se evaluó la tasa de germinación de embriones somáticos de 45 días en tratamientos de maduración del cv. Manzano y Dátil, para lo cual por tratamiento y genotipo se valoraron 8 embriones por UE y 5 réplicas por UE, pasado el mes de cultivo en medio de germinación, posteriormente se realizó la valoración.

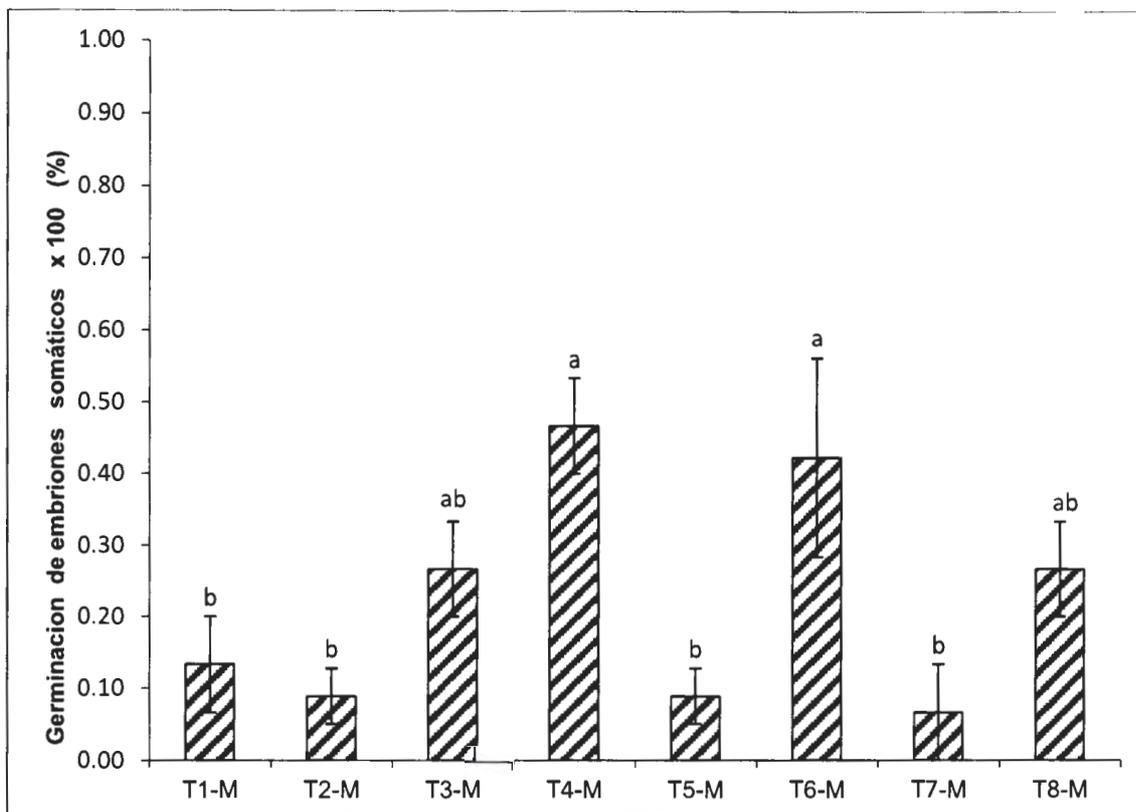


Figura 2.22. Tasa de germinación de embriones somáticos del cv. Manzano, después de 45 días de desarrollo bajo diferentes tratamientos en medio de maduración. Letras diferentes indican diferencias significativas obtenidas mediante ANOVA al 1%.

En la figura 2.22 se muestra el porcentaje de germinación para el genotipo AAB del cv. Manzano de los embriones somáticos que maduraron bajo 8 diferentes tratamientos, observándose que los embriones somáticos que se desarrollaron bajo el tratamiento T4-M manifestaron la mayor tasa de germinación de embriones maduros 47%, seguido del tratamiento T6-M con un 42%. En contraste los embriones que maduraron bajo los tratamientos T7-M, T5-M, T2-M y T1-M su tasa de germinación fue baja de entre 7 y 13%, y bajo los tratamientos T3-M y T8-M se obtuvo un 27% de germinación, por lo que son tasas de germinación bajas sin embargo no se encuentran entre los menos adecuados.

Se observó de manera notoria la baja tasa de germinación de aquellos tratamientos que dieron un porcentaje elevado de embriones maduros. Por ejemplo el tratamiento T2-M donde se obtuvo un 79% de embriones maduros a los 45 días (Figura 2.18), la tasa de

germinación observada fue tan solo de 9%. Esto indica que a pesar que los embriones aparentemente se encuentren en un estado de madurez porque cambio su color a blanco-opaco, estos no se desarrollaron adecuadamente. Así mismo el tratamiento T4-M donde se obtuvo un porcentaje de embriones maduros del 55%, sin embargo fue el mejor tratamiento en cuanto a tasa de germinación de embriones. Esto nos demuestra que es muy importante evaluar la tasa de germinación para poder elegir el mejor tratamiento de maduración de acuerdo al genotipo. Por lo que para el cv. Manzano el mejor tratamiento a elegir sería el T4-M seguido del tratamiento T6-M.

En el cv. Dátil se observó un bajo porcentaje de germinación de los embriones para todos los tratamientos. El tratamiento T22-D fue el único que tuvo mejor porcentaje (13%) de germinación. Sin embargo, esta respuesta es baja respecto del genotipo del cv. Manzano, indicándonos que aun hay que trabajar más con dicho genotipo para encontrar las mejores condiciones de maduración y germinación de los embriones. A pesar de que se observó una respuesta de maduración alta para el tratamiento T22-D del 83%, siendo el segundo mejor tratamiento de maduración, el porcentaje de germinación fue bajo. Los tratamientos T19-D, T24-D, T27-D y T28-D se obtuvo un porcentaje de germinación del 4% (Figura 2.23).

En general se observó que para el genotipo AA del cv- Dátil no fue favorable la respuesta de germinación. Siendo el tratamiento que mayor respuesta dio durante el proceso de maduración fue el T6-D con 85% de embriones maduros, pero estos nunca germinaron. Esto nos indica que a pesar de poder obtener embriones maduros, por la coloración blanco-opaca, ello no significa que estos van a tener una correcta germinación; por lo cual habrá que investigarse más que está sucediendo en este genotipo para poder obtener una mejor respuesta. Sin embargo estos resultados nos abren una puerta para futuros estudios para trabajar en resolver estos cuellos de botellas del proceso de embriogénesis somática de plátano. Cabe mencionar que los embriones somáticos del cv. Dátil después de madurar 45 días pasaron a un medio de germinación con 0.2% de gelificante y en cajas petri.

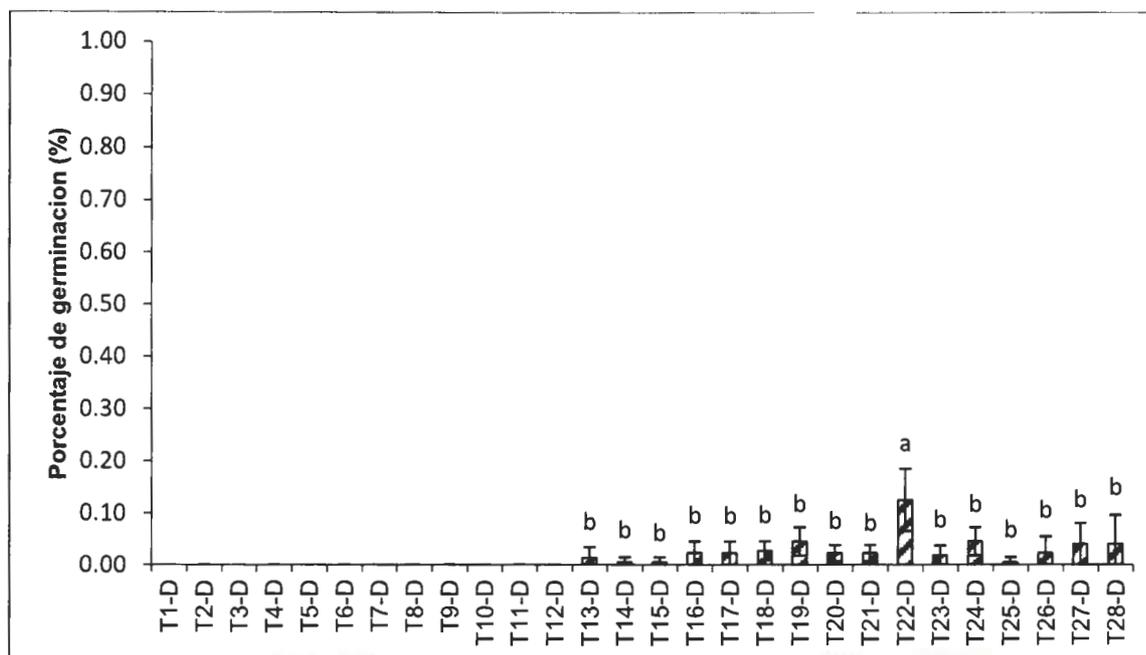


Figura 2.23. Tasa de germinación de embriones somáticos maduros del cv. Dátil después de 45 días en cultivo del experimento de maduración. Letras diferentes indican diferencias significativas obtenidas mediante ANOVA al 1%.

2.4. DISCUSIÓN

La embriogénesis somática es una herramienta ideal para el estudio de los procesos del desarrollo y diferenciación en plantas. Esta técnica biotecnológica puede integrarse a programas de mejoramiento genético-molecular, ofreciendo información relativa a especies con un alto valor comercial. En el caso de *Musa*, cada día se utiliza más esta técnica para la propagación clonal, saneamiento de los cultivos y la transformación genética. Siendo el cultivo de platano plátano dependiendo de los objetivos, la inducción de la embriogénesis somática utiliza de manera frecuente 4 tipos de explantes: i) embriones cigóticos (Escalant *et al.*, 1989), ii) flores inmaduras masculinas o femeninas (Escalant *et al.*, 1994, Grapin *et al.*, 1996), iii) explanes de corno (Novak *et al.*, 1989), iv) y “scalps” o meristemas en proliferación (Dhen'd *et al.*, 1991). Por la facilidad de su manejo, el explante más utilizado es el de flores masculinas inmaduras.

En el presente trabajo la embriogénesis somática partió de flores masculinas inmaduras provenientes de inflorescencias de 2 semanas de edad posterior a la antesis de los genotipos AA cv. Dátil y AAA cv. Enano gigante clon Francés. La respuesta de las flores masculinas inmaduras a la formación de callo embriogénico (callo ideal) fue del 16% para el cv. Dátil y 10.9% para Enano gigante, respectivamente. En el caso del cv Dátil nuestros resultados fueron mayores a lo reportado por Jalil *et al* (2003). Estos autores obtuvieron 10% de formación de callo embriogénico, partiendo del mismo tipo de explante y cultivar de banano AA, Pisang mas. Ambos cultivares diploides están morfológica y genéticamente relacionado, pertenecen al subgrupo Sucrier de bananos. Sin embargo, debido a que dichos autores no reportan la edad de la inflorescencia de donde tomaron el explante inicial, las diferencias en edad fisiológica del explante inicial en ambos trabajos podría explicar la diferencia en la respuesta embriogénica del presente trabajo y el reportado por Jalil *et al* (2003).

En el caso del cv. Enano gigante, el valor del 10.9% de formación de callo embriogénico que se obtuvo en nuestro trabajo, representa casi el doble del valor reportado por Grapin *et al* (1998), y 1.45 y ~4.4 veces el valor de 7.51% y 2.5% alcanzado en el trabajo de Youssef *et al* (2010), para flores jóvenes de inflorescencias de 1 y 2 semanas de edad, respectivamente. La diferencia en porcentaje de formación de callo entre los trabajos puede deberse tal vez a un efecto estacional, ya que en el trabajo de Youssef *et al* (2010),

las flores masculinas procedían de inflorescencias colectadas en los meses de febrero-marzo; mientras que el presente estudio la colectado e inducción fue en los meses de septiembre-octubre. La existencia de un efecto estacional en la respuesta embriogénica de plátano ha sido reportado por Escalant *et al* (1994).

