



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**REGENERACIÓN IN VITRO Y VARIACIÓN
SOMACLONAL EN MUSA SPP., EVALUADA
MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES**

Tesis que presenta

PABLO LÓPEZ GÓMEZ

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2015

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 *REGENERACIÓN IN VITRO Y VARIACIÓN SOMACLONAL EN MUSA SPP., EVALUADA MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES* fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. Rosa María Escobedo Gracia Medrano, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Manuel Martínez Estévez

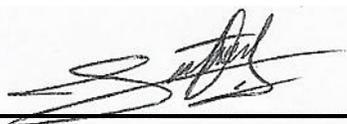
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, 09 de septiembre de 2015.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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

Firma: _____



Nombre: Ing. Pablo López Gómez

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C., y forma parte del proyecto titulado **“Análisis comparativo de los transcriptomas de los embriones somáticos inmaduros y maduros de plátano (*Musa spp.*)”**, bajo la dirección de la Dra. Rosa María Escobedo Gracia Medrano.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C., por prestar sus recursos humanos y materiales para llevar a cabo mis estudios de posgrado y desarrollo de trabajo de investigación en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico mediante la beca otorgada No. 369555.

A la Dra. Rosa Ma. Escobedo Gracia-Medrano por aceptarme para formar parte de su grupo de trabajo, por la asesoría y dirección durante el desarrollo de este trabajo de investigación; así como por los consejos para mi desarrollo personal.

A mi comité tutorial integrado por la Dra. Rosa Ma. Escobedo Gracia-Medrano, Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas y Dr. Leobardo Iracheta Donjuan del INIFAP-CERI, por sus valiosas aportaciones y recomendaciones durante el desarrollo de este trabajo de investigación y mi formación académica en cada examen tutorial.

Al jurado de examen integrado por la Dra. Rosa Ma. Escobedo Gracia-Medrano, Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas, Dra. Ma. De Lourdes Miranda Ham, Dr. Felipe A. Vásquez Flota y al Dr. Leobardo Iracheta Donjuan del INIFAP-CERI, por la revisión y observaciones hechas a la tesis.

A los técnicos del laboratorio 22 de la UBBMP del CICY, M. en C. José Roberto Ku Cauich y M. en C. Lucila Aurelia Sánchez Cach, por su apoyo técnico en el campo y laboratorio.

Al Dr. Muhammad Elkhirshy Youssef y cDr. Adrián José Enríquez Valencia por su valiosa asesoría en la proliferación del callo embriogénico y en el análisis de polimorfismo con marcadores moleculares.

A la cDr. Ángeles Guadalupe Mayorga López y M. en C. Sadrac Jefte Baeza Lizama por su apoyo y asesoría en la toma de fotos.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 22, Adrián José Enríquez Valencia, Sadrac Jefte Baeza Lizama, Carlos I. Cruz Cárdenas, Emilia Chale Balam, Ariela Fuentes

Basteris, Jesús Alberto Medina Baeza y Eduardo Francisco Borges Chi.

A mis compañeros de generación (agosto 2013-julio 2015), del programa de maestría en ciencias biológicas de la opción Bioquímica y Biología Molecular del CICY.

DEDICATORIAS

A Dios: primeramente por darme la vida, salud, su gran bondad e interminables bendiciones y permitirme dar un paso más en mi desarrollo profesional, porque todo lo puedo en Ti, que me fortaleces.

A mis padres: Ofelia Gómez Sántiz y Pablo López Gómez, por ser mis guías en el camino de la vida, el apoyo incondicional y que sin ustedes este camino habría sido aún más difícil, les dedico este trabajo con todo mi amor y profundo respeto.

A mí amada esposa: María Dolores Sántiz Gómez por su amor, comprensión, apoyo incondicional, ser mi fortaleza y porque este logro es de nuestra familia ya que juntos salimos de los momentos difíciles y disfrutamos los momentos de alegría que esta etapa de nuestra vida nos dio.

A mis hijos: Pablo David López Sántiz y Limberg Nahum López Sántiz porque ustedes son lo mejor que me ha pasado y el mejor motivo para seguir adelante, les dedico este trabajo con mucho cariño y amor.

A mis hermanos: Blanca Estela, Ezequiel y Sandra Patricia: les dedico este trabajo con mucho amor por sus consejos y ánimos.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	5
ANTECEDENTES	5
1.1 EL GÉNERO <i>MUSA</i>	5
1.2 TAXONOMÍA DEL GÉNERO <i>MUSA</i>	6
1.3 BOTÁNICA DEL GÉNERO <i>MUSA</i>	6
1.4 PROPAGACIÓN DE BANANOS.....	7
1.5 PROPAGACIÓN TRADICIONAL	7
1.6 PROPAGACIÓN POR SEMILLAS	8
1.7 PROPAGACIÓN Y REGENERACIÓN POR CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES	8
1.8 MORFOGÉNESIS <i>IN VITRO</i>	9
1.9 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	9
1.10 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN BANANO	10
1.11 ORGANOGÉNESIS	11
1.12 VARIACIÓN SOMACLONAL (VS)	12
1.13 MARCADORES MOLECULARES	19
1.14 SECUENCIAS INTERNAS DE REGIONES SIMPLES REPETIDAS (ISSR).....	20
1.15 POLIMORFISMO AMPLIFICADO DE SECUENCIAS RELACIONADAS (SRAP)	21
1.16 POLIMORFISMO AMPLIFICADO DIRIGIDO A INTRONES (ITAP)	22
1.17 RECAPITULACIÓN DE LA REVISIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN.....	23

HIPÓTESIS	25
OBJETIVO GENERAL	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
JUSTIFICACIÓN	26
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	27
BIBLIOGRAFÍA	28
CAPÍTULO II	41
DESARROLLO DE LA MORFOGÉNESIS <i>IN VITRO</i>	41
2.1 INTRODUCCIÓN	41
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	41
2.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO	41
2.2.2 DESINFECCIÓN	41
2.2.3 INDUCCIÓN DE YEMAS FLORALES POR OD.....	42
2.2.4 EXPERIMENTO PARA ELEGIR LA MEJOR CONCENTRACIÓN DE TDZ PARA EL MANTENIMIENTO Y PROLIFERACIÓN DE YEMAS FLORALES (OD)	42
2.2.5 INDUCCIÓN DE BROTES (OD).....	42
2.2.6 PROLIFERACIÓN DE BROTES (OD)	42
2.2.7 CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE BROTES (OD)	43
2.2.8 ENRAIZAMIENTO DE BROTES (OD)	43
2.2.8 INDUCCIÓN DE CALLO EMBRIOGÉNICO A PARTIR DE FLORES MASCULINAS INMADURAS (ESI-1)	43
2.2.9 INDUCCIÓN DE CALLO EMBRIOGÉNICO A PARTIR DE YEMAS FLORALES EN PROLIFERACIÓN (ESI-2)	44

2.2.10 PROLIFERACIÓN DE CALLO EMBRIOGÉNICO EN MEDIO SEMISÓLIDO (ESI-1 Y ESI-2).....	44
2.2.11 INDUCCIÓN DE SUSPENSIONES CELULARES (ESI-1 Y ESI2).....	44
2.2.12 MADURACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS.....	45
2.2.12.1 EFECTO DEL USO DE REGULADORES DEL CRECIMIENTO	45
2.2.12.2 EFECTO DEL EXTRACTO DE MALTA, CONCENTRACIÓN DE SACAROSA, PAPEL FILTRO Y GELIFICANTE	45
2.2.13 GERMINACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS.....	46
2.2.14 ACLIMATACIÓN DE PLANTAS REGENERADAS POR EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA INDIRECTA (ESI-1 Y ESI-2) Y ORGANOGÉNESIS DIRECTA (OD).....	47
2.2.15 ASPECTOS GENERALES DE LA MORFOGÉNESIS <i>IN VITRO</i>	48
2.2.16 ANÁLISIS DE DATOS DE LA MORFOGÉNESIS <i>IN VITRO</i>	48
2.3 RESULTADOS	49
2.3.1 INDUCCIÓN DE YEMAS FLORALES POR OD.....	51
2.3.2 EXPERIMENTO PARA ELEGIR LA MEJOR CONCENTRACIÓN DE TDZ PARA EL MANTENIMIENTO DE LA PROLIFERACIÓN DE YEMAS FLORALES POR OD.....	52
2.3.3 INDUCCIÓN DE BROTES POR OD	53
2.3.4 INDUCCIÓN DE CALLO EMBRIOGÉNICO A PARTIR DE FLORES MASCULINAS INMADURAS (ESI-1)	54
2.3.5 INDUCCIÓN DE CALLO EMBRIOGÉNICO A PARTIR DE YEMAS FLORALES (ESI-2).....	55
2.3.6 PROLIFERACIÓN DE CALLO EMBRIOGÉNICO EN MEDIO SEMISÓLIDO.....	56
2.3.7 EFECTO DEL USO DE REGULADORES DEL CRECIMIENTO EN LA MADURACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS DEL CV. ENANO GIGANTE POR ESI-2.....	58
2.3.8 EFECTO DEL EXTRACTO DE MALTA, LA CONCENTRACIÓN DE SACAROSA, EL USO PAPEL FILTRO Y EL GELIFICANTE EN LA MADURACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS DEL CV. ENANO GIGANTE	58

2.3.9 GERMINACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS	62
2.3.10 CRECIMIENTO, DESARROLLO Y ACLIMATACIÓN DE PLANTAS REGENERADAS POR OD, ESI-1 Y ESI-2	63
2.4 DISCUSIÓN	65
2.4.1 ORGANOGÉNESIS DIRECTA (OD)	65
2.4.2 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA INDIRECTA (ESI-1 Y ESI-2).	68
BIBLIOGRAFÍA	75
CAPÍTULO III	81
EXTRACCIÓN DE ADN Y ANÁLISIS CON MARCADORES MOLECULARES PARA DETERMINAR VARIACIÓN NATURAL Y VS	81
3.1 INTRODUCCIÓN	81
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	81
3.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO	81
3.2.2 EXTRACCIÓN DE ADN.....	81
3.2.3 SELECCIÓN DE CEBADORES ISSR, SRAP E ITAP	81
3.2.4 CONDICIONES DE PCR PARA LA SELECCIÓN DE CEBADORES ISSR	82
3.2.5 CONDICIONES DE PCR PARA LA SELECCIÓN DE CEBADORES SRAP E ITAP	82
3.2.6 ELECTROFORESIS DEL ADN PRODUCTO DE LA AMPLIFICACIÓN.....	83
3.2.7 ANÁLISIS DE DATOS	84
3.2.8 ANÁLISIS MOLECULAR CON MARCADORES MOLECULARES ISSR, SRAP E ITAP DE REGENERANTES <i>IN VITRO</i>	85
3.3 RESULTADOS	86

3.3.1 EXTRACCIÓN DE ADN DE LA PLANTA MADRE (M) E HIJUELO DE ESPADA (HE) Y DE AGUA (HA)....	86
3.3.2 ANÁLISIS MOLECULAR CON MARCADORES ISSR, SRAP E ITAP DE LA PLANTA MADRE (M), HIJUELO DE ESPADA (HE) Y DE AGUA (HA).....	86
3.3.3 EXTRACCIÓN DE ADN DE REGENERANTES <i>IN VITRO</i> POR OD, ESI-1 Y ESI-2 DEL CV. MANZANO.	96
3.3.4 ANÁLISIS MOLECULAR CON MARCADORES MOLECULARES ISSR, SRAP E ITAP DE REGENERANTES <i>IN VITRO</i> DEL CV. MANZANO.....	96
3.3.5 COMPARACIÓN DE LA VARIACIÓN GENÉTICA NATURAL Y DE LAS REGENERANTES <i>IN VITRO</i> DEL CV. MANZANO REVELADO CON MARCADORES MOLECULARES ISSR, SRAP E ITAP.....	105
3.4 DISCUSIÓN	106
3.4.1 ANÁLISIS MOLECULAR CON MARCADORES ISSR, SRAP E ITAP DE LA PLANTA MADRE (M), HIJUELO DE ESPADA (HE) Y DE AGUA (HA).....	106
3.4.2 ANÁLISIS MOLECULAR CON MARCADORES MOLECULARES ISSR, SRAP E ITAP DE REGENERANTES <i>IN VITRO</i> DEL CV. MANZANO.....	108
3.4.3 COMPARACIÓN DE LA VARIACIÓN GENÉTICA NATURAL Y DE LAS REGENERANTES <i>IN VITRO</i> DEL CV. MANZANO REVELADO CON MARCADORES MOLECULARES ISSR, SRAP E ITAP.....	111
BIBLIOGRAFÍA	114
CAPÍTULO IV	119
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	119
4.1 CONCLUSIONES.....	119
4.2 PERSPECTIVAS.....	121
ANEXOS	123
A1 PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN DE <i>MUSA</i> BASADO EN DELLAPORTA <i>ET AL.</i> (1983)	132

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Factores involucrados para la inducción de variantes somaclonales en cultivos <i>in vitro</i> , adaptado de Miguel y Marum (2011).	15
Figura 1.2 Representación de la construcción de cebador sentido y anti sentido SRAP (Li y Quiros 2001).	22
Figura 1.3 Estrategia experimental para alcanzar los objetivos planteados.....	27
Figura 2.1 Protocolo de regeneración vía OD del cv. Manzano y Enano Gigante, a partir de yemas en proliferación.	49
Figura 2.2 Protocolo de regeneración vía ESI-1 partiendo de flor masculina joven del cv. Manzano.....	50
Figura 2.3 Protocolo ESI-2 para los cv. Manzano y cv. Enano Gigante.....	50
Figura 2.4 Yemas florales (YF) por explante, 30, 45 y 75 días después de inducir la proliferación de flores masculinas jóvenes en presencia de TDZ/2.5, de los cvs. Manzano y Enano Gigante. Las barras indican error estándar ($n=3$).....	51
Figura 2.5 Respuesta de dos genotipos de <i>Musa</i> spp., a la proliferación de yemas florales; a) cv. Manzano; b) cv. Enano Gigante.....	52
Figura 2.6 Yemas florales (YF) por explante a los 30 y 60 d después de la siembra del cv. Manzano y cv. Enano Gigante, por efecto de diferentes concentraciones de TDZ. Los promedios con letras iguales no difieren estadísticamente según Tukey ($P = 0.05$). Las barras indican error estándar ($n = 5$).....	53
Figura 2.7 Organogénesis directa en el medio de proliferación. a) Desarrollo del brote y b) brotes múltiples del cv. Manzano; c y d) brote y brotes múltiples del cv. Enano Gigante.	54
Figura 2.8 Formación de diferentes tipos de callo a partir de inflorescencias inmaduras: a) del cv. Enano Gigante callo compacto y b) del cv. Manzano, callo embriogénico con presencia de embriones somáticos (es).....	55

Figura 2.9 Formación de diferentes tipos de callo como respuesta de yemas florales a la inducción de embriogénesis somática indirecta. Callo embriogénico (CE), compacto (CC), translucido (CT) y fenolizado (CF), en medio MA1 a los 90 d después de la inducción. Medias con letras iguales por tipo de respuesta son estadísticamente iguales según Tukey ($P \leq 0.05$). Las barras indican error estándar ($n = 5$)..... 55

Figura 2.10 Formación de diferentes tipos de callo en medio de inducción de embriogénesis sobre explantes de yemas florales en proliferación. a) Callo amarillo del cv. Manzano; b) callo del cv. Enano gigante en la fase de inducción, c) callo embriogénico en proliferación del cv. Manzano obtenido por ESI-1, d) callo embriogénico en proliferación del cv. Manzano obtenido por ESI-2, e y f) callo embriogénico en proliferación con presencia de embriones somáticos (es) del cv. Enano Gigante obtenido por ESI-2..... 56

Figura 2.11 Proliferación de callo embriogénico en a y b) medio semisólido; c y d) en medio líquido del cv. Enano Gigante por ESI-2 y cv. Manzano e) por ESI-1 y f) por ESI-2. 57

Figura 2.12 Embriones somáticos maduros a los 60 d del cv. Enano Gigante; a) del medio MS y b) del medio MS + 1 μ M de AIA + 1 μ M de BA. Barra = 1 mm. 58

Figura 2.13 Embriones somáticos del cv. Enano Gigante a los 90 d en fase de maduración; a, c y e) embriones provenientes del T3 (87 mM Sac/PF/3 g L⁻¹ G); y b, d y f) provenientes del T8 (131 mM Sac/EM/3 g L⁻¹ G). 61

Figura 2.14 Germinación de ES maduros obtenidos por ESI-2 del cv. Enano Gigante provenientes del medio MS a los 60 d después de la siembra bajo los tratamientos evaluados. Promedios con letras iguales entre columnas son estadísticamente iguales según Tukey ($P \leq 0.05$). Las barras indican error estándar ($n = 11$)..... 63

Figura 2.15 Proceso desarrollado para la regeneración *in vitro* de plantas de los cultivares evaluados: a) estadios de la ES (de izquierda a derecha globular, acorazonado, escutelar y coleoptilar) durante la maduración del cv. Enano Gigante; b) embriones germinados del cv. Enano Gigante; c) brote desarrollado del cv. Manzano; d) plántulas desarrolladas del cv. Enano Gigante proveniente de ESI-2; e) inicio de la aclimatación con domo de plástico

para mantener la HR; f) plántulas aclimatadas sin domo y g) planta del cv. Manzano de tres meses de edad. 64

Figura 3.1 Estrategia general seguido para el análisis de la variación natural y somaclonal de plantas regeneradas *in vitro*. 85

Figura 3.2 Dendogramas de similitud genética producto del análisis de conglomerados con el procedimiento UPGMA, basado en el coeficiente de Jaccard entre la planta madre (M), hijuelo de espada (HE), hijuelo de agua (HA) con marcadores: a) ISSR; b) SRAP; c) ITAP y d) ISSR-SRAP-ITAP para el cv. Manzano. Los números en cada agrupamiento indican la significancia al realizar un Bootstrap de 1000 repeticiones. 89

Figura 3.3 Polimorfismo entre la planta madre (M), HE y HA del cv. Manzano revelado con marcadores ISSR, SRAP e ITAP. 90

Figura 3.4 Número de bandas amplificadas por cada muestra evaluada mediante cebadores ISSR, ITAP y SRAP en el cv. Manzano. 91

Figura 3.5 Dendogramas de similitud genética producto del análisis de conglomerados con el procedimiento UPGMA, basado en el coeficiente de Jaccard entre la planta madre (M), hijuelo de espada (HE), hijuelo de agua (HA) con marcadores: a) ISSR; b) SRAP; c) ITAP y d) ISSR-SRAP-ITAP para el cv. Enano Gigante. Los números en cada agrupamiento indican la significancia al realizar un Bootstrap de 1000 repeticiones. 94

Figura 3.6 Polimorfismo entre la planta madre (M), HE y HA del cv. Manzano revelado con marcadores ISSR, SRAP e ITAP. 95

Figura 3.7 Número de bandas amplificadas por cada muestra evaluada mediante cebadores ISSR, ITAP y SRAP en el cv. Enano Gigante. 96

Figura 3.8 Dendogramas de la similitud genética obtenidos del análisis de conglomerados con el procedimiento UPGMA, basado en el coeficiente de Jaccard de regenerantes *in vitro* por OD del cv. Manzano mediante marcadores: a) ISSR; b) SRAP; c) ITAP y d) ISSR-SRAP-ITAP. Los números en cada agrupamiento indican la significancia al realizar un Bootstrap de 1000 repeticiones. 101

Figura 3.9 Dendogramas de la similitud genética producto del análisis de conglomerados con el procedimiento UPGMA, basado en el coeficiente de Jaccard regenerantes *in vitro* por ESI-1 mediante marcadores: a) ISSR; b) SRAP; c) ITAP y d) ISSR-SRAP-ITAP para el cv. Manzano. Los números en cada agrupamiento indican la significancia al realizar un Bootstrap de 1000 repeticiones. 102

Figura 3.10 Dendogramas de la similitud genética producto del análisis de conglomerados con el procedimiento UPGMA, basado en el coeficiente de Jaccard regenerantes *in vitro* por ESI-2 mediante marcadores: a) ISSR; b) SRAP; c) ITAP y d) ISSR-SRAP-ITAP para el cv. Manzano. Los números en cada agrupamiento indican la significancia al realizar un Bootstrap de 1000 repeticiones. 103

Figura 3.11 Número de bandas generadas por los cebadores ISSR, ITAP y SRAP en la planta madre (M) y plantas regeneradas por OD, ESI-1 y ESI-2 del cv. Manzano. T=Total de bandas amplificadas por cada marcador y ruta morfogénica. 104

Figura 3.12 Patrón electroforético de ISSR usando el cebador Mat 32 de diferentes sistemas de regeneración. Carril 1, marcador de masa molecular de 100 a 3000 pb (Thermo Scientific GenRuler 100 bp Plus DNA Ladder, ready-to-use) planta madre (M), hijo de espada (HE) e hijo de agua (HA) y agrupaciones de plantas regeneradas vía OD, ES-1 y ES-2 *in vitro*. En el recuadro se observaron bandas de un tamaño de 400 pb, que fueron amplificadas solamente en las plantas regeneradas por ESI-1..... 104

Figura 3.13 Nivel de variación natural entre la planta madre (M), HE, HA y de plantas regeneradas vía OD, ESI-1 y ESI-2 del cv. Manzano..... 105

Figura 3.14 Esquema general seguido para la regeneración de plantas por OD, ESI-1 y ESI-2 del cv. Manzano (AAB), en el que se observan los principales factores que pudieron influenciar en el nivel de polimorfismo detectado con marcadores moleculares ISSR, SRAP e ITAP..... 113