En el presente trabajo también se registró un efecto sobre la respuesta de flores masculinas jóvenes a la formación de callo embriogénico que parece estar influenciada por la posición que guardan las manos respecto del meristemo apical de la influencia. Para el caso del cv. Dátil las manos en posición 8 y 9, siendo el meristemo la posición cero, mostraron mejor respuesta a formar callo embriogénico. Para el cv. Enano gigante fueron las manitas en la posición 8 y 10. Strosse *et al* (2003) sugiere que las flores inmaduras provenientes de manos con una posición 6 a la 16 son las más responsivas, sin embargo en estudios realizados por Escalant *et al* (1994) se sugiere que la posición de las manos es importante para la respuesta del explante. El último autor obtuvo una mejor respuesta para las manos en las posiciones de la 7 a la 13. Mientras que para Chong *et al* (2005), en el genotipo cv. Enano gigante, las posiciones de las manos 8 a la 15 son las que mejor respuesta dieron al proceso de inducción de callo embriogénico. Por otra parte, para el genotipo cv. Pisang mas (AA), Jalil *et al* (2003) reporta que las flores masculinas provenientes de la mano en posición 9 dan la mejor respuesta a la obtención de callo embriogénico. Esto concuerda con nuestros resultados respecto de los dos genotipos aquí analizados. Por lo que es importante evaluar la respuesta embriogénica en función de la posición de la mano para cada genotipo de *Musa* spp., ya que cada genotipo tiende a responder de manera diferente al proceso.

Para el proceso de proliferación del callo embriogénico del cv. Enano gigante nos topamos con complicaciones debido a que su proliferación fue muy lenta, y no se alcanzó una masa de callo embriogénico suficiente para inducir las suspensiones celulares. Es por ello que debido a que en el grupo de trabajo se disponía de callo embriogénico en proliferación del genotipo AAB cv. Manzano, se partió de dicho material y del cv. Dátil para realizar la parte de inducción de las suspensiones embriogénicas.

Las suspensiones celulares para el cv. Manzano y Dátil fueron inducidas satisfactoriamente, manejando para cada resiembra el 3% del paquete de volumen celular (PVC). Este porcentaje es sugerido para diversos cultivares de *Musa* spp., de hecho,

Strosse *et al* (2003) sugiere un porcentaje de entre 1.5 al 3% del PVC. Oliveira *et al* (2009) evaluó diferentes densidades de PVC, siendo la densidad del 3% en la que encontró mejor repuesta, debido a que las células se encuentran biológicamente activas y estas no compiten por los nutrientes del medio. Por lo que en nuestro trabajo se decidió usar el porcentaje del 3%. Previamente a realizar el experimento de maduración las suspensiones celulares embriogénicas fueron filtradas, esto permite de alguna manera sincronizar un buen porcentaje de la población de células embriogénicas y pro-embriones globulares en la suspensión para realizar el experimento de desarrollo y diferenciación de los embriones somáticos (Ibaraki *et al.*, 2001).

Con el fin de mejorar el sistema de regeneración de plantas a través de la embriogénesis somática de flores masculinas inmaduras de plátano, se desarrollaron experimentos de maduración de embriones somáticos partiendo del plaqueo de suspensiones celulares embriogénicas bajo diferentes tratamientos. En dichos experimentos fue notorio el incremento del porcentaje de embriones blancos-opacos, considerados como maduros, entre los 30 a los 45 días de cultivo. Esto se evaluó debido a que a los 30 días se observaron algunos embriones blancos-opacos y proporcionalmente más embriones blanco-translucidos que representan embriones inmaduros. Nuestros resultados son consistentes con lo mencionado por Aguilar *et al* (2008), quien reporta que durante los días 22 y 30, empieza el incrementar la masa de embriones que se observan sobre el papel filtro, sin embargo esto no es un indicativo que los embriones hayan madurado correctamente. Por su parte Khalil *et al* (2003) sugiere que los embriones deben estar en un medio de maduración alrededor de 40 a 60 días, para que hayan alcanzado la madurez adecuada. Esto concuerda con nuestras observaciones y resultados ya que en nuestro trabajo hubo un incremento del número de embriones maduros a los 45 días.

Es importante destacar algunos aspectos que otros autores han señalado y que son de relevancia para la maduración de embrión somático en otras especies. Klimaszewka *et al* (2001) subraya la importancia del potencial de agua sobre el desarrollo del embrión, para la correcta maduración de este. Por lo general, se utiliza un medio físico para afectar la disponibilidad de agua en el medioambiente de crecimiento del tejido embriogénico o embrión, de tal forma que los potenciales resultantes de agua de los embriones somáticos en desarrollo y maduración se reduzcan por debajo del potencial de agua del ambiente de

crecimiento. Por ello se dice que el potencial de agua del tejido embriogénico o células embriogénicas es la suma del potencial osmótico, potencial de turgencia y potencial matricial. El correcto manejo de estos factores puede favorecer la buena maduración del embrión, además de que se promueve la tolerancia a la desecación del embrión que repercute en su germinación y conversión a planta.

Considerando lo antes expuesto, en el presente trabajo se probaron diferentes tratamientos para inducir cambios del potencial de agua del medio y los embriones somáticos en desarrollo, partiendo de suspensiones embriogénicas del cv. Manzano y Dátil.

Los resultados en el experimento de maduración para el cv. Manzano mostraron que el mejor tratamiento para la obtención de embriones blancos-opacos a los 30 y 45 días fue el T2-M, que a diferencia del T1-M, contiene extracto de malta. El extracto de malta es una mezcla compleja de carbohidratos tales como la maltosa, fructuosa y glucosa, aminoácidos como la prolina y glutamina, entre otros componentes. Los reportes de la literatura indican que la prolina, regula el paso de agua a través de la membrana plasmática, y contribuye al incremento de reservas celulares al igual que a la tolerancia y la desecación (Prewein *et al.*, 2004). Así mismo, el extracto de malta contiene sacáridos, los cuales son sustancias protectoras de la membrana bajo condiciones de estrés osmótico, lo cual favorece la estabilización de la membrana durante este tipo de estrés (Lipavska *et al.*, 2004). Por lo tanto la adición de extracto de malta al medio de cultivo parece favorecer la maduración de los embriones somáticos debido a los solutos que contiene que actúan como osmoreguladores modificando el potencial de agua del embrión, por lo que ayuda a que el agua disponible dentro del embrión sea la necesaria para la correcta maduración.

El otro tratamiento de maduración del embrión del cv. Manzano a los 45 días, con el cual se observó un efecto favorable fue el T3-M. Este tratamiento no contenía extracto de malta, sin embargo la diferenciaron de embriones somáticos de la suspensión embriogénica fue sobre el soporte de papel filtro. El potencial de agua queda modificado cuando se encuentra una separación del embrión con el medio de cultivo (Klimaszewka *et al.*, 2001). Este soporte absorbe el agua disponible en la superficie del medio, dejando pasar a su vez los nutrientes del medio a través de los poros de este, por lo que esto

puede estar favorecer la maduración del embrión.

Para el genotipo del cv. Dátil el mejor tratamiento de maduración fue el T6-D, con 85% de embriones maduros, bajo este tratamiento con 0.2% de gelificante, y una concentración de sacarosa del 131.2 mM de sacarosa, la adición de extracto de malta, nuevamente parece favorecer la maduración del embrión. Además de esto la concentración de sacarosa se modifico, se han mencionado en reportes que la sacarosa no solo actúa como fuente de carbono sino también como hormona y agente osmótico, otorgando tolerancia a la desecación a los embriones somáticos (Lecouteux, *et al.*, 1993). Este carbohidrato a la par con el extracto de malta puede modificar de manera positiva el potencial de agua del embrión, favoreciendo la maduración de este.

A su vez para Dátil se observo que el tratamiento de maduración menos favorable fue el T9-D con un porcentaje del 45% seguido del tratamiento T1-D con un 48%. Lo común para estos tratamientos fue la ausencia de extracto de malta. La sacarosa de estos medios parece estar actuando únicamente como fuente de carbono, mientras que en el tratamiento T5-D el cual a diferencia del T1-D, contiene el doble de concentración de sacarosa que parece haber actuado como osmótico tuvo una respuesta del 72% de embriones maduros. Por lo que la adición de extracto de malta y la concentración de sacarosa juega un papel importante durante el proceso de maduración del embrión somático.

Tomando en consideración la germinación del embrión somático como parámetro que mide el éxito del efecto del tratamiento de maduración sobre el desarrollo del embrión, observamos que en el cv. Manzano, el tratamiento con el mayor porcentaje de germinación fue el T4-M ya que bajo sus condiciones de maduración se logró un 47% de germinación, seguido del T6-M con un 42%. Nuestros datos están cercanos a los reportados por Cabrera (2001) quien encontró una tasa de germinación del 49.3% para el genotipo AAB cv. 'Navolean'. No obstante, no sabemos si genéticamente ambos genotipos de los cvs Manzano y Navolean pertenezcan al mismo subgrupo de plátanos AAB, y estén relacionados genéticamente en cuanto a su origen, Manzano pertenece al subgrupo Silk, pero carecemos de la información para el segundo. No obstante, consideramos que la tasa de germinación aquí encontrada es bastante favorable sin embargo, los resultados del experimento de maduración nos sugieren que se puede

mejorar aun mas dichos resultados trabajando más profundamente en esta ventana fisiológica del desarrollo.

Para el cv. Dátil la mayor tasa de germinación del embrión somático que se logró fue del 12%, que correspondió al tratamiento de maduración T22-D. Dicho valor es una tasa baja germinación respecto del experimento del cv. Manzano. Sin embargo, este porcentaje está muy cerca de lo reportado por Jalil *et al* (2003), quien obtuvo una tasa del 15% para el cultivar Pisang mas (AA). Cabe indicar que el cv. Dátil y el cv. Pisang mas de genoma AA, son genéticamente muy cercanos, ambos pertenecen al subgrupo Sucrier. Sin embargo al igual que en el cv Manzano es necesario trabajar más con ambos genotipos en esta etapa para incrementar aún más la tasa de germinación y evaluar la conversión a planta.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar M. y J. Sandoval (2008). Embriogénesis somática en plátanos y bananos: perspectivas y limitaciones. Boletín técnico, CORBANA. pp. 50.
- Cabrera M. (2001). Embriogénesis somática en *Musa* (AAB) cv. Navolean empleando medios de cultivo líquidos. Tesis de maestría. Instituto de Biotecnología de las Plantas de Santa clara. Cuba.
- Chomczynski P. y N. Sacchi (1987). Singel step method of RNA isolation by guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem, 162: 156-159.
- Chong, B., Kosky, G., Vega, R., Carballoso, B., Colina, G., Seijo, F., Pérez, P., O'Farril H. y R. Swennen (2005). New methodolgt for the establiment cell suspensions of "Grande naine" (AAA). Infomusa, 14: 13-18.
- Dhed'a 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 species *Musa acuminata* and *Musa balbisiana*. Plant Cell Reports, 7: 181-186.
- Escalant, J-V., Teisson C. y F. Cote (1994). Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). In Vitro Cellular and Development Biology, 30: 181-186.
- Grapin, A., Ortiz, J-L., Domergue, R., Babeau, J., Monmarson, S., Escalant, J-V., Teisson C. y F. Cote (1998). Establiment of embryogenic callus and initiation and regeneration of embryogenic cell suspensions from female and male inmature flowers of *Musa*. INFOMUSA, 71: 13-15.
- Grapin J.y C. Teisson (1996). Somatic embryogenesis in plantain banana. In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant, 32:66-71
- Ibaraki Y. y K. Kurata (2001). Automation of somatic embryo production. Plant Cellular and

Tissue Organ Culture, 65: 576-584.

Jalil, M., Khalid N. 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.

Khalil S. y A. Elbanna (2003). Highly efficient somatic embryogenesis and plant regeneration via suspension cultures of banana (*Musa* spp.). Arab Journal of Biotechnology, 7: 99-110.

Klimaszeska, K., Sutton, B., Polonenko, D., Cyr D. y T. Stodola (2001). Maturation of somatic embryos. U.S Patent No. 6,200,809. Pag 21 p.

Lecouteux, CG., Lai FM. y BD. Mckersie (1993). Maturation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos by abscisic acid, sucrose and chillingstress. Plant Science, 94: 207-213.

Lipavska H. y H. Konradova (2004). Somatic embryogenesis in conifers: the role of carbohydrate metabolism. In Vitro Cellular and Development Biology, 40: 23-30.

Montalban, IA., De Diego N. y P. Moncaleán (2010). Bottlenecks in *pinus radiata* somatic embryogenesis: improving maturation and germination. Trees, 24: 1061-1071.

Novak, F., Afza, R., Van Duren, M., Perea-Dallos, M., Conger B. y T. Xialong (1989). Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB) bananas (*Musa* spp.). Nature Biotechnology, 46: 125-135.

Olivera, L., Kosky, R., Vega, M., Pérez, L., Seijo M. y H. O'Farril (2009). Efecto de la densidad de inóculo en la multiplicación y diferenciación de suspensiones celulares embriogénicas en el cultivar híbrido de banano FHIA-18 (*Musa* spp. AAAB). Revista Colombiana de Biotecnología, 2: 40-47.

Prewin, C., Vagner M. y E. Wilhelm (2004). Changes in water status and proline and abscisic acid concentrations in developing somatic embryos of pedunculate oak (*Quercus robur*) during maturation and germination. Tree Physiology, 24: 1251-

1257.

Strosse, H., Domergue, R., Panis, B., Escalant J-V. y F. Cote (2003). Suspensiones de células embriogénicas de banano y plátano. Guías técnicas INIBAP 8. Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y el Plátano. pp. 36.

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

CAPÍTULO III

EXTRACCION DE RNA Y cDNA-SRAP

3.1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo se describe el procedimiento del protocolo de extracción de RNA, posteriormente la realización del cDNA-SRAP en geles de secuenciación y el posterior análisis de las bandas diferenciales.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Extracción de RNA total (Chomczynski y Sacchi, 1987; Itza, 2011)

Para la extracción de RNA se pesó de 100 mg del material biológico (Cuadro 3.1), y se transfirió a tubos Eppendorf estériles de 1.5 ml de capacidad, el material se congeló en nitrógeno líquido y se mantuvo a -80°C hasta su uso.

Cuadro 3.1. Material biológico para la extracción de RNA, E in= embrión inmaduro, E ma= embrión maduro, EG= embrión germinado.

Genotipo	Material biológico para la extracción de RNA	
	Manzano (AAB)	Dátil (AA)
1	Flores masculinas inmaduras	Flores masculinas inmaduras
2	Callo embriogénico	Callo embriogénico
3	Suspensión celular	Suspensión celular
4	T1-M (E in)	T1-D (E in)
5	T1-M (E ma)	T1-D (E ma)
6	T2-M (E in)	T9-D (E in)
7	T2-M (E ma)	T9-D (E ma)
8	T7-M (E ma)	T13-D (E in)
9	T2-M (EG)	T13-D (E ma)
10	T5-M (EG)	T22-D (E in)
11		T22-D (E ma)
12		T13-D (EG)
13		T19-D (EG)
		T22-D (EG)

La extracción de RNA inició con la pulverización del material biológico, en un mortero previamente enfriado, almacenado a -80°C , con nitrógeno líquido. A continuación se

adicionan 200 μ L de TRIZOL, se maceró y transfirió a un tubo (1.5 mL) con 200 μ L de Trizol, se mezcló vigorosamente con ayuda de vortex e incubó en hielo durante 30 minutos. Después se centrifugó a 13000 rpm (16060 g) y 4°C durante 15 minutos, el sobrenadante fue transferido a otro tubo Eppendorf (1.5 mL). Se adicionó 2/10 volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se agitó vigorosamente con ayuda de vortex, para posteriormente centrifugar a 13000 rpm (16060 g) a 4°C, durante 20 minutos. Se transfirió el sobrenadante a un tubo Eppendorf (1.5 mL), se adicionó 1 volumen de isopropanol, se agitó por inversión con gentileza e incubó a -80 °C durante 30 minutos. Posteriormente se incubó la muestra en hielo durante 5 minutos (para que se descongele), se centrifugó a 13000 rpm (16060 g) a 4°C, 25 minutos, se decantó el sobrenadante. Se lavó la pastilla con 300 μ L de etanol 70% (v/v), se agitó por inversión gentilmente y centrifugó a 13000 rpm (16060 g) a 4°C durante 5 minutos, este paso se realiza dos veces. Se desechó el sobrenadante y se adicionó 300 μ L de etanol 100%, centrifugó a 13000 rpm (16060 g) a 4°C durante 15 minutos. Se desechó el sobrenadante con mucho cuidado, poner el tubo Eppendorf boca abajo sobre un papel para dejar secar la pastilla, esto se hace a temperatura ambiente. Se resuspendió la pastilla en 50 μ L de agua ultrapura y se almacenó a -80 °C para su posterior uso.

Nota: El material de uso como los morteros, pistilo, puntas y tubos se esterilizaron previamente, por autoclave y por UV para degradar a las nucleasas. La zona en donde se extraerá el RNA así como las pipetas es limpiada con etanol al 96% y NaOH 0.1 N.

3.2.2. Análisis del RNA total en gel de agarosa

EL RNA ribosomal representa alrededor del 90% del RNA total, cualquier deterioro de este durante la extracción se puede visualizar en un gel de agarosa con bromuro de etidio.

El análisis de la integridad del RNA se llevó a cabo en un gel de agarosa al 1 % (p/v) con TBE 10X (890 mM de Tris-base, 890 mM de ácido bórico, 20 mM de EDTA) en condiciones desnaturizantes.

Las muestras de RNA se prepararon de la siguiente manera: 1 μ L de ARN total se mezcló con 4 μ L de H₂O-DEPC y se adicionó 17 μ L del buffer desnaturizante (2.77 M de formamida, MOPS 10X, 12.3 M de formaldehído), posteriormente se incubó a 65 °C en

durante 5 minutos, terminado el tiempo se transfirió inmediatamente en hielo. Posteriormente se añadió 2 μL de buffer de carga (50% de glicerol, 1 mM de EDTA, 0.025% de azul de bromofenol, 10 mg/mL de bromuro de etidio). Las condiciones de corrida fueron 90 volts durante 30 min. Para documentar la integridad de las bandas del RNA, el gel se observó en un foto-documentador Biorad.

3.2.3. Análisis de la concentración del RNA total

El análisis de la concentración de RNA total se realizó mediante el uso de un nanodrop (modelo 2000). Se depositó 2 μL de la muestra en el sensor del equipo y se procedió a realizar las lecturas pertinentes. Las lecturas que son requeridas para verificar la pureza del RNA total son: 230 nm, 260 nm y 280 nm. A partir de estas lecturas se calculan las relaciones 260/230, 260/280 y la concentración de RNA total en ng/ μL presente en la muestra.

3.2.4. Tratamiento con DNasa

Para la síntesis de cDNA se requiere un RNA total libre de DNA, debido a que este puede amplificar y puede interferir con las reacciones subsecuentes. Por ello antes de realizar la síntesis del cDNA, el RNA fue tratado con DNasa libre de RNasa (Deoxiribonucleasa I, grado amplificación, de Invitrogen Cat. No. 18068-015). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10 μL , conteniendo: 1 μg de RNA total, 1 μL del amortiguador de reacción 10X DNase I (1X), 1 U/ μL de DNase I y agua libre de DNasa/RNasas, la reacción se incubó a temperatura ambiente durante 15 min, posteriormente se adicionó 1 μL 25 mM EDTA (2.5 mM) y por último se incubó a 65° C durante 10 minutos para desactivar la enzima DNasa 1.

3.2.5. Síntesis de la cadena sencilla de cDNA

Para realizar la síntesis de la primera hebra de cDNA se partió del RNA total previamente tratado con DNasa según el protocolo de Itzá (2011).

1.- Se preparó la reacción que se presenta a continuación:

Reacción 1:

Reactivo	[Final]	Vol. μL
RNA total 250 ng/ μL		5
Oligo (dT) / Cebadores Aleatorio	2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	1
dNTPs (10 mM)	0.50 mM	1
H ₂ O		5

2.- La reacción 1 se incubó a 65 °C por 5 min e inmediatamente después se incubó en hielo, a continuación se preparó la mezcla de la reacción 2 y se mezcló con la reacción 1.

Reacción 2:

Reactivo	[Final]	Vol. μL
First Strant Buffer 5X	1X	4
0.1 M DTT	0.01 M	2
RnaseOUT (40 U/ μL)	2 U/ μl	1
Superscript II (200 U/ μL)	10 U/ μl	1
Vol. Final		20

3.- La mezcla de la reacción 2 se incubó a 42° C durante 60 min en el caso de utilizar oligo (dT). En caso de utilizar cebadores aleatorios la reacción se incubó a temperatura ambiente durante 10 min y después se incubó 42° C durante 60 min.

4.- Posteriormente se incubó la reacción a 70° C durante 15 min e inmediatamente se transfirió a hielo y se almacenó a -80° C.

3.2.6. Síntesis de la doble cadena de cDNA

La síntesis de la doble hebra de cDNA, siguió el protocolo siguiente:

1.- Se preparó la reacción 3 que se presenta a continuación.

Reacción 3:

Reactivo	[Final]	Vol. μL
5X second Strand Buffer	1.3 X	17
dNTPs (10 mM)	0.25 mM	1.6
DNA Ligasa (10 U/ μL)	0.07 U/ μL	0.46
DNA polimerasa (10 U/ μL)	0.19 U/ μL	1.0
RNasa H (5 U/ μL)	0.02 U/ μL	0.26
Agua ultrapura		44.7
Vol. Final		65.0

2.- En un tubo Eppendorf de 0.2 mL, que contiene la reacción 3 se le adicionó 10 μL del producto de la síntesis de la hebra sencilla (volumen final de 75 μL) y se mezcló gentilmente. La mezcla se incubó a 16°C durante 2 h, posteriormente se incubó a 80°C por 15 min. La mezcla inmediatamente se transfirió a hielo.

3.2.7. Purificación de la doble hebra de cDNA

Una vez sintetizada la segunda hebra de cDNA, es preciso realizar la purificación de esta, debido a los componentes que sobrecarga el producto de esta reacción, pueden interferir con las amplificaciones posteriores. Para ello se realizó lo siguiente:

1.- El producto de la doble hebra se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL, se le adicionó 75 μL de agua ultrapura y se mezcló gentilmente.

2.- Se adicionó 1 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamilico (25:24:1), se mezcló con ayuda del vortex y posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm (16060 g) a temperatura ambiente. Se removió con mucho cuidado la fase acuosa y se transfirió a un tubo eppendorf nuevo de 1.5 mL.

3.- Se añadió 15 μL de acetato de sodio 3 M (pH 5.5) y 300 μL de etanol al 100% frio. Se mezcló gentilmente por inversión y posteriormente se incubó a -20°C durante 20 min.

4.-Transcurrido el tiempo se centrifugó a 13000 rpm (16060 g) por 30 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol al 70%, este paso se realizó dos veces.

5.- Por último se dejó secar la pastilla sobre papel estéril, aproximadamente 20 min. La pastilla se resuspendió con 40 μL de agua ultrapura y se guardó a -80°C hasta su posterior uso.

3.2.8. cDNA-SRAP

Para la realización del cDNA-SRAP se preparó la siguiente reacción.

Reactivo	[Inicial]	[Final]	Vol. μL
H ₂ O			10.25
Buffer	10X	1X	2
dNTPs	2 mM	0.250 mM	2.5
MgCl ₂	50 mM	2 mM	0.8
Me*	10 pmol	0.800 pmol	1.6
Em*	10 pmol	0.800 pmol	1.6
Taq Pol.	5 U/ μL	0.625 u/ μL	0.25
cDNA	50 ng/ μL	2.5 ng/ μL	1
Vol. Final			20

Se realizó la selección de 5 combinaciones de cebadores (Cuadro 3.2), los cuales presentaron mayor polimorfismo en trabajos previos (Itza, 2011; Youssef *et al* 2011).

Cuadro 3.2. Combinaciones de cebadores para el análisis mediante cDNA-SRAP.

Combinación	Cebador	Secuencia	Cebador	Secuencia
C1	Me-1	5'- TgAgTCCAAACCggATA -3'	Em-7	5'- gACTgCgTACgAATTATg -3'
C2	Me-3	5'- TgAgTCCAAACCggAAT -3'	Em-6	5'- gACTgCgTACgAATTgCA -3'
C3	Me-3	5'- TgAgTCCAAACCggAAT -3'	Em-3	5'- gACTgCgTACgAATTgAC -3'
C4	Me-4	5'- TgAgTCCAAACCggACC -3'	Em-7	5'- gACTgCgTACgAATTATg -3'
C5	Me-4	5'- TgAgTCCAAACCggACC -3'	Em-3	5'- gACTgCgTACgAATTgAC -3'

Las condiciones de la PCR para el cDNA-SRAP fueron las siguientes: un ciclo inicial a 94°C por 3 min, 5 ciclos a 94°C por 1 min, 35°C por 1 min, y 72°C por 1 min, seguidamente de 35 ciclos a 94°C , por 1 min, 50°C por 1 min, y 72°C por 1 minuto y una extensión final de 72°C por 5 minutos.

Para verificar los productos de PCR se separaron los fragmentos en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. Las condiciones de corrida del gel fue de 90 volts durante aproximadamente 1 hora.

3.2.9. Electroforesis en Geles de Poliacrilamida

El procedimiento para la realización de la electroforesis en gel de poliacrilamida de los amplicones de cDNA-SRAP fue el siguiente: se tomaron dos cristales, uno grande (42 cm) y uno pequeño (40 cm), se lavaron con agua destilada y etanol al 70%. El cristal pequeño se trató con 2mL de solución de binding silane (100 μ L de binding silane, 24.25mL de etanol al 96% y 750 μ L de ácido acético). Para un mejor resultado se agregó 1mL de binding silane a la parte superior e inferior del cristal, y se distribuyó en toda la superficie con un pañuelo desechable dejando secar aproximadamente 10 min.