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1 Variación somaclonal detectada en el banano propagado <i>in vitro</i>	16
Cuadro 1.2 Ejemplos de aplicación de marcadores moleculares en el cultivo <i>in vitro</i> de <i>Musa</i> spp.	20
Cuadro 1.3 Ejemplos de aplicación de marcadores moleculares ISSR en <i>Musa</i> spp.	21
Cuadro 2.1 Tratamientos para la maduración de embriones somáticos del cv. Enano Gigante.....	46
Cuadro 2.2 Tratamientos para la germinación de embriones somáticos del cv. Enano Gigante.....	47
Cuadro 2.3 Número de brotes por explante obtenidos de yemas en proliferación de los cultivares evaluados.	53
Cuadro 2.4 Proliferación de CE en medio semisólido y paquete de volumen celular (PVC) de células en suspensión del cv. Enano Gigante y cv. Manzano.	57
Cuadro 2.5 Efecto de la presencia de reguladores del crecimiento en el medio de cultivo en el peso fresco (PF), número total de embriones (NTE), y los porcentajes de embriones maduros (PEM) e inmaduros (PEI) durante la maduración de embriones somáticos del cv. Enano Gigante.....	58
Cuadro 2.6 Efecto del medio de cultivo en el peso fresco (PF), número total de embriones (NTE), porcentajes de embriones maduros (PEM), inmaduros (PEI), y porcentaje de germinación (G) por efecto de diferentes tratamientos en la maduración de embriones somáticos del cv. Enano Gigante a los 90 d después de la siembra.	59
Cuadro 2.7 Efecto de la concentración de sacarosa, extracto de malta y Gelrite, y el uso de papel filtro en el medio de cultivo en el peso fresco (PF), el número total de embriones (NTE), el porcentaje de embriones maduros (PEM) e inmaduros (PEI) y el porcentaje de germinación (G) durante la maduración de embriones somáticos del cv. Enano Gigante.	62
Cuadro 3.1 Características de cebadores ISSR para evaluar fidelidad genética en banano	

<i>Musa</i> spp.	82
Cuadro 3.2 Combinación de cebadores SRAP para evaluar fidelidad genética en banano <i>Musa</i> spp.	83
Cuadro 3.3 Combinación de cebadores ITAP para evaluar fidelidad genética en banano <i>Musa</i> spp.	84
Cuadro 3.4 Número total de bandas (NTB), número de bandas polimórficas (NBP) porcentaje de polimorfismo (P) de cebadores ISSR, combinaciones SRAP e ITAP entre entre la planta madre, HE y HA del cv. Manzano.	88
Cuadro 3.5 Resumen de resultados obtenidos con cebadores ISSR, SRAP e ITAP empleados para el análisis molecular entre la planta madre, HE y HA del cv. Manzano. .	88
Cuadro 3.6 Número total de bandas (NTB), número de bandas polimórficas (NBP) porcentaje de polimorfismo (P) de cebadores ISSR, combinaciones SRAP e ITAP entre entre la planta madre, HE y HA del cv. Enano Gigante.	92
Cuadro 3.7 Resumen de resultados obtenidos con cebadores ISSR, SRAP e ITAP usados para el análisis molecular entre la planta madre, HE y HA del cv. Enano Gigante.	93
Cuadro 3.8 Número total de bandas (NTB), número de bandas polimórficas (NBP) porcentaje de polimorfismo (P) de cebadores ISSR, combinaciones SRAP e ITAP entre regenerantes obtenidos por OD, ESI-1 y ESI-2 <i>in vitro</i> del cv. Manzano.	99
Cuadro 3.9 Resumen de resultados obtenidos con los marcadores ISSR, SRAP e ITAP en el análisis molecular entre plantas regeneradas por OD, ESI-1 y ESI-2 del cv. Manzano.	100
Cuadro A1 Medios de cultivo empleados para la regeneración <i>in vitro</i> vía OD de los cultivares Manzano y Enano Gigante.	123
Cuadro A2 Medios de cultivo empleados para la regeneración <i>in vitro</i> vía ESI-1 del cv. Manzano.	124

Cuadro A3 Medios de cultivo empleados para la regeneración <i>in vitro</i> vía ESI-2 del cv. Manzano.....	125
Cuadro A4 Medios de cultivo empleados para la regeneración <i>in vitro</i> vía ESI-2 del cv. Enano Gigante.....	126
Cuadro A5 Proporción de absorbancia (nm) y concentración de ADN genómico de planta madre, HE y HA, de los cvs. Manzano y Enano Gigante.	127
Cuadro A6 Proporción de absorbancia (nm) y concentración de ADN genómico de regenerantes OD, ESI-1 y ESI-2 del cv. Manzano.	127
Cuadro A7 Matriz del coeficiente de similitud de Jaccard entre la planta madre (M), hijuelo de espada (HE) e hijuelo de agua (HA), calculado entre los cebadores ISSR, SRAP, ITAP y el conjunto de los tres marcadores de los cvs. Manzano y Enano Gigante.	128
Cuadro A8 Matriz del coeficiente de similitud de Jaccard entre plantas regeneradas por OD calculado entre los cebadores ISSR, SRAP, ITAP y el conjunto de los tres marcadores del cv. Manzano.....	129
Cuadro A9 Matriz del coeficiente de similitud de Jaccard entre plantas regeneradas por ESI-1 calculado entre los cebadores ISSR, SRAP, ITAP y el conjunto de los tres marcadores del cv. Manzano.	130
Cuadro A10 Matriz del coeficiente de similitud de Jaccard entre plantas regeneradas por ESI-2 calculado entre los cebadores ISSR, SRAP, ITAP y el conjunto de los tres marcadores del cv. Manzano.	131

ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
AAA	Cultivar triploide con tres copias de genoma A
AAB	Cultivar triploide con dos copias de genoma A y una de genoma B
ABA	Ácido abscísico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFLP	Amplificación de fragmentos de longitud polimórfica
AIA	Ácido 3-indolacético
ANA	Ácido naftalenacético
BA	N6-Benciladenina
CoRAP	Polimorfismo amplificado de regiones conservadas
CTV	Cultivo de tejidos vegetales
cv.	Cultivar
d	Días
ES	Embriogénesis somática
ESD	Embriogénesis somática directa
ESI	Embriogénesis somática indirecta
g L ⁻¹	Gramos por litro
Gpb	Giga pares de bases
HR	humedad relativa

IRAP	Polimorfismo amplificado entre retrotransposones
ISSR	Secuencias internas de regiones simples repetidas
ITAP	Polimorfismo amplificado dirigido a intrones
IT-ISJ	Amplificación de regiones conservadas de empalme intrón-exón
Kin	Kinetina
μM	micro molar
<i>M. a.</i>	<i>Musa acuminata</i>
<i>M. b.</i>	<i>Musa balbisiana</i>
MS	Sales del medio de Murashige y Skoog (1962)
MSAP	Polimorfismo amplificado de secuencias del ADN susceptibles a metilación
OD	Organogénesis directa
pb	pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RAPD	Amplificación aleatoria de marcadores del ADN polimórfico
RC	Reguladores del crecimiento
SRAP	Polimorfismo amplificado de secuencias relacionadas
SSR	Secuencias simples repetidas (microsatélites)
TDZ	Tidiazurón
TRAP	Polimorfismo amplificado a regiones dirigidas
VS	Variación somaclonal

RESUMEN

El plátano es un frutal tropical originario del sudeste de Asia e introducido a América tropical donde se cultiva y explota tanto para la exportación como para el consumo local de su preciado fruto. La baja capacidad reproductiva por la vía sexual es una limitante importante para el mejoramiento genético de este cultivo. Las técnicas biotecnológicas ofrecen formas alternativas para propagar plantas fieles al tipo y para ampliar la variabilidad genética. En este estudio se ha investigado la variación somaclonal de plantas regeneradas *in vitro* mediante embriogénesis somática indirecta (ESI) y mediante organogénesis directa (OD) a partir de explantes de yemas florales en proliferación, utilizando marcadores tipo secuencias internas de regiones simples repetidas (ISSR), polimorfismo amplificado de secuencias relacionadas (SRAP) y polimorfismo amplificado dirigido a intrones (ITAP). Los cebadores de cada tipo de marcador fueron seleccionados al evaluar el polimorfismo natural entre la planta madre, el hijuelo de espada y el hijuelo de agua. Las flores masculinas inmaduras de *M. a.* (AAA, Cavendish) cv. Enano Gigante, y *M. a.* x *M. b.* (AAB, Silk) cv. Manzano sirvieron de explante inicial para la regeneración *in vitro* de plantas mediante OD y ESI por dos vías, ESI-1 y ESI-2. Se desarrolló callo embriogénico por la vía ESI-1 con una respuesta de 34.3% en Manzano, lo cual no se observó en Enano Gigante debido a fenolización del tejido. La formación de yemas florales en proliferación, en promedio fue de 12 y 5.9 yemas/explante en Manzano y Enano Gigante, respectivamente. Estas yemas se emplearon para inducir formación de callo embriogénico vía ESI-2, y la diferenciación de brotes vía OD. En Manzano se formó 28.2% de callo embriogénico, y 4.4 brotes por explante; mientras que en Enano Gigante fue de 18.4% de callo embriogénico, y 6.6 brotes por explante. El empleo de cebadores ISSR, combinaciones SRAP y combinaciones ITAP, reveló un polimorfismo del 32.3, 31.6 y 19.4% respectivamente, entre la planta madre, hijuelo de espada e hijuelo de agua del cv. Manzano; mientras, que para el cv. Enano Gigante revelado con marcadores ISSR, SRAP e ITAP fueron de 28.6, 31.6 y 29.6% respectivamente. Con el empleo de estos mismos cebadores, el polimorfismo entre plantas regeneradas por OD del cv. Manzano fue de 36.3, 19.5 y 13.7% con marcadores ISSR, SRAP e ITAP, respectivamente; para ESI-1 fue de 22.9, 12.5 y 11.4%, respectivamente y para ESI-2 fue de 54.7, 24.2 y 12.3% respectivamente. En este trabajo se discuten los factores evaluados para la regeneración *in vitro* y su influencia en la variación observada.

ABSTRACT

Banana is a tropical fruit crop native to Southeast Asia, was introduced to tropical America where it is cultivated both for export and for local consumption of its precious fruit. Low sexual reproductive capacity is a major constraint facing the genetic breeding of this crop. Biotechnological techniques offer alternative ways to propagate true-to-type plants and to widen genetic variability. We investigated somaclonal variation in regenerants of bananas derived from *in vitro* indirect somatic embryogenesis and direct organogenesis using inter simple sequence repeat (ISSR), sequence-related amplified polymorphisms (SRAP) and intron targeted amplified polymorphism (ITAP) analysis. The primers of each marker type were selected assessing the polymorphism between the mother plant, the sword sucker and the water sucker. Immature male flowers of *M. a.* (AAA, Cavendish) cv. Enano Gigante French clone, and *M. a.* x *M. b.* (AAB, Silk) cv. Manzano were employed as initial explant for *in vitro* plant regeneration via direct organogenesis (OD) and indirect somatic embryogenesis (ESI) in two ways, ESI-1 and ESI-2. Embryogenic callus via ESI-1 was developed with a response of 34.3% in cv. Manzano, which was not observed in cv. Enano Gigante due phenolization of the tissue. The formation of flower buds in proliferation were on average 12 and 5.9 buds/explant in Manzano and Enano Gigante, respectively. These buds was used as explant to induce formation of embryogenic callus via ESI-2, and via shoot differentiation OD. In Manzano 28.2% of embryogenic callus, and 4.4 shoots per explant was formed; while with Enano Gigante was 18.4% of embryogenic callus, and 6.6 buds per explant. Using ISSR primers, SRAP combinations and ITAP combinations, the polymorphism was 32.6, 31.6 and 19.4%, respectively, between the mother plant, sword sucker and water sucker of cv. Manzano; while for cv. Enano Gigante revealed with ISSR markers, SRAP and ITAP were 28.6, 31.6 and 29.6% respectively. With the same primers, the polymorphism between plants regenerated by OD in cv. Manzano was 36.3, 19.5 and 13.7% respectively; ESI-1 was 22.9, 12.5 and 12.3%, respectively and ESI-2 was 54.7, 24.2 and 12.3% respectively. Factors evaluated for *in vitro* regeneration and its influence on the observed variation was discussed.