El cristal grande se trató con Repel (comercial), se adicionó de 2 a 5 mL de Repel (comercial) en toda la superficie, distribuyéndose uniformemente con ayuda de un pañuelo desechable. Una vez secas las soluciones de ambos cristales, éstos se colocaron de la siguiente manera: la superficie tratada del cristal pequeño se colocó sobre la superficie tratada del cristal grande. En los extremos de los cristales, así como en la parte inferior se colocan separadores (0.4mm). Los cristales son apretados uno contra otro con ayuda de broches aprieta papel (Bacco). Una vez preparados los cristales se tomaron 70 ml de acrilamida al 6%, y se adicionó 245 μ L de persulfato de amonio al 25% y 40 μ L de TEMED, se mezcló vigorosamente y se vertió entre los cristales. Una vez vertida toda la solución se colocó el peine (.41 cm) en la parte superior de los cristales y se dejó polimerizar alrededor de 12 horas aproximadamente. Los cristales se ensamblaron en la cámara de electroforesis vertical (Marca Life Technologies modelo S2); y se adicionó amortiguador TBE 1X en el tanque superior así como en el tanque inferior del equipo. Posteriormente el gel se pre-corre a 2000 volts, 50 watts y 55 miliamperios, durante 30 minutos. Paralelamente, a cada unas de la reacciones de amplificación se le agregó 3 μ L de solución de buffer de carga (0.2 % de azul de bromofenol, 500 mM de EDTA (pH 8) y formamida al 37 %) por cada 10 μ L de muestra. A continuación se desnaturalizó la mezcla a 94°C por 5 minutos e inmediatamente se colocó en hielo. Terminada la pre-corrída, los pozos del gel se cargan con 10 μ L de la muestra desnaturalizada. Aplicando el mismo voltaje, la corrida finaliza tras salir el colorante en la parte inferior de los cristales, esto ocurre en aproximadamente 2 hrs.

3.2.10. Tinción con nitrato de plata

Al finalizar la electroforesis, se desmontaron los cristales. El cristal pequeño con el gel

adherido se separó del otro cristal y se remojó en 1L de agua destilada. Posteriormente se depositó en una solución de ácido acético al 10% durante 2 hrs con agitación constante. Pasado el tiempo, se retiró del ácido acético y el gel es lavado lavando 5 veces con 1.5 Lts de agua destilada durante 5 min para eliminar los restos de ácido acético. Posteriormente se colocó el gel en una solución que contienen nitrato de plata (1g/L) y 1.5 mL/L de formaldehído al 37% por 35 minutos en oscuridad, para el proceso de la tinción. Al finalizar los 35 minutos, se retiró el nitrato de plata y el gel se lavó con 1 L de agua destilada para remover el exceso del nitrato de plata, este proceso se realizó en ausencia de luz. Posteriormente para revelar los fragmentos, se adicionó una solución reveladora que contenía: carbonato de sodio (30g/l), formaldehído al 37% (1.5 mL/L) y 8 μ L/L de tiosulfato de sodio (0.2 g/mL), esta solución se enfrió previamente. El remojo del gel con esta solución se detuvo hasta que todas las bandas fueron visibles. Para detener la reacción de la solución reveladora, el gel se colocó en una solución de ácido acético al 10% durante 5 min y finalmente se lavó con agua destilada durante 3 min. Finalmente el gel se dejó secar hasta su posterior evaluación.

3.2.11. Análisis de bandas diferenciales

Para evaluar las bandas diferenciales de los transcritos de las muestras bajo estudio, se registró la presencia (1) y la ausencia (0) del marcador, para constituir una matriz binaria de datos. Esta matriz fue sometida al programa NTSYS-PC (versión 2.02), para calcular la similitud genética utilizando el coeficiente de Jaccard, obtenido por la expresión $J = A/(A+B+C)$; donde A representa el número de especie comunes con similitud A, B representa el número de especies comunes con similitud B y C representa el número de especies con similitudes comunes a A y B. Los valores de similitud de Jaccard obtenidos se utilizaron para generar un dendrograma mediante el procedimiento UPGMA (Unweighted Pair-Group with Arithmetic Mean).

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Análisis de RNA total extraído de los tejidos de la embriogénesis somática de dos cultivares de *Musa*

La extracción de RNA total de: callos embriogénicos (CE) de Dátil (AA), Manzano (AAB); y células de suspensiones celulares embriogénicas (SCE) de ambos genotipos, y embriones somáticos inmaduros y maduros derivados diferenciados a partir de las SCE de dichos genotipos se realizó aplicando el protocolo de Chomczynski & Sacchi, 1987 con las recomendaciones de Itza, 2011.

La integridad del RNA extraído se analizó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (Figura 3.1).

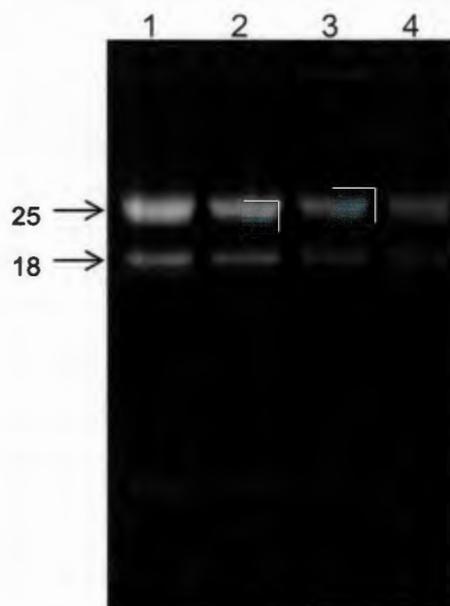


Figura 3.1. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. 1) RNA extraído de callo embriogénico, CE cv. Manzano, 2) RNA extraído de CE del cv. Dátil, 3) RNA extraído de SCE de Manzano, 4) RNA extraído de SCE de Dátil.

Como se aprecia en la figura 2.24, no se presentó ningún tipo de degradación del RNA durante la extracción, ya que no se observó ningún barrido de la molécula a lo largo de los carriles del gel. Asimismo se observó que la banda correspondiente a 25S del RNA, es del doble de tamaño respecto a la banda del 18S, lo cual sugiere que el RNA se encuentra

integro. Cabe señalar que el RNA fue separado en un gel de agarosa bajo condiciones desnaturalizantes lo que incrementa la definición de las bandas y se puede observar con claridad el grosor de éstas.

3.3.2. Cuantificación del RNA total extraído

La cuantificación del RNA total extraído del material vegetal seleccionado se realizó utilizando un nanodrop (Modelo 2000). Los resultados se presentan en el cuadro 3.3.

Cuadro 3.3. Concentración y relaciones de absorbancias de RNA total extraído del material biológico de: FM=flores masculinas, CE= callo embriogénico, SCE= suspensión celular embriogénica, Ein= embrión inmaduro, Ema= embrión maduro, EG= embrión germinado

Tejido	Genotipo	Relación 260nm/230nm	Relación 260nm/280nm	Concentración ng/ μ L
FM	Manzano	2.04	1.9	268.4
FM	Dátil	2.0	1.8	89.7
CE	Manzano	2.21	2.02	1207.6
CE	Dátil	2.08	2.0	799.2
SCE	Manzano	2.28	2.2	1226.2
SCE	Dátil	2.01	1.99	1433.6
T1-M (E in)	Manzano	2.10	2.03	750.7
T1-M (E ma)	Manzano	2.04	1.96	438.2
T2-M (E in)	Manzano	2.05	1.85	1082.5
T2-M (E ma)	Manzano	2.05	1.8	1037.2
T7-M (E ma)	Manzano	2.02	1.81	509
T2-M (EG)	Manzano	2.05	1.9	750.7
T5-M (EG)	Manzano	2.12	1,79	640.5
T1-D (E in)	Dátil	2.07	2.03	1150.2
T1-D (E ma)	Dátil	2.01	1.81	631.6
T9-D (E in)	Dátil	2.08	1.8	1014.8
T9-D (E ma)	Dátil	2.04	1.87	674.1
T13-D (E in)	Dátil	2.16	2.06	792.4
T13-D (E ma)	Dátil	2.01	1.81	250.6
T22-D (E in)	Dátil	2.04	2.01	1256.3
T22-D (E ma)	Dátil	2.13	2.02	1279.1
T13-D (EG)	Dátil	2.3	2.01	1269
T19-D (EG)	Dátil	2.02	1.89	815.4
T22-D (EG)	Dátil	20.1	1.86	676

.La relación de absorbancia A_{260nm}/A_{230nm} apoya en la detección de posible contaminantes como polisacáridos y polifenoles en la muestra extraída. El cociente de

esta relación debe ser ≥ 2 , indicando ello la ausencia de dichos compuestos en la muestra. Por otra parte, la relación de absorbancia $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ es ejemplo de posible contaminación por proteínas, el cociente debe tener un valor de 1.8 o 2, lo cual asegura la ausencia de contaminación y la pureza del RNA extraído.

Por los valores de las proporciones de absorbancia antes señaladas y obtenidos de nuestras muestras (Cuadro 3.3), consideramos que la aplicación del protocolo de Chomczynski y Sacchi (1987) fue eficiente, debido a que las relaciones obtenidas de $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ fueron entre 2.02 y 2.12, indicando que las muestras extraídas se encuentran libres de polifenoles. Por su parte las relaciones $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$, se aproximaron a 2 lo que indicó ausencia de contaminación por proteínas. Por tanto, las muestras estaban libres de impurezas. En cuanto a la concentración, el rango obtenido fue de 89.7-1433 $\text{ng}/\mu\text{L}$, lo cual mostró que el método es eficiente para la extracción de una alta concentración de RNA total. Una vez analizado la integridad y la pureza del RNA total extraído se realizó el tratamiento de este con DNasa y posteriormente poder realizar la síntesis de cDNA.

3.3.3. Síntesis de la hebra sencilla de cDNA

La síntesis de cDNA se realizó tal como se describió en la sección de materiales y métodos. Para la síntesis del cDNA se utilizaron cebadores denominados "Oligos dT", cuya función es unirse a la cola de poli-(A) en el extremo 3' de la secuencia del RNAm. Este cebador además deja un grupo -OH libre, para que la enzima transcriptasa reversa (RT) lo reconozca, y comience la síntesis de cDNA de hebra sencilla. También se emplearon cebadores aleatorios (RP, random primers), debido a que éstos se anclan aleatoriamente a las secuencias del RNA mensajero.

La síntesis de cDNA, se realizó a partir del RNA extraído del material vegetal seleccionado. El protocolo utilizado fue el recomendado por el proveedor (Superscript II, Invitrogen) y modificado por Itza (2010). Sin embargo, en el presente estudio se utilizaron ambos los "Oligo dT" y los cebadores aleatorios.

Los productos de la síntesis de cDNA se visualizaron en gel de agarosa al 1.5%. Para Oligo dT se observó un barrido tenue entre un peso aproximado de 200 y 600 pb (Figura 3.2). Este barrido indica que la síntesis de cDNA con Oligo dT se llevó a cabo

correctamente.

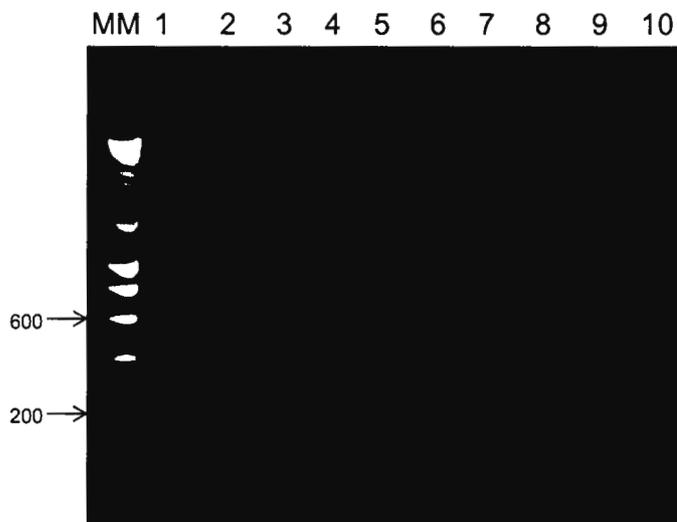


Fig. 3.2. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Síntesis de cDNA con Oligo dT. Carriles: MM, 1Kb Hyperladder (Bioline), 1) FM de Manzano, 2) FM de Mátíl, 3) CE de Manzano, 4) CE de Dátíl, 5) SCE de Manzano, 6) SCE de Dátíl, 7) T1-M (E in), 8) T1-D (E in), 9) T1-M (E ma), 10) T1-D (E ma).