INTRODUCCIÓN

La propagación de variedades cultivadas de banano se lleva a cabo principalmente de manera vegetativa. Por ello, el cultivo de tejidos vegetales es una alternativa biotecnológica para la propagación, el mejoramiento genético y la conservación del germoplasma existente de banano.

Una de las herramientas más utilizadas para llevar a cabo la propagación de especies vegetales es la organogénesis, debido a que ha mostrado que los productos presentan una mayor estabilidad genética. No obstante, existen reportes recientes que sostienen lo contrario, por lo que esto parece depender de los genotipos, del tiempo en el cultivo *in vitro* y los reguladores de crecimiento (RC) utilizados (Sheidai *et al.* 2008; Mohamed 2007; Bairu *et al.* 2006).

Por otro lado, para el banano se han desarrollado varios protocolos de propagación a través de la embriogénesis somática (ES), que además resulta ser una herramienta poderosa para el mejoramiento genético. Las diferencias entre las metodologías basadas en ES se refieren al explante original, los que pueden ser embriones cigóticos maduros e inmaduros (Maldonado-Borges *et al.* 2013), segmentos de cormo y bases foliares (Novak *et al.* 1989), meristemas cultivados *in vitro* (Dhed'a *et al.* 1991), e inflorescencias inmaduras masculinas (Escalant *et al.* 1994) y femeninas (Grapin *et al.* 2000). A pesar de esta amplia gama de explantes para iniciar la ES, uno de los problemas a resolver es el número limitado de éstos que expresen una adecuada competencia embriogénica.

Recientemente, se describió una metodología en *Musa acuminata* Colla, AAA, subgrupo Cavendish, cv. Dwarf Cavendish, que contempla el uso de flores masculinas jóvenes, aisladas de plantas adultas, a partir de las cuales se induce la formación de nuevas yemas florales y su proliferación *in vitro* (Pérez-Hernández y Rosell-García 2008). Se pueden utilizar diversas estrategias, tales como el uso directo de estos explantes para el establecimiento de suspensiones celulares, la inducción de callo embriogénico en medio semisólido o de la organogénesis para la obtención de brotes de manera directa (Darvari *et al.* 2010).

Cuando el objetivo es la propagación clonal de los materiales de interés, uno de los

INTRODUCCIÓN

problemas a vencer es la incidencia de un alto grado de variación somaclonal, factor común a varios protocolos de micropropagación de banano (Bairu *et al.* 2006). Aunque, desde el punto de vista de contribuir al mejoramiento genético de los cultivares existentes, dicho problema podría verse como una ventaja. En banano, se han reportado diversos variantes somaclonales, con características deseables, como en las plantas regeneradas de CIEN BTA-03 (AAAA), cuyos frutos son más grandes y presentan resistencia a Sigatoka amarilla respecto a su parental *M. a.* (AAA) cv. Williams (Emaldi *et al.* 2004; Giménez *et al.* 2001). En cualquier caso, un método de detección temprana para estudiar la fuente de variación somaclonal y que no requiera de infraestructura sofisticada es deseable, ya que es información clave para evitar pérdidas económicas de los productores, principales usuarios de las plantas provenientes de cultivo de tejidos. Por otro lado, un método de estas características permitirá también monitorear aquellos individuos que pudiesen sobresalir al obtener variantes somaclonales.

Existen diversos métodos para detectar variantes somaclonales, que involucran la búsqueda de cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y citogenéticos; sin embargo, el uso de herramientas moleculares representa uno de los métodos más confiables para la detección temprana de variantes somaclonales (Aremu *et al.* 2013; Bairu *et al.* 2011). En banano, entre los marcadores moleculares más utilizados están los AFLP (que corresponden a la amplificación de fragmentos de longitud polimórfica) (Youssef *et al.* 2011), así como los ISSR (regiones internas de secuencias simples repetidas), los cuales son populares dada su alta naturaleza discriminativa y cuyas aplicaciones incluyen estudios de diversidad genética, filogenéticos, ecología y evolución (Aruna *et al.* 2012; Chandrika *et al.* 2010; Bahulikar *et al.* 2004). Con base en lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo llevar a cabo el estudio de la variación somaclonal en regenerantes de *Musa* spp., obtenidos al evaluar tres protocolos de regeneración, uno de organogénesis directa (OD) y dos de embriogénesis somática indirecta (ESI-1 y ESI-2).

BIBLIOGRAFÍA

- Aremu, A.O., M.W. Bairu, L. Szucová, K. Dolezal, J.F. Finnie y J. Van Staden (2013). Genetic fidelity in tissue-cultured Williams bananas - The effect of high concentration of topolins and benzyladenine. *Scientia Horticulturae*, 161, 324-327.
- Aruna, C., A.R. Priya, C.N. Neeraja, J.V. Patil y K.B.R.S. Visarada (2012). Diversity analysis using ISSR markers for resistance to shoot pests in sorghum. *Crop Protection*, 35, 110-117.
- Bahulikar, R., D. Stanculescu, C. Preston y I. Baldwin (2004). ISSR and AFLP analysis of the temporal and spatial population structure of the post-fire annual, *Nicotiana attenuata*, in SW Utah. *BMC Ecology*, 4, 12.
- Bairu, M.W., A.O. Aremu y J. Van Staden (2011). Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulation*, 63, 147-173.
- Bairu, M.W., C.W. Fennell y J. Van Staden (2006). The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in Cavendish banana (*Musa* AAA cv. Zelig). *Scientia Horticulturae*, 108, 347-351.
- Chandrika, M., V. Ravishankar Rai y Thoyajaksha (2010). ISSR marker based analysis of micropropagated plantlets of *Nothapodytes foetida*. *Biologia Plantarum*, 54, 561-565.
- Darvari, F.M., M. Sariah, M.P. Puad y M. Maziah (2010). Micropropagation of some Malaysian banana and plantain (*Musa* sp.) cultivars using male flowers. *African Journal of Biotechnology*, 9, 2360-2366.
- 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.
- Emaldi, U., I. Trujillo y E. De García (2004). Comparison of characteristics of bananas (*Musa* sp.) from the somaclone CIEN BTA-03 and its parental clone Williams. *Fruits*, 59, 257-263.

INTRODUCCIÓN

- Escalant, J.V., C. Teisson y F. Cote (1994). Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). *In Vitro Cellular and Development Biology-Plant*, 30, 181-186.
- Giménez, C., E. De García, N.X. De Enrech y I. Blanca (2001). Somaclonal variation in banana: cytogenetic and molecular characterization of the somaclonal variant Cien BTA-03. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 37, 217-222.
- Grapin, A., J.L. Ortíz, T. Lescot, N. Ferrere y F.X. Cote (2000). Recovery and regeneration of embryogenic cultures from female flowers of False Horn Plantain. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 61, 237-244.
- Maldonado-Borges, J.I., J.R. Ku-Cauich y R.M. Escobedo-GM (2013). Annotation of differentially expressed genes in the somatic embryogenesis of *Musa* and their location in the banana genome. *The Scientific World Journal*, 2013, 1-7.
- Mohamed, A.E. (2007). Morphological and molecular characterization of some banana micro-propagated variants. *International Journal of Agriculture & Biology*, 9, 707-714.
- Novak, F.J., R. Afza, M. Van Duren, M. Perea-Dallos, B.V. Confer y T. Xiolang (1989). Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB) bananas (*Musa* spp.). *Bio/Technology*, 7, 154-159.
- Pérez-Hernández, J.B. y P. Rosell-García (2008). Inflorescence proliferation for somatic embryogenesis induction and suspension-derived plant regeneration from banana (*Musa* AAA, cv. Dwarf Cavendish) male flowers. *Plant Cell Reports*, 27, 965-971.
- Sheidai, M., H. Aminpoor, Z. Noormohammadi y F. Farahani (2008). RAPD analysis of somaclonal variation in banana (*Musa acuminata* L.) cultivar Valery. *Acta Biologica Szegediensis*, 52, 307-3011.
- Youssef, M., J.R. Ku-Cauich, A.C. James y R.M. Escobedo-GM (2011). Genetic analysis of somatic embryogenesis derived plants in banana. *Assiut Journal of Agricultural Science*, 42, 287-300.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 El género *Musa*

El género *Musa* comprende alrededor de 80 especies seminíferas silvestres y a todos los bananos poliploides comestibles. Linnaeus fue el primero en asignar el nombre científico de banano al describir a *Musa paradisiaca*. Estudios filogenéticos recientes sobre este género demostraron que ninguno de los grupos de las cinco secciones de *Musa*, previamente definidos por características morfológicas, son monofiléticos por lo que, sólo dos clados intragenéricos fueron recuperados como monofiléticos. Éstos corresponden al número básico de cromosomas de $n=x=11$ y $n=x=10/9/7$, respectivamente, donde un clado comprende a las especies de *Musa* sección *Musa* y *Rhodochlamys*, mientras que las otras contienen especies de *Musa* sección *Callimusa*, *Australimusa* e *Ingentimusa*. Dado este panorama, las especies de *Musa* se encuentran dentro de dos secciones: *Musa* y *Callimusa* (Hakkinen 2013).

Su centro de origen es el Sur-Este de Asia, donde pasaron de la India a la Polinesia (Simmonds 1962). El centro de diversificación ha sido localizado en Malasia e Indonesia (Daniells *et al.* 2001), aunque una amplia diversidad ha sido encontrada en todo el mundo. Las plantas se encuentran distribuidas principalmente en los márgenes de selvas tropicales (Wong *et al.* 2002).

Los bananos, también denominados plátanos, pertenecen a la sección *Musa*, la cual contiene ~33 especies (Hakkinen 2013). Los grupos genómicos propuestos por Simmonds y Shepherd para clasificar los clones comestibles, según el aporte de genomas al nivel de ploidía, son AA, BBB, AB, AAA, AAB, ABB, AAAA y ABBB (Arvanitoyannis *et al.* 2008; Simmonds y Shepherd 1955).