De igual modo el producto de la síntesis de cDNA que resulto de utilizar cebadores aleatorios (RP) se visualizó en un gel de agarosa al 1.5 % (Figura 3.3). En este caso se observó un barrido intensó entre los 200 y 1037 pb. Además a la altura de 2000 pb se presentó una banda tenue, misma que representa la cadena hibrida de ARN que sirvió como templado para la síntesis de cDNA. Cabe señalar que en nuestro caso se podría utilizar la hebra sencilla de cDNA para efectuar la síntesis del cDNA-SRAP, esto debido a que los cebadores del cDNA-SRAP sirven de molde para la síntesis de la doble hebra de cDNA. Sin embargo, siguiendo la información de la literatura y la experiencia del grupo de trabajo, en el presente trabajo se decidió realizar la síntesis de la doble hebra del cDNA siguiendo el protocolo mencionado en materiales y métodos. A continuación se realizó una precipitación de la cDNA de doble cadena para tenerlo libre de impurezas y residuos que viene cargando a lo largo del proceso.

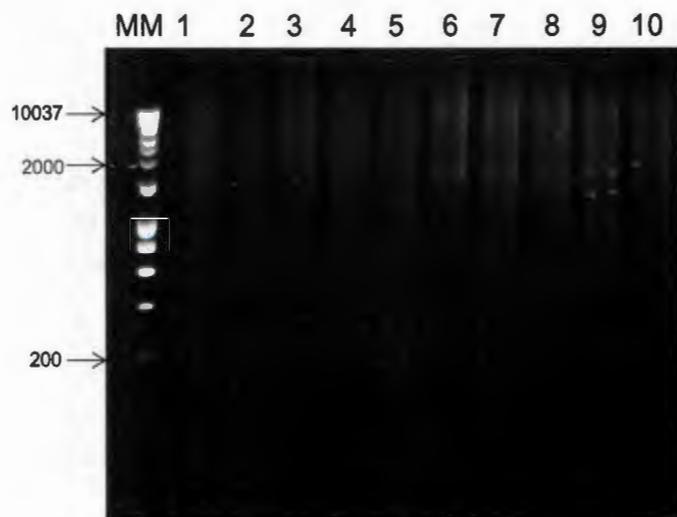


Fig. 3.3. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Síntesis de cDNA con RP. Carriles: MM, 1Kb Hyperladder (Bioline), 1) FM de Manzano, 2) FM de Dátil, 3) CE de Manzano, 4) CE de Dátil, 5) SCE de Manzano, 6) SCE de Dátil, 7) T1-M (E in), 8) T1-D (E in), 9) T1-M (E ma), 10) T1-D (E ma).

Una vez realizado la síntesis de la doble hebra del cDNA y la precipitación de dicho producto, se prosigió a su cuantificación en el nanodrop. Los resultados se presentan en el cuadro 3.4.

Cuadro 3.4. Concentración y relación de absorbancia del cDNA de doble hebra. FM=flores masculinas, CE= callo embriogénico, SCE= suspensión celular embriogénica, E in= embrión inmaduro, E ma= embrión maduro, EG= embrión germinado, RP= cebadores aleatorios.

Tejido	Genotipo	Relación 260nm/230nm	Relación 260nm/280nm	Concentración ng/μL (Oligo dT)	Concentración ng/μL (RP)
FM	Manzano	1.8	1.8	752.2	769.5
FM	Dátil	1.8	1.8	712.4	705.2
CE	Manzano	1.8	1.8	694.1	644.1
CE	Dátil	1.8	1.75	677	669.2
SCE	Manzano	1.8	1.72	668.3	736.4
SCE	Dátil	1.8	1.74	615.2	714.3
T1-M (E in)	Manzano	1.86	1.7	687.9	788.7
T1-M (E ma)	Manzano	1.82	1.71	656.4	714.6
T2-M (E in)	Manzano	1.85	1.7	741.6	717.8
T2-M (E ma)	Manzano	1.86	1.71	742.2	800.6
T7-M (E ma)	Manzano	1.87	1.67	685.8	734
T2-M (EG)	Manzano	1.81	1.71	721.4	694

T5-M (EG)	Manzano	1.84	1.71	670.6	730.9
T1-D (E in)	Dátil	1.88	1.71	656.7	737.5
T1-D (E ma)	Dátil	1.81	1.71	677.7	709.9
T9-D (E in)	Dátil	1.85	1.71	661	763.3
T9-D (E ma)	Dátil	1.82	1.74	619.9	666.5
T13-D (E in)	Dátil	1.81	1.71	662	733
T13-D (E ma)	Dátil	1.79	1.78	487.3	678.2
T22-D (E in)	Dátil	1.87	1.71	714	722.7
T22-D (E ma)	Dátil	1.85	1.74	778	706
T13-D (EG)	Dátil	1.8	1.8	712	712.3
T19-D (EG)	Dátil	1.81	1.79	768	607.6
T22-D (EG)	Dátil	1.81	1.73	734.8	456.9

Como se observa en el cuadro 3.4, los cocientes de la relación de A260nm/A230nm se encontraron entre 1.8 y 2, lo cual indica ausencia de polifenoles, mismos cuya presencia puede interferir con las amplificaciones futuras, estos compuestos pueden inhibir a la Taq polimerasa durante la amplificación. Los cocientes de las relaciones de A260nm/A280nm en el rango 1.5 y 1.8, indican ausencia de polisacáridos en la muestra de cDNA..

La concentración del cDNA sintetizado con Oligo dT tuvo un rango de 487 a 768 ng/μL, a su vez para cDNA sintetizado con cebadores aleatorios dicho rango estuvo entre 456 y 800 ng/μL. La obtención de una alta concentración de cDNA se debió probablemente a que se realizó de manera eficiente la síntesis de la doble hebra. También es importante recalcar que las relaciones de pureza son adecuadas, debido a que se partió de RNAm libre de impurezas.

3.3.4. Desarrollo del cDNA-SRAP para el análisis de fragmentos de transcritos de la maduración del embrión somático en dos cultivares de *Musa spp*

Para desarrollar la síntesis cDNA-SRAP primero se diluyó el cDNA de doble cadena a una concentración de 50 ng/μL, y luego se realizó la amplificación, para lo cual se manejaron 5 pares de cebadores seleccionados de trabajos previos (Youssef, 2011; Itza, 2011), (Cuadro 3.2). Cabe mencionar que las amplificaciones se realizaron para el cDNA sintetizado con Oligo dT y el cDNA sintetizado con cebadores aleatorios (RP). Una vez realizada las respectivas amplificaciones, el producto de PCR se corrió para todos los pares de cebadores en gel de acrilamida al 6%. Una vez realizada la electroforesis se desarrollo la tinción con nitrato de plata para visualizar los fragmentos de transcritos para

los diferentes tratamientos de maduración del embrión somático seleccionados (Figuras 3.4 y 3.5).

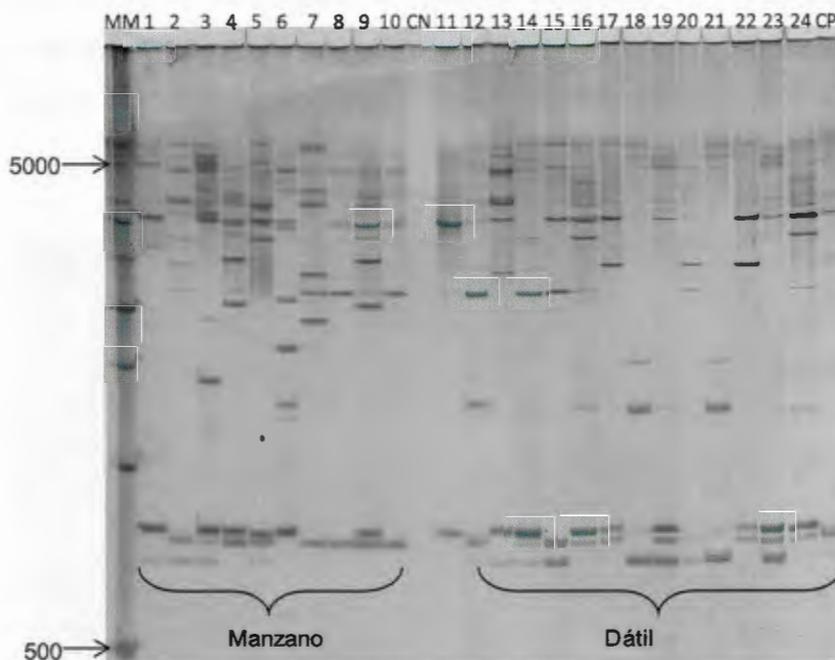


Figura 3.4. Gel de acrilamida al 6% teñido con nitrato de plata, combinación C2 con Oligo dT. Carriles: MM, 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen), 1) FM manzano, 2) CE manzano, 3) SCE manzano, 4) T1-M (E in), 5) T1-M (E ma), 6) T2-M (E in), 7) T2-M (E ma), 8) T7-M (E ma), 9) T2-M (EG), 10) T4-M (EG), 11) FM Dátil, 12) CE Dátil, 13) SCE Dátil, 14) T1-D (E in), 15) T1-D (E ma), 16) T9-D (E in), 17) T9-D (E ma), 18) T13-D (E in), 19) T13-D (E ma), 20) T22-D (E in), 21) T22-D (E ma), 22) T13-D (EG), 23) T19-D (EG), 24) T22-D (EG), CN= control negativo, CP= control positivo.

En la figura 3.4 se visualizan los transcritos para la combinación de cebadores C2 con el cDNA obtenido mediante Oligo dT. En dicha figura se aprecia que el bandeo de los transcritos es diferente para cada tejido así como para cada tratamiento. De tal manera que se delimitan claramente bandas diferenciales que se encuentran un único tejido o tratamiento. Las bandas diferenciales en un futuro darán información del transcrito presente en ese tejido o tratamiento, como se observa en los carriles 1, 2 y 3 que corresponden a distintos tejidos embriogénicos de manzano, sin embargo se visualizó un bandeo diferente para cada uno, y también se puede observar que hay bandas comunes

para estos tejidos. Por ejemplo, en el carril 3 que corresponde a suspensión celular embriónica (SCE) se puede apreciar una banda diferencial marcada por la flecha (Figura 3.5), esta banda no se encuentra en otro tejido o tratamiento para manzano. Así mismo hay bandas diferenciales para los tejidos y tratamientos de Dátil que van del carril 11 hasta el 24. Por lo que es importante evaluar la ausencia o presencia de estos transcritos por combinación de cebador.

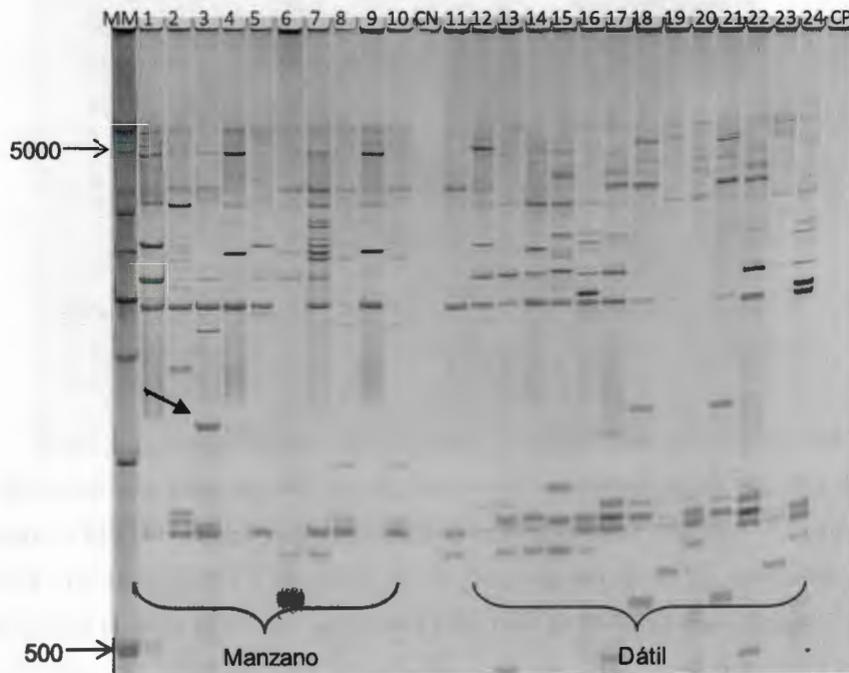


Figura 3.5. Gel de acrilamida al 6% teñido con nitrato de plata, combinación C2 con cebadores aleatorios. Carriles: MM, 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen), 1) FM Manzano, 2) CE Manzano, 3) SCE Manzano, 4) T1-M (E in), 5) T1-M (E ma), 6) T2-M (E in), 7) T2-M (E ma), 8) T7-M (E ma), 9) T2-M (EG), 10) T4-M (EG), 11) FM Dátil, 12) CE Dátil, 13) SCE Dátil, 14) T1-D (E in), 15) T1-D (E ma), 16) T9-D (E in), 17) T9-D (E ma), 18) T13-D (E in), 19) T13-D (E ma), 20) T22-D (E in), 21) T22-D (E ma), 22) T13-D (EG), 23) T19-D (EG), 24) T22-D (EG), CN= control negativo, CP= control positivo.