La mayoría de los cultivares actuales derivaron de dos especies silvestres diploides: *Musa acuminata* (genoma A) y *Musa balbisiana* (genoma B). Los clones comestibles se clasifican dependiendo de la contribución genómica de *M. acuminata* y *M. balbisiana*. Cambios estructurales en los cromosomas, de manera espontánea o por eventos de

recombinación resultaron en el desarrollo de barreras reproductivas naturales dentro de las especies, la divergencia en subespecies y la diversidad genética en especies como un todo. Este proceso y la formación de gametos $2n$, mediante restitución nuclear común en variedades partenocárpicas, es uno de los mecanismos de incremento cromosómico y formación de autoploiploides e híbridos homo-genómicos, los cuales están representados por los bananos de postre (AAA), y los aloploides e híbridos hetero-genómicos que comprenden los plátanos tipo macho (AAB) y otros bananos de cocción (ABB) (Ortiz 1997). Los cultivares triploides (AAA) surgieron de diploides, posiblemente a partir de cruzamientos entre diploides partenocárpicos comestibles y subespecies de *M. acuminata* silvestre. Los cultivares diploides y triploides de *M. acuminata* tuvieron contacto con zonas donde *M. balbisiana* era nativa, y la hibridación natural favoreció la formación de híbridos con genomas AB, AAB y ABB. *Musa balbisiana* está considerado como más resistente a enfermedades y tolerante a estrés abiótico que *M. acuminata*. A menudo, tales características están presentes en cultivares que contienen un genoma B. La hibridación pudo haber dado lugar a un amplio rango de cultivares comestibles de bananos, los cuales sobrevivieron y fueron multiplicados durante su domesticación (Ortiz 1995).

1.2 Taxonomía del género *Musa*

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

Reino: Vegetal

Clase: Angiospermae

Subclase: Monocotyledonae

Orden: Zingiberales

Familia: Musáceae

Género: *Musa*

Secciones: *Musa* y *Callimusa*

1.3 Botánica del género *Musa*

Los bananos son plantas monocotiledóneas pertenecientes al género *Musa*. Son herbáceas perennes gigantes, comúnmente con una altura de más de 3 m, sin lignificación o engrosamiento secundario de tallos, el cual es característico en árboles

leñosos. Es una herbácea, porque sus partes aéreas mueren después de que se cumple su ciclo de crecimiento. Los bananos son plantas monoicas que tienen flores masculinas en la punta del ápice de la inflorescencia y flores femeninas por detrás.

El fruto de banano o plátano es un producto de la partenocarpia y se caracteriza por ser una baya con una piel gruesa, que contiene abundante colénquima. Los frutos se organizan en capas llamadas peines o manos, que contiene de 10 a 20 bananos, y cada racimo, de 6 a 15 manos. Éste, en su conjunto, tiene un peso de 40 a 50 kg por racimo lo que conduce a obtener más de 10 toneladas por hectárea. Generalmente, en las plantaciones comerciales el brote terminal y las brácteas son eliminados para dirigir los azúcares al desarrollo de los frutos (Daniells *et al.* 2001).

1.4 Propagación de bananos

Los bananos partenocárpicos se propagan principalmente por métodos vegetativos, y escasamente por semillas (Kacar y Faber 2012). Los cultivares comestibles, en su mayoría, no contienen semillas; sin embargo, algunos como “Pisan Awak” producen algunas semillas cuando crecen cerca de una fuente fértil de polen, ya que a pesar de ser triploides (ABB) poseen cierta fertilidad femenina residual.

1.5 Propagación tradicional

El método más común para la obtención de material biológico, “semilla” para la siembra de banano, consiste en la división de la parte vegetativa del rizoma, el cual se refiere a la producción y colecta de hijuelos. Para ello, los hijuelos de espada son preferidos en comparación a los hijuelos de agua, ya que los primeros son más vigorosos. Los hijuelos de espada se caracterizan por tener pequeñas hojas en forma de espada y estar conectados a una planta madre saludable en fructificación. Los hijuelos de espada se pueden obtener de plantas madre dedicadas exclusivamente a la producción de hijuelos. Prácticas, como mayor iluminación (por eliminación de hojas de las plantas madre) y fertilización antes de la recolección de hijuelos, son recomendables para mejorar la viabilidad. Los hijuelos están listos para ser removidos de la planta madre cuando tiene como mínimo 15 cm de diámetro y 50 cm de altura por encima del suelo (Stover y Simmonds 1987).

1.6 Propagación por semillas

Especies ornamentales, como “Fuzzy Pink” o “Pink Velvet” (*M. velutina*), o especies fibrosas como la abaca “Manila Hemp” (*M. textilis*), son ejemplos de individuos comúnmente obtenidos por semilla. La germinación depende de la especie, la variedad y el ambiente. Algunas germinan con mucha facilidad, mientras que otras son más recalcitrantes. El almacenamiento de las semillas en un lugar fresco y seco es recomendable. No es necesario un tratamiento de escarificación, aunque se recomienda sumergirlos en agua por un lapso de 24 y 48 h antes de sembrar. Otras recomendaciones incluyen sembrar en un medio con buen drenaje, húmedo y plena iluminación solar. La germinación puede tomar varias semanas (Nelson *et al.* 2006).

1.7 Propagación y regeneración por cultivo de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos, células y órganos vegetales surge como una herramienta necesaria para estudios básicos relacionados con la biología vegetal, que también ha encontrado aplicación en la propagación de especies de interés comercial. Puede ser definido como un conjunto de técnicas que permite cultivar asépticamente células, tejidos, órganos y sus componentes en un medio artificial de composición química definida, en condiciones ambientales controladas (Loyola-Vargas *et al.* 2008). Esto es posible gracias a la característica de totipotencialidad que tienen las células vegetales, concepto propuesto por Gottlieb Haberlandt en 1902. La totipotencialidad es la capacidad de una sola célula vegetal de regenerar una planta completa y funcional, cuando está sujeta a los estímulos adecuados (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo 2012).

Las técnicas del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* se usan en la agricultura para la producción masiva de clones sanos, para estudios bioquímicos, fisiológicos, anatómicos, de selección *in vitro*, entre otros. Este sistema de propagación ha sido muy eficiente en *Musa*. Con esta técnica se ha obtenido material vegetal de alta calidad, uniforme, libre de enfermedades y nemátodos. La mayoría de las plantas establecidas en plantaciones comerciales existentes y el incremento de pequeños productores se deben principalmente a la producción masiva de plantas por cultivo de tejidos (Kacar y Faber 2012).

1.8 Morfogénesis in vitro

La morfogénesis se utiliza para describir el origen de la forma de la planta, entendiendo por “forma” la organización estructural de la célula individual, la organización de las células para la formación de tejidos y cuerpo de la planta. La morfogénesis en plantas, depende de la integración y la mutua interacción de órganos, tejidos y células, separados entre sí en el espacio. La morfogénesis *in vitro* promovida por la presencia exógena de RC, como las citocininas y las auxinas, presenta dos rutas alternas: la organogénesis y la embriogénesis somática. Ambas rutas se subdividen en directas e indirectas; la directa se refiere a la formación de brotes y embriones sin previa formación de callos, mientras que en la indirecta hay una fase previa de callos (Sugiyama 1999).

1.9 Embriogénesis somática

La ES es la más clara expresión del fenómeno de totipotencialidad celular. Es un proceso biológico en el cual bajo condiciones inductivas a partir de células somáticas se generan células embriogénicas que después de una serie de cambios bioquímicos y morfológicos, forman embriones perfectamente organizados (Quiróz-Figueroa *et al.* 2006). Los embriones somáticos presentan una estructura bipolar, con meristemos apicales y radicales en los extremos de un mismo eje y que presentan características morfológicas parecidas a las encontradas en los embriones cigóticos, con la diferencia de que en los somáticos se carece del tejido materno y basal relacionados con la ausencia del endospermo, y por lo general, del suspensor, respectivamente.

La ES puede obtenerse por medio de dos vías: una, denominada embriogénesis somática directa (ESD) y la otra, conocida como embriogénesis somática indirecta (ESI). Por medio de la ESD, se obtienen embriones directamente a partir de una célula individual o un grupo de células del explante, sin la formación previa de un callo (Quiróz-Figueroa *et al.* 2002). Esta vía permite después de 13 a 15 semanas de cultivo en el medio de inducción, la obtención rápida de embriones somáticos bien constituidos. La ESI, permite la obtención de embriones a partir de callos (células no diferenciadas), mediante el uso de dos medios de cultivo, uno de inducción del callo embriogénico y otro para la regeneración de los embriones (Denchev *et al.* 1992). La ocurrencia de cualquiera de los dos procesos depende de la naturaleza y concentración de los RC utilizados, así como de

la fuente, la edad y el estado fisiológico del explante. Se considera que la ocurrencia de la ES está sometida a una profunda regulación o reprogramación genética con respecto a la vía ESD (Rojas-Herrera y Loyola-Vargas 2002).

En la fase de regeneración, la célula embriogénica muestra su competencia y se diferencia para formar el embrión somático (Jiménez 2001). Con base en el grado de desarrollo, el embrión somático presenta diferentes morfologías definidas como globular, oblongo, acorazonado, torpedo y cotiledonario (Nakamura *et al.* 1992). El embrión globular inicia su diferenciación celular y el establecimiento de la estructura básica de la futura planta. La primera estructura visible en esta fase es el protodermo; su formación correcta permite que los embriones pasen al siguiente estadio. El embrión oblongado se caracteriza por la formación incompleta del procambium, proceso que generalmente se presenta en el estadio acorazonado. En el estadio torpedo se observan la presencia de cotiledones como pequeñas protuberancias en el ápice de los embriones somáticos (Quiróz-Figueroa *et al.* 2006). Puesto que estos estadios fueron descritos para una planta dicotiledónea (*Daucus carota*), los estadios oblongado y torpedo difieren en monocotiledóneas (Zimmerman 1993). En el estadio globular, los embriones somáticos presentan una forma esférica, por lo que se dificulta el definir el momento en que ocurre la ES, aunque a medida que se van desarrollando dan lugar a los estadios acorazonado, escutelar y coleoptilar (George *et al.* 2008).

Diversos factores pueden afectar la inducción de la ES, tales como el genotipo, el tipo y la edad del explante, el balance de RC (auxinas y citocininas), el potencial osmótico del medio, la temperatura, las condiciones de luz y la fuente de nitrógeno.

1.10 Embriogénesis somática en banano

En bananos, la ES se ha utilizado como una técnica de alto rendimiento para la micropropagación y la conservación de germoplasma, así como un sistema eficiente de regeneración para la aplicación de técnicas de ingeniería genética, como la transformación e hibridación somática y la producción de semillas artificiales (Youssef *et al.* 2010; Quiróz-Figueroa *et al.* 2006). La ES en banano requiere del uso de RC (principalmente de auxinas) para inducir la formación de callo a partir del explante inicial (desdiferenciación), y posteriormente, la formación de callo embriogénico. Éste es usado

como material de inicio para la obtención de células en suspensión, las cuales se pueden diferenciar para desarrollar embriones, y luego, regenerar plantas.