De igual manera se visualizaron los transcritos de cDNA-SRAP con cebadores aleatorios (Figura 3.5). En el carril 1 al 10 se corrieron muestras de los tejidos y tratamientos para el cv. Manzano, y en los carriles 11 al 25 los correspondientes del cv. Dátil. En dicha figura se puede observar un bandeo diferente para cada tejido o tratamiento, la idea de usar los

cebadores aleatorios es de que estos se pueden unir a aquellos mensajeros que se encuentran truncados o no contienen un cola poli (AAA). Por lo tanto es de esperar que el bandeo sea diferente con respecto a los transcritos obtenidos de Oligo dT. En la Figura 3.5 se aprecia señalado con una flecha un transcrito diferencial correspondiente SCE del cv. Manzano. Debido a esto se evaluó el porcentaje de polimorfismo de cada combinación de cebadores, así como el número de bandas diferenciales por combinación de cebadores, tanto para cDNA sintetizado con Oligo dT como para aquel sintetizado con cebadores aleatorios.

3.3.5. Análisis de las bandas diferenciales

En el cuadro 3.5 se presenta la información sobre el número de bandas diferenciales así como el porcentaje de polimorfismo generado por cada combinación de cebadores utilizado con el cDNA generado con Oligo dT y cebadores aleatorios (RP) para los genotipos de los cvs. Manzano y Dátil. El porcentaje de polimorfismo se obtuvo del cociente de la bandas polimórficas entre el número de bandas totales por combinación. Las bandas polimórficas son aquellas bandas en donde hay presencia de un transcrito en uno o varios tejidos o tratamientos y se encuentra ausente en otros. En la figura 3.6 se aprecia la presencia de transcritos diferenciales los cuales corresponden en la región de entre 500 y 650 pb señalados por las flechas. Se aprecia así mismo un transcrito señalado con una flecha, en flores masculinas (FM), suspensión celular embriogénica (SCE), T1-M (E in), T1-M (E ma), T2-M (E in) y T2-M (EG), , pero ausente en callo embriogénico (CE), T2-M (E ma) y T7-M (E ma). Por lo que se considera una banda polimórfica ya que se encuentra en algunos tejidos o tratamientos pero ausente en otros.

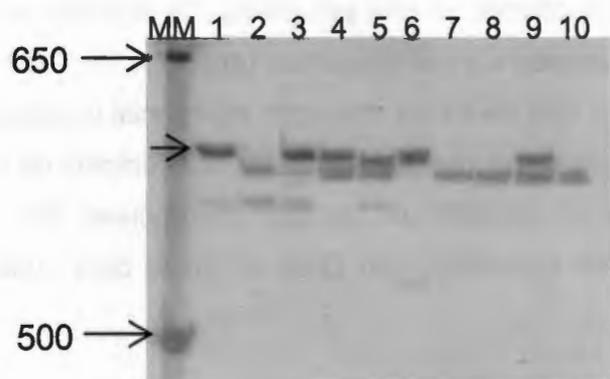


Figura 3.6. Transcritos diferenciales visualizados en un gel de acrilamida al 6%. Carriles: MM, 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen), tejidos analizados: 1) FM, 2) CE, 3) SCE, y tratamientos de maduración del embrión somático, 4) T1-M (E in), 5) T1-M (E ma), 6) T2-M (E in), 7) T2-M (E ma), 8) T7-M (E ma), 9) T2-M (EG), 10) T4-M (EG)

Los resultados de cDNA-SRAP para las combinaciones C1-oligo dT a C5 oligo dT con el material biológico del cv. Manzano mostraron un polimorfismo del 100% (Cuadro 3.5). Esto significa que todas las bandas fueron polimórficas. Asimismo las combinaciones de cebadores C1 y C2 usando el cDNA generado con RP, también arrojó un porcentaje de polimorfismo del 100%, la combinación que dio menor porcentaje fue la C4-RP con 92%. Sin embargo se observó que las combinaciones que usaban cDNA generado con RP exhibieron mayor número de bandas diferenciales, siendo que las combinaciones con RP produjeron un total de bandas de 93 bandas, en tanto que las combinaciones con Oligo dT resultaron en un total de 58 bandas correspondientes a transcritos.

Cuadro 3.5. Numero de bandas diferenciales y porcentaje de polimorfismo para 5 combinaciones de cebadores SRAP utilizadas con el cDNA generado por Oligo dT y cebadores aleatorios (RP), para los diferentes tejidos y tratamientos de maduración de embriones somáticos de los cvs. Manzano y Dátil.

Genotipo	Combinación	No. de bandas diferenciales		% de polimorfismo
Manzano	C1-Oligo dT	14	58	100
	C2-Oligo dT	13		100
	C3-Oligo dT	9		100
	C4-Oligo dT	13		100
	C5-Oligo dT	9		100
	C1-RP	37	93	100
	C2-RP	8		100
	C3-RP	22		95
	C4-RP	18		92
	C5-RP	8		96
Dátil	C1-Oligo dT	11	43	100
	C2-Oligo dT	6		100
	C3-Oligo dT	6		96
	C4-Oligo dT	10		100
	C5-Oligo dT	10		100
	C1-RP	18	59	100
	C2-RP	13		100
	C3-RP	7		89
	C4-RP	18		100
	C5-RP	21		100

Para el cv. Dátil se observó que las combinaciones C1-Oligo dt, C2-Oligo dT, C4-Oligo dT y C5-Oligo dT presentaron un porcentaje de polimorfismo del 100%, en tanto que la combinación C3-Oligo dT fue del 96% (Cuadro 3.5). De igual forma se observó que las bandas diferenciales variaron de una combinación a otra, el número de bandas totales para las combinaciones con Oligo dT fueron 43. Por otra parte para combinaciones usando cebadores aleatorios (RP) se observó que las C1-RP, C2-RP, C4-RP y C5-RP obtuvieron un 100% de polimorfismo, sin embargo con la combinación C3-RP se obtuvo solo un 89%. A su vez el total de bandas diferenciales para combinaciones con Oligo dT fue de 43, y para combinaciones con cebadores aleatorios es de 77. Nuevamente las combinaciones con RP generaron mayor número de bandas respecto las combinaciones

con Oligo dT. Esto no quiere decir que sea más recomendable usar cebadores aleatorios para la síntesis de cDNA, dado que estos se pegan aleatoriamente, por lo que podrían ser ARN mensajeros truncados a diferencia del Oligo dT que se une a la cola poli (AAA) de los ARN mensajeros. El empleo de ambos es recomendable debido a que la información de ambos nos puede ayudar en un futuro a aislar genes de importancia para conocer más a fondo el proceso de la embriogénesis somática en *Musa*

3.3.6. Diversidad de transcritos diferenciales en tejidos embriogénicos y floral de *Musa acuminata* x *M. balabisiana* AAB cv. Manzano y *M. a.* AA cv. Dátil

Se construyeron dendogramas con el fin de representar la similitud de transcritos expresados durante la embriogénesis somática, así como durante la maduración del embrión somático de dos diferentes cultivares de *Musa* y visualizar tanto la agrupación y como la separación de transcritos expresados en dichos tejidos y/o tratamiento de maduración. Los dendogramas se construyeron para el genotipo AAB cv. Manzano y AA cv. Dátil, de igual manera se dividió los transcritos generados mediante cDNA-SRAP por el empleo de Oligo dT o cebadores aleatorios (RP) durante la síntesis de cDNA, como se ejemplifica en las Figuras 3.7 a 3.10.

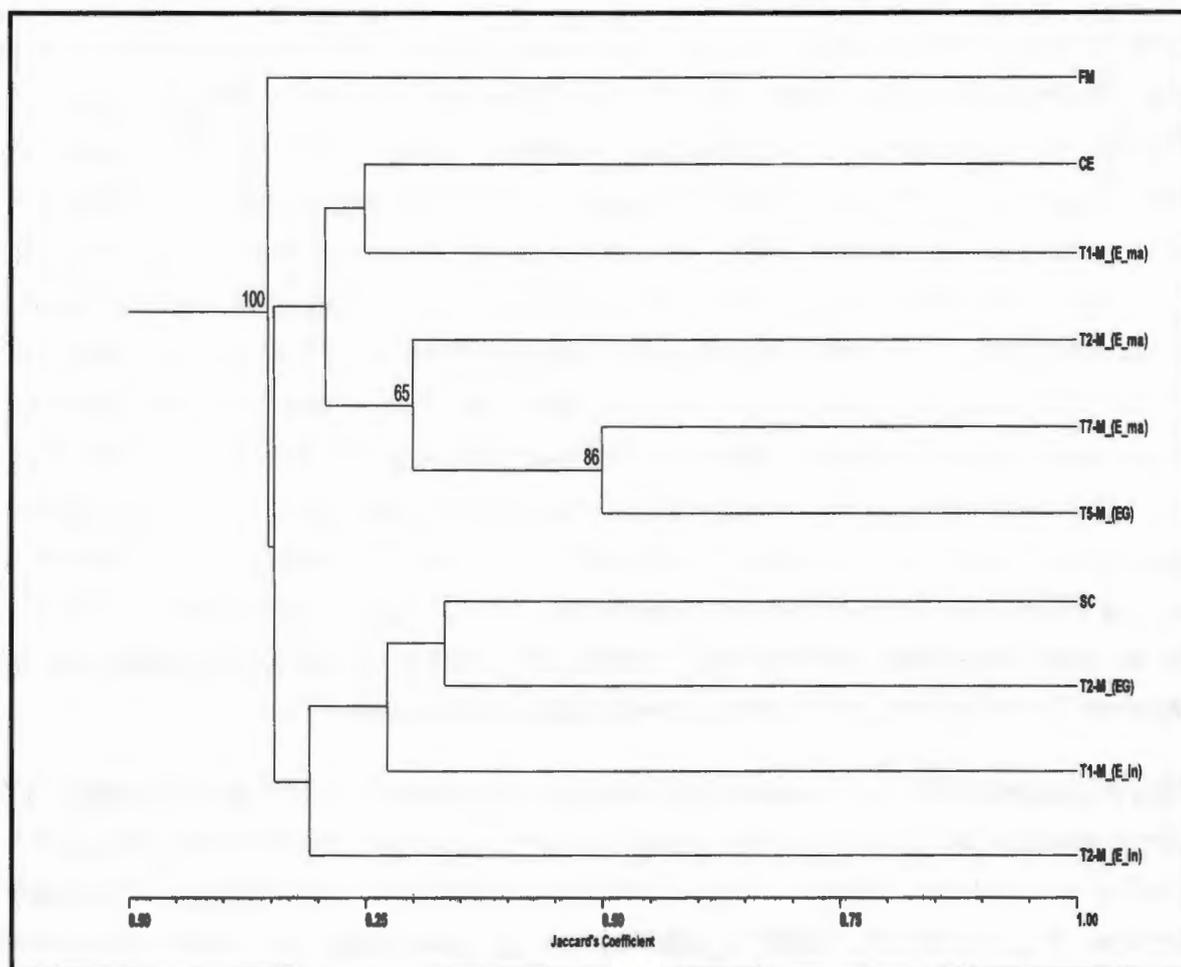


Figura 3.7. Dendrograma de la similitud genética formado del análisis de conglomerados cDNA-SRAP UPGMA, de acuerdo al coeficiente de Jaccard, para tejidos y tratamientos de maduración de Manzano, empleando Oligo dT para la síntesis de cDNA. FM= Flores masculinas, CE= callo embriogénico, SC= suspensión celular embriogénica, E in= embrión inmaduros, E ma= embrión maduro, EG= embrión germinado. Los números arábigos indican el soporte de significancia del Bootstrap.

El dendrograma de la Figura 3.7 presenta el agrupamiento de los transcritos según el tejido o tratamiento de maduración del embrión somático del cv. Manzano, cuando se empleo Oligo dT para la síntesis de cDNA. Se observa un clado que se divide y forma dos grupos, y una rama el cual el primero contiene a las flores masculinas (FM), esto es puede deberse a que no es un tejido embriogénico o que se encuentre *in vitro*, sin embargo a partir de este tejido se partió para la inducción de la embriogénesis. La segunda

ramificación contiene a todo el material que se encuentra *in vitro* por lo que puede verse una diferencia entre el tejido que no se encuentra *in vitro* y aquellos que sí. Posteriormente el clado que contiene a los tejidos *in vitro* se ramifica en 2 grupos: El primer grupo que contiene a callo embriogénico (CE) y tratamientos de maduración, así como embriones germinados (EG); y el segundo grupo que contiene a las suspensiones celulares (SC), tratamientos de maduración y embriones germinados. En el primer grupo se observó que el callo embriogénico tiene una similitud con el T1-M (E ma), estos son tejidos embriogénicos con expresión de embriones, debido a esto pueden agruparse de esta manera. Se observa que de igual manera que el T7-M (E ma) se agrupa con T5-EG y estos dos se encuentran en el mismo clado con T2-m (E ma), por lo que los embriones maduros se asocian con el embrión germinado. En el segundo grupo se puede observar que los embriones inmaduros de los tratamientos T1-M y T2-M no se agrupan con nadie, sin embargo tienen una similitud con el clado que contiene transcritos de suspensiones celulares y a embriones germinados provenientes del tratamiento T2-M.