Se han empleado diversos tipos de explantes se han empleado para inducir callos embriogénicos en *Musa* spp. entre ellos, se pueden encontrar embriones cigóticos inmaduros (Maldonado-Borges *et al.* 2013), segmentos de corno y bases foliares (Novak *et al.* 1989), meristemos apicales del rizoma (escalpo) cultivados *in vitro*, y flores jóvenes masculinas (Escalant *et al.* 1994) y femeninas (Grapin *et al.* 2000). Las flores masculinas jóvenes sobresalen en las variedades partenocárpicas como los explantes más reactivos para iniciar la ES en bananos tipo Cavendish, aunque existen reportes de mayor eficiencia mediante el uso de escalpos (Strosse *et al.* 2006).

El empleo de flores masculinas conlleva una variación en la capacidad de formar callo embriogénico. Por ejemplo, cuando se evaluaron cinco genotipos de banano, se presentó un 37% de formación de callo embriogénico (Escalant *et al.* 1994), mientras que con el cv. “Enano Gigante” se observó una respuesta que varió del 2 al 6% (Navarro *et al.* 1997). En promedio, se ha obtenido un porcentaje de callo embriogénico del 8% (Strosse *et al.* 2003). Al comparar la edad fisiológica del explante de dos genotipos de banano, se encontró que la respuesta de formación de callo embriogénico varía en un rango de 0.7 a 10% (Youssef *et al.* 2010). En el caso de *M. acuminata* Colla, AAA, subgrupo Cavendish, cv. Dwarf Cavendish, al usar flores masculinas jóvenes aisladas de plantas adultas con el fin de inducir la formación y proliferación de nuevas yemas florales *in vitro*, se obtuvo un 12.5 y 25% en la formación de callo embriogénico en medio semisólido y líquido, respectivamente (Pérez-Hernández y Rosell-García 2008). Diversas estrategias pueden utilizarse, tales como el uso directo de las yemas florales en proliferación para el establecimiento de suspensiones celulares, la inducción de callo embriogénico en medio semisólido e incluso la inducción de la organogénesis para la obtención directa de brotes (Darvari *et al.* 2010).

1.11 Organogénesis

La organogénesis es una de las vías morfogénicas mediante la cual se diferencian meristemos a partir de células somáticas y que puede resultar en la producción de órganos. Dicho proceso morfogénico puede darse de manera directa, o bien, con la previa

formación de callo. Existen tres vías por las cuales se da la regeneración *in vitro* vía organogénesis. Las dos primeras dependen de la obtención de órganos adventicios a partir de un callo o bien, directamente del explante. Alternativamente, la tercera vía se presenta con la formación y crecimiento de yemas axilares. También se puede usar esta vía como estrategia para regenerar plantas enteras a partir de ciertos tipos de tejidos. La respuesta morfogénica depende de la inherente plasticidad de los tejidos vegetales y está regulada por los componentes del medio de cultivo. En particular, el balance entre auxinas y citocininas en el medio de cultivo es determinante para el desarrollo de la ruta de regeneración. En la organogénesis, es usual inducir la formación de brotes al incrementar la relación de citocinina/auxina (en algunos casos sólo citocinina). Debido a que la regeneración de órganos es unipolar, dos procesos de inducción organogénica son necesarios para obtener una planta completa: el primero para inducir brotes y el segundo para inducir la formación de raíz (Phillips 2004). La organogénesis ha sido ampliamente utilizada para la propagación masiva de diversos cultivares comerciales de banano, dada la mayor estabilidad genética de los regenerantes obtenidos (García *et al.* 2002). Diferentes tipos de explantes se han empleado, aunque el uso de meristemo apical de los rizomas obtenidos de la planta madre o de hijuelos de espada presentan los mejores resultados en el caso de varios cultivares comerciales (Kulkarni *et al.* 2006). Por otro lado, las flores masculinas jóvenes también pueden ser empleadas para inducir la organogénesis, con la ventaja de reducir los problemas de contaminación, comparado con los resultados obtenidos con meristemas apicales de rizomas. Se obtuvieron un máximo de 13.5 brotes por explante en el cultivar “Berangan” de *M. a.* (AAA) al utilizar las flores masculinas jóvenes; en comparación, el cv. Abu (ABB) presentó en promedio 10.5 brotes por explante (Darvari *et al.* 2010), mientras que en el cultivar Vaibalhla de *M. a.* fueron sólo 3.51 brotes (Hrahsel *et al.* 2014).

1.12 Variación somaclonal (VS)

Variación somaclonal define la variación encontrada en plantas obtenidos mediante el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales (Larkin y Scowcroft 1981). Esta variación, que se manifiesta en el fenotipo, tiene un origen genético y/o epigenético entre somaclones (*soma*= vegetativo, *clon*= copia idéntica). La variación somaclonal puede resultar de la variación genética pre-existente en el explante, i.e., aneusomatías o polisomatías

(D'Amato 1977), o bien, inducida durante la fase de cultivo *in vitro* (Evans *et al.* 1984). Diversas variantes somaclonales se han reportado en varias especies, las cuales se relacionan con cambios en el cariotipo, el nivel de ploidía, el patrón isoenzimático, el crecimiento, la producción, la calidad, la resistencia a enfermedades, así como en la resistencia a factores adversos del suelo o condiciones climáticas (Patil y Navale 2000).

La variación somaclonal puede inducirse por varios ciclos de cultivo de callos o células en suspensión, o por la regeneración de un gran número de plantas a partir de cultivos a largo plazo. Las características deseables en regenerantes y sus progenies se pueden detectar mediante selección *in vitro* a factores bióticos y abióticos, tales como tolerancia a estrés salino, hídrico, o resistencia a herbicidas, entre otros. Dicha evaluación de variantes, seleccionados durante diferentes generaciones por sus características deseables y para la multiplicación estable de dichas variantes, sirve de base en el desarrollo de nuevas líneas mejoradas. Para que ocurra la variación somaclonal, diversos factores influyen, tales como: el tipo y fuente de explante, la edad del cultivo, factor que está relacionado con el número de subcultivos, la concentración y el tipo de reguladores del crecimiento, la fidelidad en el genotipo, la flexibilidad del genotipo, el nivel de ploidía relacionado con los cambios a nivel de cariotipo, los eventos post transcripcionales, la presencia y la activación de transposones y el estado genómico de la planta donadora. Por último, si se parte de germoplasma en conservación es necesario verificar con anterioridad que no haya sufrido algún evento de mutación (Figura 1.1) (Sahijram *et al.* 2003).

Las células vegetales que se cultivan en condiciones *in vitro* exhiben diferentes grados de variación somaclonal. Al combinar una perspectiva molecular con una con enfoque genético, se podría explicar el fenómeno de variación somaclonal. Para ello, es necesario plantear un modelo de selección *in vitro*, en el que se incluya la hipótesis de selección de callos y como cuello de botella, los procesos de desdiferenciación y diferenciación. Las células *in vitro* se pueden clasificar en “células fieles al tipo”, “células neutrales”, “células perjudiciales”, “células benéficas” y “células diferentes al tipo” (Oh *et al.* 2007). Las “células fieles al tipo” son células *in vitro*, a partir de las cuales sus regenerantes no muestran variación somaclonal, pero que pueden presentar modificaciones epigenéticas (variación reversible) necesarios para el proceso de regeneración *in vitro*. Las “células

neutrales” son aquellas que presentan una variación somaclonal deficiente, o sea células idénticas en fenotipo a las “células fieles al tipo” (en crecimiento, división, control del desarrollo y aptitud), que también incluyen a aquéllas que contienen variación somaclonal perjudicial, pero compensada por otro cambio en otra parte del genoma, por genes alternativos y/o de vías metabólicas heredables (Yu *et al.* 2004). El término “células perjudiciales” lo reciben aquellas células que presentan variación somaclonal, con poca adaptación, es decir, una población de células perjudiciales tienen menos aptitud que una población de “células fieles al tipo” ya que en ellas se observa variación somaclonal perjudicial. Por otro lado, las “células benéficas” son aquellas que aunque son diferentes, tienen una alta capacidad de adaptación, incluso mayor a la de las “células fieles al tipo”, producto de la variación somaclonal. El término de “células diferentes al tipo” incluye a todas las células, menos a las “células fieles al tipo” (Wang y Wang 2012).

El ambiente *in vitro* puede ser cambiado durante el proceso de cultivo de células, por ejemplo, el tipo y la cantidad de los RC (Sui *et al.* 2011; Chen *et al.* 2007), e incluso, la adaptación a un ambiente está asociada con frecuencia a la pérdida de aptitud en otros ambientes (Giraud *et al.* 2001; Funchain *et al.* 2000). De esta manera, células perjudiciales, benéficas y neutrales con frecuencia, pero no siempre, están confinadas a uno sólo de los ambientes. Por ejemplo, se requiere la activación del gen *KRYPTONITE7SUVH4* para el mantenimiento del callo, pero también puede impedir su diferenciación (Grafi *et al.* 2007).

La variación somaclonal se considera indeseable en los programas de propagación masiva de genotipos seleccionados, los cuales requieren una estricta propagación clonal en micropropagación y plantas transgénicas. Por el contrario, la variación somaclonal podría verse como una ventaja en la selección de líneas con características sobresalientes, tales como una fructificación temprana o tardía, alta producción y calidad, resistencia o tolerancia a estreses bióticos y abióticos (Brar y Jain 1998).

El banano es conocido por producir variantes somaclonales (Krikorian *et al.* 1993); sin embargo, sólo aquellas plantas que muestran el mismo tipo de variación en brotes laterales, son consideradas como “variantes” (Rodrigues *et al.* 1998). La mayoría de los variantes resultaron ser inferiores al clon parental.



Figura 1.1 Factores involucrados para la inducción de variantes somaclonales en cultivos *in vitro*, adaptado de Miguel y Marum (2011).

En cualquier programa de micropropagación, una tasa de variación somaclonal entre el 3 y 5% es permisible (Sahijram *et al.* 2003), pero en bananos, hasta más de 10% de variación se ha tolerado, debido a la flexibilidad genética del cultivo (Cote *et al.* 1993). En plantas de banano regeneradas a través de organogénesis *in vitro*, se reportó de 6 a 38% de ocurrencia de variantes somaclonales en el cultivar Cavendish (Sahijram *et al.* 2003). También se han detectado 29 casos de variación somaclonal en varios tipos de bananos y plátanos con una incidencia del 0 a 69% (Hwang *et al.* 1997). El Cuadro 1.1, se presenta un resumen de los variantes somaclonales detectados en banano propagados *in vitro*, las fuentes de variación y el método empleado para su detección.

CAPÍTULO I

Cuadro 1.1 Variación somaclonal detectada en el banano propagado *in vitro*.