Para el agrupamiento de transcritos usando cebadores aleatorios (RP) para manzano, se puede observar la Figura 3.8. Este muestra el dendograma el cual el clado principal se ramifica en 2 grandes grupos, uno que contiene al tratamiento T2-M (E in) y el otro que contiene al resto de los tejidos y tratamientos de maduración, así como embriones germinados. En el segundo grupo se observa que las flores masculinas nuevamente se separa del resto del material *in vitro*. Posteriormente se observó que el T1-M (E in) se asocia con el embrión germinado proveniente del tratamiento T2-M, sin embargo estos tienen una similitud con el callo embriogénico. Así mismo la suspensión celular de manzano se encuentra en el clado que contiene a los transcritos provenientes de embriones maduros de los tratamientos T1-M y T7-M, así como de embriones germinados proveniente del tratamiento T5-M.

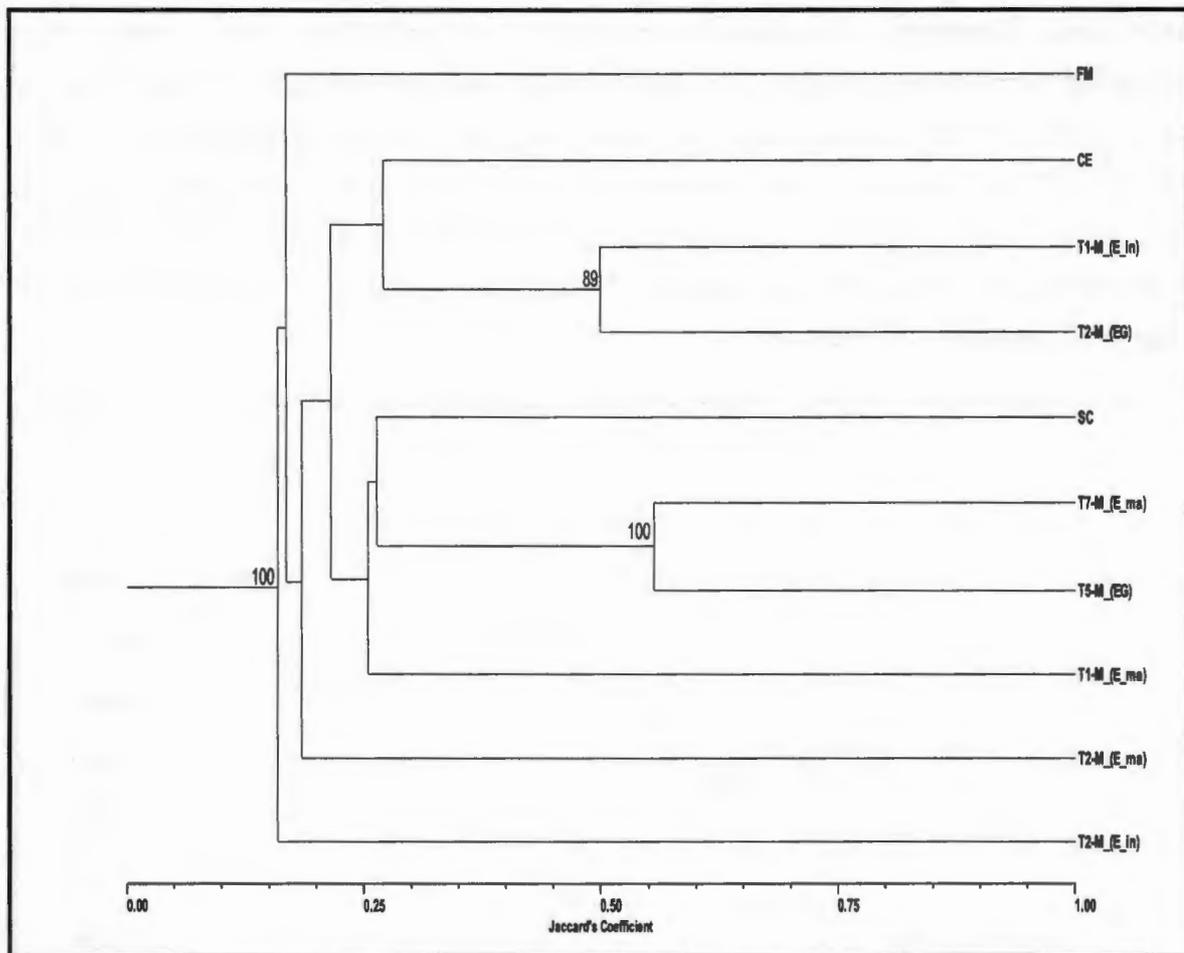


Figura 3.8. Dendrograma de la similitud genética formado del análisis de conglomerados cDNA-SRAP UPGMA, de acuerdo al coeficiente de Jaccard, para tejidos y tratamientos de maduración de Manzano, empleando cebadores aleatorios (RP) para la síntesis de cDNA. FM= Flores masculinas, CE= callo embriogénico, SC= suspensión celular embriogénica, E in= embrión inmaduros, E ma= embrión maduro, EG= embrión germinado. Los números arábigos indican el soporte de significancia del Bootstrap.

Para la asociación de transcritos para Dátil se observa la figura 3.9, el cual es el dendrograma empleando Oligo dT para la síntesis de cDNA. Se observó dos grupos: el primero que contiene a las flores masculinas, las cuales no se agrupa con ninguno tratamiento, por lo que es de esperarse. Posteriormente el callo embriogénico se agrupa con embriones maduros del tratamiento T1-D, estos se tienen una similitud con la suspensión celular ya que están en el mismo clado. Esta agrupación puede deberse a que

estos tienen expresión de embriones por lo que comparten transcritos durante estos procesos de la embriogénesis. Se puede observar que los tratamientos T9-D (E in) se agrupa con embriones germinados de tratamiento T22-D, estos comparten una similitud con T1-D (E in). De igual manera en este grupo se observa el agrupamiento de T13-D (E ma) con el T19-D (EG). En el segundo grupo importante se agrupan la mayoría de los tratamientos con embriones inmaduros (T13-D y T22-D) y un tratamiento con embrión maduro el cual es el T22- (E ma).

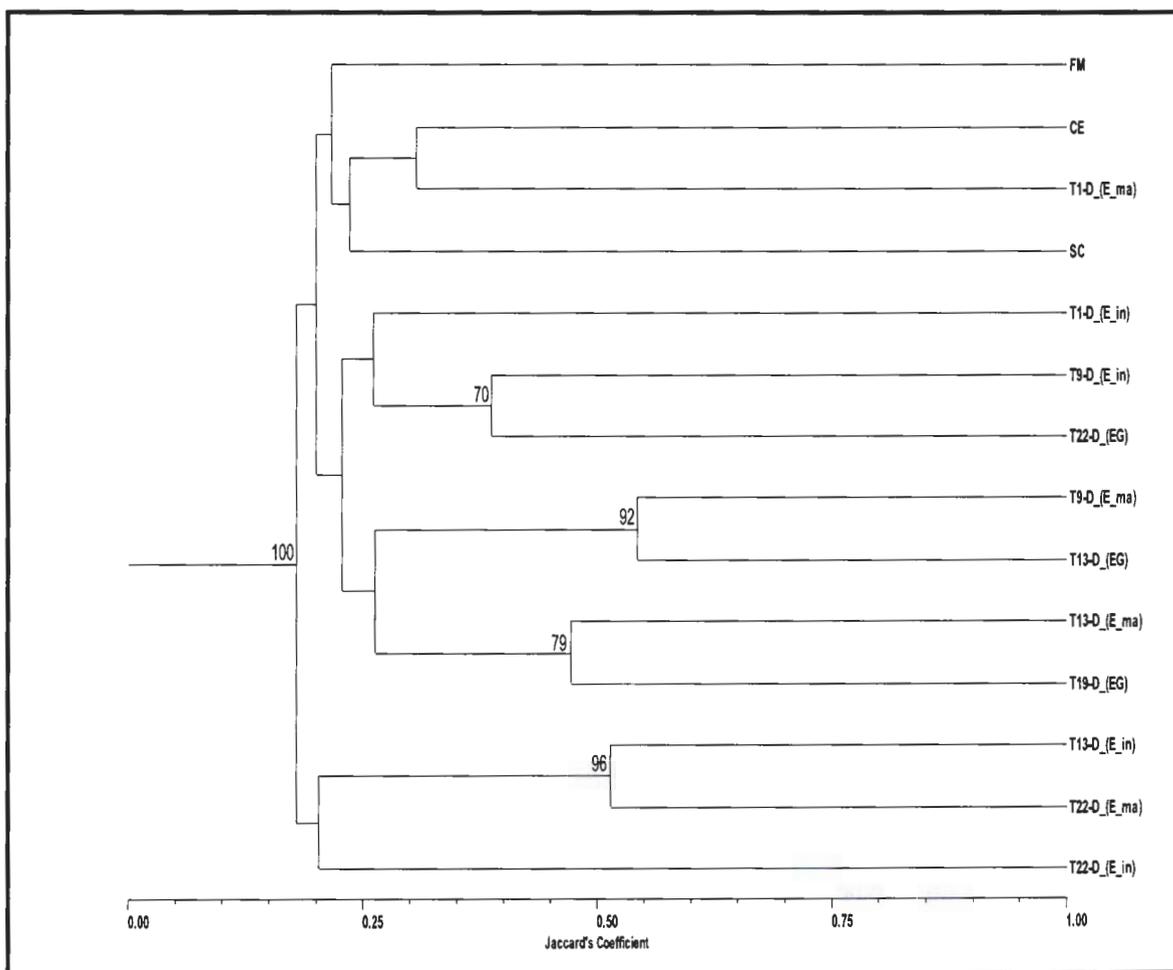


Figura 3.9. Dendrograma de la similitud genética formado del análisis de conglomerados cDNA-SRAP UPGMA, de acuerdo al coeficiente de Jaccard, para tejido y tratamientos de maduración de Dátil, empleando Oligo dT para la síntesis de cDNA. FM=Flores masculinas, CE= callo embriogénico, SC= suspensión celular, E in= embrión inmaduros, E ma= embrión maduro, EG= embrión germinado Los números arábigos indican el soporte de significancia del

Bootstrap.

Por último la asociación de transcritos para Dátil con cebadores aleatorios (RP) se muestra en la figura 3.10. Se observó de manera notoria nuevamente que las flores masculinas se encuentra en un clado separado del material *in vitro*. En el primer grupo observado se asocia el tratamiento T13-D (E in) con el T22-D (E ma), estos se encuentran separados de los demás tratamientos. Lo cual indica que no comparte una similitud de transcritos con los demás. En el segundo grupo el cual contiene en un clado sin agrupamiento a la suspensión celular (SC) y en otro al resto de los tratamientos, se observó un agrupamiento del callo embriogénico (CE) con el tratamiento T1-D (E in). De igual manera hubo un agrupamiento de los embriones germinados con tratamientos que contienen embriones maduros e inmaduros. Esto es notorio en casi todo los dendogramas obtenidos para Manzano y Dátil, por lo que es importante estudiar en un futuro estos transcritos relacionados a la maduración y germinación del embrión.