Ejemplar (Ploidía)	Fuente de variación	Método de detección	Resultados	Referencia
<i>M. a.</i> , (AAA) cv. Valery	Genotipo, tipo de explante y número de subcultivos	RAPD	Pérdida de loci en los regenerantes debido a VS	(Sheidai <i>et al.</i> 2008)
<i>M. a. x M. b.</i> (AAB) cv. French Plantain	Explante, efecto quimérico	Morfología	Reversión del fenotipo de "False Horn" al fenotipo "French Plantain"	(Krikorian <i>et al.</i> 1993)
<i>M. a.</i> (AAAA) cv. CIEN-BTA-03	BA	Morfología, conteo de cromosomas y RAPD	Poliploidía y resistencia a Sigatoka amarilla	(Giménez <i>et al.</i> 2001)
<i>M. a.</i> (AAA) cv. Grand Naine	Rayos gamma	Morfología, RAPD, AFLP y SSR	51% de polimorfismo con AFLP	(Hautea <i>et al.</i> 2004)
<i>M. a.</i> (AAA) cv. Grande Naine	BA y número de subcultivos	RAPD y morfología	Regenerantes con hojas variegadas, menor altura y bajo rendimiento en el somaclon CUDBT-B1	(Martin <i>et al.</i> 2006)
<i>M. a. x M. b.</i> (AAB) cv. Agbagba y Bise Egome	Efecto quimérico	Morfología y tolerancia Sigatoka negra	El somaclon AO2B2-2 mostró tolerancia a Sigatoka negra y características agronómicas superiores	(Nwauzoma <i>et al.</i> 2002)
<i>M. a. x M. b.</i> (AAB) cv. Rastali	Número de subcultivos y activación de transposones	RAPD, IRAP y susceptibilidad a Fusarium	38% de polimorfismo con RAPD y 26% con IRAP	(Muhammad y Othman 2005)
<i>M. a. x M. b.</i> (AAB)	Cultivo de brotes	Morfología	Flores tipo "French" y "Monganga", variación en el follaje e inferiores agronómicamente (Frecuencia del 6%)	(Vuylsteke <i>et al.</i> 1988)
<i>M. a.</i> (AAA)	Explante y número de subcultivos	Morfología	Enanismo, hojas estrechas y con presencia de goma; peciolas y vainas rojizas	(Reuveni y Israeli 1990)

Cuadro 1.1 Continuación.

Ejemplar (Ploidía)	Fuente de variación	Método de detección	Resultados	Referencia
<i>M. a.</i> (AAA) cv. Cavendish y Williams	Metabolismo del ácido gibérelico	Morfología y respuesta fisiológica	Enanismo	(Damasco <i>et al.</i> 1996)
<i>M. a.</i> (AAA) cv. Grand Nain	Cultivo embriogénico y efecto del dicamba	Morfología	0.5-3.6% de regenerantes fuera de tipo	(Shchukin <i>et al.</i> 1997)
<i>M. a.</i> (AAA) cv. Nanico	Número de subcultivos	Morfología	Variación a partir del quinto subcultivo de 1.3 a 3.8%	(Rodrigues <i>et al.</i> 1998)
<i>M. a.</i> (AAA) cv. Grand Naine	Metabolismo de citocininas, AIA y ABA	Morfología y pruebas bioquímicas	Plantas con hojas variegadas, bajo contenido de citocininas, AIA y pigmentos fotosintéticos	(Zaffari <i>et al.</i> 1998)
<i>M. a.</i> x <i>M. b.</i> (AAB) cv. Dwarf Superplátano	Explante y efecto quimérico	Morfología	Uniformidad en plantas obtenido de explantes florales	(Krikorian <i>et al.</i> 1999)
<i>M. a.</i> (AAA) cv. Grand Naine	Explante, AIA, AIB, activación de transposones	MSAP	3% de polimorfismo en regenerantes de explantes florales y 1.7% de meristemas de hijuelo	(Peraza-Echeverría <i>et al.</i> 2001)
<i>M. a.</i> x <i>M. b.</i> (AAB) CEMSA 3/4	TDZ	Morfología	Brotes con apariencia de bulbo, carnoso y rodeado de hojas verde claro	(Roels <i>et al.</i> 2005)
<i>M. a.</i> (AAA) cv. Zelig	BA y número de subcultivos	RAPD	Polimorfismo de hasta un 55%	(Bairu <i>et al.</i> 2006)
<i>M. a.</i> (AAA) cv. Robusta y Giant Governor	Número de subcultivos	RAPD e ISSR	1.7 a 5.08% de polimorfismo por RAPD e ISSR respectivamente para "Robusta" y 0.83 a 5% para "Giant Governor"	(Ray <i>et al.</i> 2006)

CAPÍTULO I

Cuadro 1.1 Continuación.

Ejemplar (Ploidía)	Fuente de variación	Método de detección	Resultados	Referencia
<i>M. a.</i> x <i>M. b.</i> (AAB) cv. Curare Enano	Efecto quimérico	Análisis de diferencia representacional	Reversión del fenotipo enano	(Oh <i>et al.</i> 2007)
<i>M. a.</i> (AAA) cvs. Williams y Grand Naine	BA y topolinas	RAPD	Variación de 19 a 23%	(Bairu <i>et al.</i> 2008)
<i>M. a.</i> (AAA) cv. Grande Naine	Etilmetanosulfonato	Cebadores para genes específicos	33 mutaciones putativas, de las cuales 36, 49 y 15% están relacionadas con silenciamiento, en mal sentido y alelos truncados respectivamente	(Jankowicz-Cieslak <i>et al.</i> 2012)
<i>M. a.</i> ssp. Burmanica (AA) Calcuta 4; (AAA) Gros Michel; <i>M. b.</i> (BB) Montpellier; <i>M. a.</i> x <i>M. b.</i> (AB) Neypoovan, (AAB) Agbagba, (ABB) Bluggoe	Variación natural y cultivo <i>in vitro</i>	AFLP y SSR	6.15% de variación entre clones; 0.5 y 5.65% debido a variación natural y somaclonal respectivamente	(Vroh-Bi <i>et al.</i> 2011)
<i>M. a.</i> (AAA) cv. Giant Cavendish	Cultivo de tejidos	Morfología y resistencia a <i>Fusarium oxysporum</i> sp. <i>cubense</i>	Variación en características morfológicas y resistencia a <i>Fusarium</i> (moderada y alta)	(Hwang y Ko 2004)
<i>M. a.</i> (AA) Colla ssp. malacensis	Cultivo embriogénico, 2,4-D y edad del cultivo	Citometría de flujo	Mayor contenido de ADN en cultivos de 2 años	(Escobedo-GM <i>et al.</i> 2014)
<i>M. a.</i> x <i>M. b.</i> (AAB) cv. Rajapari	TDZ y BA	Morfología	Enanismo y variación del 11.11 al 20%	(Manjula <i>et al.</i> 2014)

Cuadro 1.1 Continuación.

Ejemplar (Ploidía)	Fuente de variación	Método de detección	Resultados	Referencia
<i>M. a.</i> (AAA) cv. Dwarf Cavendish	Rayos gama	Morfología, SSR	Enanismo; Polimorfismo del 33 al 100%	(Miri <i>et al.</i> 2014)
<i>M. a.</i> (AAA) cv. Lakatan	Edad del cultivo y 2,4-D	SSR y MSAP	356 eventos de metilación en regenerantes <i>in vitro</i> y las características correlacionaron con el marcador SSR	(Sales y Butardo 2014)
<i>M. a.</i> (AAA) cv. Robusta	Micropropagación	Morfología y RAPD	43% de polimorfismo; 25 a 35% de variación fenotípica relacionada con "Extraenanismo" y "Variación en el follaje"	(Shiddalingeswara <i>et al.</i> 2014)

1.13 Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares se definen como secuencias específicas de ADN codificante o no codificante que permiten detectar polimorfismos y revelar la posible ocurrencia de cambios genéticos entre dos o más individuos (Azofeifa-Delgado 2006). De manera ideal, éstos son representativos a nivel del genoma completo. Para su aplicación el ADN extraído se digiere con enzimas de restricción que reconocen regiones específicas en el ADN, o bien, se amplifican con cebadores definidos, o también, se pueden combinar ambos procedimientos (Prado *et al.* 2007; Sahijram *et al.* 2003). El resultado es un patrón de bandas que puede ser observado en un gel, por lo general de agarosa o poliacrilamida (Jaligot *et al.* 2004). Esta herramienta, además de otros usos, es de gran utilidad para el estudio de estabilidad genética en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales (Patzak 2003). Se sugiere que se deben combinar al menos dos tipos de marcadores para corroborar los resultados y así evitar falsos positivos, al trabajar con marcadores moleculares (Feuser *et al.* 2003; Kubis *et al.* 2003).

En el Cuadro 1.2 se muestran algunos ejemplos de la aplicación de marcadores moleculares durante la propagación por cultivo de tejidos en *Musa*. Es importante hacer notar que la mayoría de los trabajos basados en organogénesis han resultado en un mayor porcentaje de variación somaclonal, comparado con los obtenidos por ES. Esto último es de gran relevancia, ya que de verificarse estos datos con los nuevos protocolos

de ES permitirán su uso en los programas de renovación de plantaciones comerciales. Además, permitiría contar con un modelo en el que partiendo del mismo explante, se compare la variación somaclonal de plantas regeneradas a través de dos vías morfogénicas, i.e., organogénesis vs embriogénesis, para estudiar las bases moleculares de esta variación en el banano.

Cuadro 1.2 Ejemplos de aplicación de marcadores moleculares en el cultivo *in vitro* de *Musa* spp.

Ejemplar (Plodia)	Ruta morfogénica	Polimorfismo (%)	Referencia
<i>M. a.</i> (AAA) cv. Cavendish	Organogénesis	55 (AFLP)	(Bairu <i>et al.</i> 2006)
<i>M. a.</i> (AAA) cv. Williams	Organogénesis	9.1 – 100 (RAPD)	(Mohamed 2007)
<i>M. a.</i> (AAA) cv. Valery	Organogénesis	51.4 (RAPD)	(Sheidai <i>et al.</i> 2008)
<i>M. a.</i> (AAA) cv. Enano Gigante	Organogénesis	3.96 – 23 (AFLP-MSAP)	(James <i>et al.</i> 2004)
<i>M. a.</i> (AAA) cv. Vaibalhla	Organogénesis	0 (RAPD e ISSR)	(Hrahsel <i>et al.</i> 2014)
<i>M. a.</i> (AAA) cv. Enano Gigante	Embriogénesis somática	3.6 (Morfología)	(Shchukin <i>et al.</i> 1997)
<i>M. a.</i> (AAA) cv. Enano Gigante	Embriogénesis somática	1.4 (AFLP)	(Youssef <i>et al.</i> 2011)
<i>M. a.</i> (AAA) cv. Williams	Embriogénesis somática	1.6 (AFLP)	

1.14 Secuencias internas de regiones simples repetidas (ISSR)

El marcador molecular de secuencias internas de regiones simples repetidas (ISSR) fue desarrollado ante la necesidad de explorar las regiones repetidas internas de microsatélites (SSR) (Lagercrantz *et al.* 1993). La técnica se basa en la amplificación de secuencias de ADN que se encuentran entre dos regiones de microsatélites repetidos (Zietkiewicz *et al.* 1994). ISSR es una técnica simple, rápida y eficiente que genera productos amplificados de 200 a 2,000 pb de longitud. La técnica es altamente reproducible, ya que con cebadores más largos se utilizan altas temperaturas de alineamiento (Reddy *et al.* 2002). Se emplea un cebador que contiene una sola repetición de un SSR particular (di-, tri-, tetra-, o pentanucleotidos), de 16 a 25 pb, o bien ancladas

(Wu *et al.* 2009; Gupta *et al.* 1994; Meyer *et al.* 1993), o terminales no anclados ya sea en la región 3' o 5' para más de cuatro nucleótidos, los cuales a menudo son degenerados. Los ISSR combinan las ventajas de los AFLP y SSR con la conveniencia de los RAPD (Zietkiewicz *et al.* 1994). Por lo que esta técnica ha sido utilizada exitosamente en el análisis de diversidad de varias especies frutales, tales como *Poncirus trifoliata* (Fang *et al.* 1997), *Citrus* (Feuser *et al.* 2003), *Nephelium ramboutan-ake* Leenh (Clyde *et al.* 2005) y *Vitis* spp. (Wu *et al.* 2009; Moreno *et al.* 1998). Algunos ejemplos de la aplicación de los ISSR, en cuanto a la capacidad de detectar polimorfismos y variabilidad genética en diversos estudios con *Musa* spp., se observan en el Cuadro 1.3.