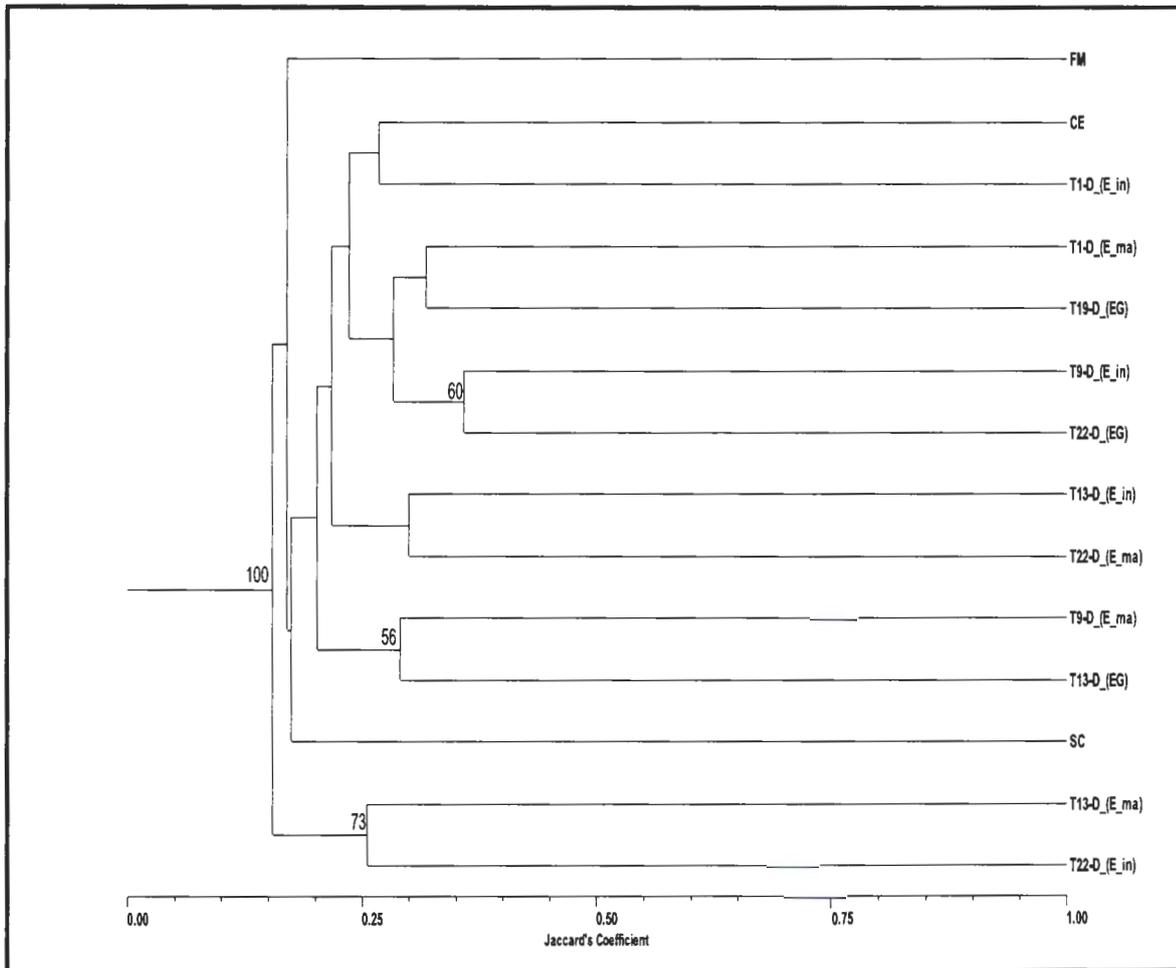


Figura 3.10. Dendrograma de la similitud genética formado del análisis de conglomerados cDNA-SRAP UPGMA, de acuerdo al coeficiente de Jaccard, para tejido y tratamientos de maduración de Dátil, empleando cebadores aleatorios (RP) para la síntesis de cDNA. FM= Flores masculinas, CE= callo embriogénico, SC= suspensión celular, E in= embrión inmaduros, E ma= embrión maduro, EG= embrión germinado Los números arábigos indican el soporte de significancia del Bootstrap.

3.4. DISCUSIÓN

Por otra parte, cabe señalar que a la fecha según nuestra revisión bibliográfica realizada este es el primer trabajo en *Musa* donde se realiza el análisis de la expresión diferencial de transcritos relacionados con eventos fisiológicos del desarrollo de los embriones somáticos, i.e., embriones inmaduros, maduros y germinados de embriones sometidos a tratamientos de maduración, mediante el sistema cDNA-SRAP.

El sistema cDNA-SRAP ha sido utilizado en estudios de detención de genes responsivos (Choochai *et al.*, 2007), para estudios del transcriptoma (Xu *et al.*, 2011) y para estudios de la expresión de genes diferenciales (Que *et al.*, 2012). Por lo que este sistema es útil para analizar la expresión de numerosos diferencial de transcritos presentes para los diferentes tejidos embriogénicos y estadios de desarrollo del embrión.

Para el presente estudio se empleo Oligo dT y cebadores aleatorios (RP) en la síntesis de la hebra sencilla de cDNA. En diversos reportes se utiliza cDNA de hebra sencilla (Que *et al.*, 2012). Asimismo, en nuestro grupo de trabajo Itza (2011) realizó el estudio de transcritos para dos genotipos de *Musa* y realizó la síntesis de cDNA de hebra sencilla y con los cebadores SRAP sintetizo el cDNA-SRAP, no obstante, en sus geles se observan bandas inespecíficas, y dobletes. Debido a lo mencionado decidimos trabajar con el cDNA de doble hebra y posteriormente se realizó la síntesis de cDNA-SRAP. Esta modificación metodológica incrementó grandemente la resolución de los transcritos diferenciales en los geles de acrilamida y se observaron bandas más definidas. En un estudio reciente sobre los patrones de del transcriptoma en relación a la respuesta de *Dioscorea zingiberensis* a altas temperatura, Xu *et al* (2011) utilizó doble hebra de cDNA para realizar la síntesis de su cDNA-SRAP.

En nuestro estudio logramos obtener 271 bandas diferenciales con ayuda de 5 combinaciones de cebadores, utilizando Oligo dT y cebadores aleatorios para la síntesis de cDNA. El porcentaje de polimorfismo fue alto de 86 al 100%, según la combinación de cebadores empleada, en comparación con el estudio realizado por Itza (2011) quien obtuvo valores de polimorfismo de 65 y 81%. Considerando que en nuestro estudio se obtuvo una mayor resolución de bandas, estas pueden ser aisladas y secuenciadas para su posterior análisis bioinformático.

Para el análisis de la diversidad de transcritos se observó que las flores masculinas no se agrupan con los tejidos embriogénicos, por lo que era de esperarse, debido a que este es un tejido floral. Así mismo el agrupamiento de tratamientos que contienen embriones maduros y tratamientos con embriones germinados, esta agrupación puede deberse a transcritos presentes en ambos tejidos, que comparten posteriormente una función para el embrión. Por lo que la información que se obtuvo puede ser usada para realizar estudios sobre la identidad de los transcritos, una vez secuenciadas dichas bandas.

BIBLIOGRAFÍA

- Chomczynski P. y N. Sacchi (1987). Singel step method of RNA isolation by guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162: 156-159.
- Choochai N. y P. Padrit (2007). Detection responsive gene in KDML, 105 rice (*Oryza sativa* L.) using cDNA-SRAP technique. *Natural Science*, 41:651-659.
- Itza, J. (2011). Polimorfismo de transcritos en la embriogénesis somática de *Musa* cv. AAA mediante cDNA-SRAP. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY). Mexico. 81 p.
- Que, Y., Xu, L., Lin, J., Xu, J., Zheng J. y R. Chen (2012). cDNA-SRAP and its application in differential gene expression analysis: A case study in *Erianthus arundinaceum*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012: 1-8.
- Xu, Y., Yang, F., Tian, X., Zhang, W., Wang X. y G. Ma (2011). Different patterns of transcriptomic responses to high temperature between diploid and tetraploid *Disocorea zingiberensis*. *African Journal of Biotechnology*, 44: 8847-8854.
- Youssef, M., James, A.C. Rivera-Madrid, R., Ortiz R. y R.M. Escobedo-GraciaMedrano (2011). *Musa* Genetic Diversity Revealed by SRAP and AFLP. *Molecular Biotechnology*, 47: 189-199.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

4.1. CONCLUSIONES

La inducción de embriogénesis somática se logró en un 16% y 10.9% de formación de callo embriogénico en el cv. Dátil (AA) y el cv. Enano gigante (AAA) clon francés, respectivamente.

La edad fisiológica de las flores inmaduras dada por la posición de las manos en la inflorescencia masculinas y la edad de esta se correlaciona con la respuesta de formación de callo embriogénico.

La baja respuesta de proliferación de callo embriogénico del cv. Enano gigante, dio como consecuencia la falta de material embriogénico para la inducción de suspensiones celulares, razón por la cual se sustituyó este genotipo por el cv. Manzano (AAB).

El desarrollo y maduración de embriones somático de los cv. Manzano y Dátil se logró partiendo de suspensiones celulares embriogénicas de ~ 4 a 6 meses de edad de haber sido iniciadas y filtradas 2 veces.

La filtración de las suspensiones ayudo a “sincronizar” en ellas la foramcion de embriones bi-celulares, pro-embriones globulares, y pequeños agregados embriogénicos.

El tratamiento de maduración T2-M fue en el que se logró mayor porcentaje (79%) de embriones maduros del cv. Manzano, y se relaciona con la adición de extracto de malta al medio de cultivo.

En el cv. Dátil bajo el tratamiento T6-D se logró un 85% de embriones maduros, pero la germinación en este cultivar no incrementó considerablemente.

Los mejores tratamientos de maduración para el cv. Manzano fueron 4-M y T6-M, bajo estas condiciones de maduración se alcanzaron mayores porcentajes de germinación i.e., 47 y 42%, respectivamente.

Para el cv. Dátil se obtuvieron bajas respuesta de germinación, siendo el tratamiento T22-

D quien obtuvo una mejor respuesta con un 12% de embriones germinados. Este tratamiento fue el segundo mejor en la obtención de embriones maduros, por lo que este tratamiento puede ser usado en un futuro para este cultivar.

Se logró visualizar 271 transcritos diferenciales del proceso de embriogénico en los cultivares Datil y Manzano, con 5 combinaciones de cebadores, empleando Oligo dT y cebadores aleatorios (RP) para la síntesis de cDNA.

Las 5 combinaciones de cebadores SRAP dieron altos porcentajes de polimorfismo, 86 al 100%, lo cual nos indico que hubo una gran variedad de transcritos en el material floral y tejidos embriogénicos.

Se definieron 271 TDFs para ser secuenciados y estudiar en lo futuro el transcriptoma del proceso de desarrolló y maduración del embrión somático en Musáceas.

4.2. PERSPECTIVAS

Realizar experimentos sobre el efecto del volumen de suspensión embriogénica y la densidad celular que se inoculada, para buscar la mejor relación de estos parámetros y desarrollo de embriones para que no compitan por espacio y nutrientes.

Realizar análisis morfo-histológicos del proceso de maduración conjuntamente con el análisis bioquímico de los perfiles de proteínas para definir el concepto de embrión maduro.

Validar la reproducibilidad del experimento de maduración para los cv. Manzano y Dátil.

Aislar las bandas de los fragmentos de transcritos diferenciales TDFs y realizar la secuenciación directa, además de clonar los TDF y secuenciarlos.

Realizar los análisis bioinformáticas de bandas diferenciales obtenidos con ayuda del marcador molecular cDNA-SRAP.

Validar el patron de expresión de genes candidatos involucrados en actividades fisiológicas durante la maduración del embrión somático mediante PCR tiempo real.

Aislar los genes candidatos relacionados con la maduración del embrión somático y estrés

osmótico.

ANEXOS

Anexo 1

Componentes	MA1		M1/30		M1/60		M2		MG	
	Π inicial	Volumen _{final}								
Macroelementos	10x	100 mL/L	10x	50 mL/L	10x	50 mL/L	10x	100 mL/L	10x	100 mL/L
Microelementos	50x	20 mL/L								
Vitaminas	MS (100x)	10 mL/L	Morel (100x)	10 mL/L	Morel (100x)	10 mL/L	MS (100x)	10 mL/L	MS (100x)	10 mL/L
Minerales	100x	10 mL/L								
Sacarosa	87 mM	30 g/L	87 mM	30 g/L	174 mM	60 g/L	87 mM	30 g/L	87 mM	30 g/L
2,4-D	18 μ M	4 mL/L	4.52 μ M	1 mL/L	4.52 μ M	1 mL/L	4.52 μ M	1 mL/L	-	-
AIA	5.71 μ M	1 mL/L	-	-	-	-	-	-	-	-
ANA	5.4 μ M	1 mL/L	-	-	-	-	-	-	-	-
Glutamina	-	-	-	-	-	-	680 μ M	100 mg/L	-	-
Extracto de malta	-	-	-	-	-	-	100 mg/L	-	-	-
Biotina	4.1 μ M	1 mL/L	-	-	-	-	4.1 μ M	1 mL/L	-	-
KH ₂ PO ₄	-	-	200 mL/L	10 mL/L	200 mL/L	10 mL/L	-	-	200 mL/L	10 mL/L
Gelrite	-	2 g/L	-	2 g/L	-	2 g/L	-	-	-	2.5 g/L
pH	-	5.7	-	5.8	-	5.8	-	5.3	-	5.8

MA1= Medio de inducción

M1/30= Medio de proliferación

M1/60= Medio de proliferación

M2= Medio de suspensiones celulares

MG= Medio de germinación.