Cuadro 1.3 Ejemplos de aplicación de marcadores moleculares ISSR en *Musa* spp.

Ejemplar	Fuente de variación	Polimorfismo (%)	Referencia
<i>M. a.</i> (AAA) cv. Williams	Subcultivos, citocininas y topolinas	37-56 (10 cebadores)	(Aremu <i>et al.</i> 2013)
Cultivares comerciales (21)	Constitución genómica y nivel de ploidía	56 (12 cebadores)	(Venkatachalam <i>et al.</i> 2008)
<i>M. a.</i> (AAA) cv., Robusta, Giant Governor y Martaman (AAB)	Micropropagación	5 – 5.8 (12 cebadores)	(Ray <i>et al.</i> 2006)
<i>M. a.</i> x <i>M. b.</i> (AAB) cv., Nanjanagudu Rasabale	BA y Kin	0 (12 cebadores)	(Lakshmanan <i>et al.</i> 2007)

1.15 Polimorfismo amplificado de secuencias relacionadas (SRAP)

El marcador SRAP tiene como objetivo la amplificación de marcos de lectura abiertos (ORFs). Se basan en la amplificación de secuencias mediante el uso de dos cebadores de 17 o 18 nucleótidos de longitud, los cuales consisten en una secuencia núcleo, con una longitud de 13 a 14 bases, donde los primeros 10 o 11 nucleótidos empezando en el extremo 5', son de constitución no específica (secuencia de relleno), seguido por la secuencia constante "CCGG" en el cebador sentido y "AATT" en el cebador anti-sentido. La secuencia núcleo está seguida por tres nucleótidos selectivos en el extremo 3' (Figura 1.2). La variación en estos tres nucleótidos selectivos genera un conjunto de cebadores que comparten la misma secuencia núcleo. El objetivo de construir cebadores sentido y anti sentido es evitar la formación de horquillas u otras estructuras secundarias, y obtener un contenido GC de 40 a 50%. Además, la secuencia relleno del cebador sentido y anti

sentido deben ser diferentes una de otra.

El objetivo de usar una secuencia constante de “CCGG” en el núcleo del cebador sentido es para reconocer regiones de exones o de marco de lectura abierta (ORFs). Esto último basándose en el hecho de que los exones son regiones ricas en GC. Por otro lado la secuencia constante AATT cercana al extremo 3’ del cebador anti sentido se diseñó para el reconocimiento de regiones ricas en AT, ya que éstas se encuentran con frecuencia en los promotores e intrones. Debido a que los intrones, los promotores y los espaciadores son variables entre diferentes individuos; la diferencia intrínseca entre ellos hace factible la generación de bandas polimórficas.

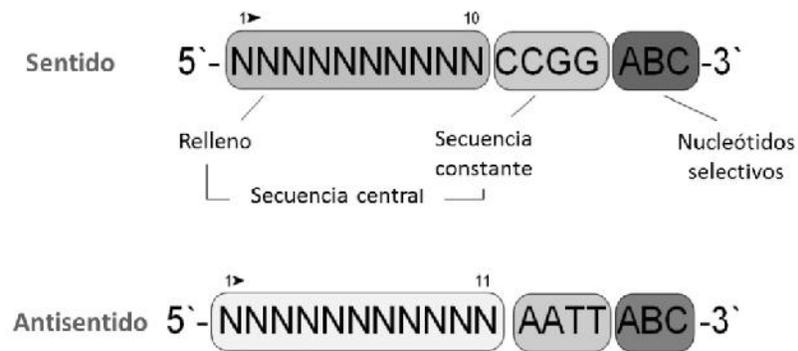


Figura 1.2 Representación de la construcción de cebador sentido y anti sentido SRAP (Li y Quiros 2001).

1.16 Polimorfismo amplificado dirigido a intrones (ITAP)

Los marcadores ITAP tienen como objetivo la amplificación de regiones de intrones y regiones de secuencias de empalme intrón-exón. El principio de esta técnica se basa en los SRAP, el polimorfismo amplificado de regiones dirigidas (TRAP) y el polimorfismo amplificado de regiones conservadas (CoRAP). Consiste en el uso de dos cebadores para la amplificación de regiones de intrones. Para ello, uno de los cebadores consiste en el anti sentido de la técnica SRAP, cuya característica es que contiene una secuencia constante de “AATT”, el cual reconoce regiones de promotores y de intrones, tal y como se describió en el apartado anterior. El segundo cebador tiene su origen en una técnica relacionada a intrones que amplifica regiones conservadas de regiones de empalme intrón-exón (IT-ISJ), el cual fue desarrollado por Zheng *et al.* (2008). El cebador está compuesto por 18 nucleótidos con un núcleo que contiene una secuencia “ACCTGCA” en

anti sentido en el extremo 3', complementaria a la secuencia conservada "TGCAGGT" de la región de empalme. Estos cebadores son complementados con la secuencia "GACTGCGT" en el extremo 5' y con tres nucleótidos selectivos en el extremo 3'.

Los intrones son secuencias no codificantes que pertenecen a los genes y están intercaladas a lo largo del genoma. Los intrones son más variables y adecuados para el desarrollo de marcadores de ADN, en comparación con los exones. El polimorfismo revelado por esta técnica puede atribuirse a la variabilidad en la longitud de los intrones y a mutaciones puntuales por los sitios de unión de los cebadores ITAP (Xiong *et al.* 2013).

1.17 Recapitulación de la revisión y planteamiento del trabajo de investigación

Los cultivares comestibles del género *Musa* presentan baja capacidad reproductiva por la vía sexual, lo cual es una limitante para el mejoramiento genético. En campo los cultivares comestibles producen propágulos conocidos como hijuelos de espada y de agua. Los de espada se usan para la renovación de plantaciones y los de agua son eliminados por ser menos vigorosos. La disponibilidad de hijuelos de espada es una limitante, ya que para obtenerlos se necesitan destinar áreas exclusivas para su producción. Pero se conoce poco sobre la variación genética que hay entre la planta madre y sus hijos. Por otro lado, la ES y la OD representan una alternativa biotecnológica para la propagación de cultivares de interés comercial. Sin embargo estos sistemas de regeneración *in vitro* han sido afectados por la incidencia de VS. En la literatura se ha observado mayor polimorfismo al emplear la OD con respecto a los reportados por ES. Sin embargo, esta variación puede estar presente previo al cultivo de tejidos, lo cual es dependiente del grado de desarrollo del tejido empleado para inducir la morfogénesis *in vitro*. Además, ambas rutas morfogénicas han sido estudiados por separado. Al utilizar tejido somático proveniente de una sola planta madre para regenerar plantas tanto por OD como ESI, a partir de flores masculinas como explantes, se busca eliminar la variación que pudiese haber previo al CTV y la variación obtenida podrá ser interpretada como consecuencia de los procesos por las que pasa el tejido hasta la obtención de plantas regeneradas. Con el empleo de quince marcadores moleculares tipo ISSR, cinco de SRAP y veinticinco combinaciones ITAP se determinaron el nivel de variación natural que hay entre la planta madre, hijuelo de espada y de agua del cv. Manzano y Enano Gigante. Con los cebadores altamente informativos para detectar polimorfismo natural, se emplearon para determinar el nivel de

CAPÍTULO I

variación entre plantas regeneradas por OD y dos vías de ESI (ESI-1 y ESI-2) en el cv. Manzano. Los resultados obtenidos del nivel de polimorfismo por cada ruta se contrastaron con el detectado entre la planta madre, hijuelo de espada y de agua.

HIPÓTESIS

Si a partir de un mismo tejido somático, expuesto a diferentes RC durante el cultivo *in vitro* (citocininas o auxinas), se regeneran plantas a través de organogénesis directa y embriogénesis somática indirecta que difieren a nivel molecular, entonces el nivel de variación generado durante el cultivo de tejidos es por efecto de la ruta morfogénica empleada.

OBJETIVO GENERAL

Analizar la variación somaclonal de plantas regeneradas de banano, empleando la OD y la ESI como modelos biológicos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer y evaluar los protocolos de regeneración por ES y OD a partir de yemas florales en proliferación en dos genotipos de banano, *Musa acuminata* (AAA, subgrupo Cavendish) cv. Enano Gigante clon Francés, y *M. acuminata* x *M. balbisiana* (AAB, subgrupo Silk) cv. Manzano.
2. Determinar la variación genética natural entre la planta madre, hijuelo de espada e hijuelo de agua mediante marcadores moleculares ISSR, SRAP e ITAP y contrastarla con la variación observada entre regenerantes de OD y ESI del cv. Manzano, para determinar posibles fuentes de variación somaclonal según el sistema de regeneración.

JUSTIFICACIÓN

En el banano, la propagación vegetativa de manera natural se da con la formación de hijuelos, a partir del meristemo apical subterráneo o rizoma, lo que se considera como la semilla vegetativa que se utiliza para la renovación de plantaciones. La obtención de hijuelos en campo es genotipo dependiente y llega a ser una limitante que implica altos costos de producción, además de que no garantiza el uso de semilla libre de patógenos para la renovación del cultivo. Por ello, el cultivo de tejidos vegetales es una alternativa clave para cubrir la demanda creciente de plantas sanas en banano. Sin embargo, un factor que afecta esta herramienta biotecnológica es la incidencia de variación somaclonal. Por lo cual, el estudio básico de sus causas que coadyuven al desarrollo de nuevos protocolos de propagación por ESI y OD, son necesarios para conocer las bases biológicas de dicha variación y a su vez, para contar con un método de detección temprana, para los usuarios de plantas provenientes de cultivo de tejidos. Conjuntamente es importante notar que a la fecha no existen estudios que comparen variación somaclonal respecto de los sistemas de propagación *in vitro* más usados en banano, i. e., ESI y OD., partiendo del mismo material progenitor.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para conseguir los objetivos se plantea una estrategia experimental que consiste en lo descrito en la Figura 1.3.

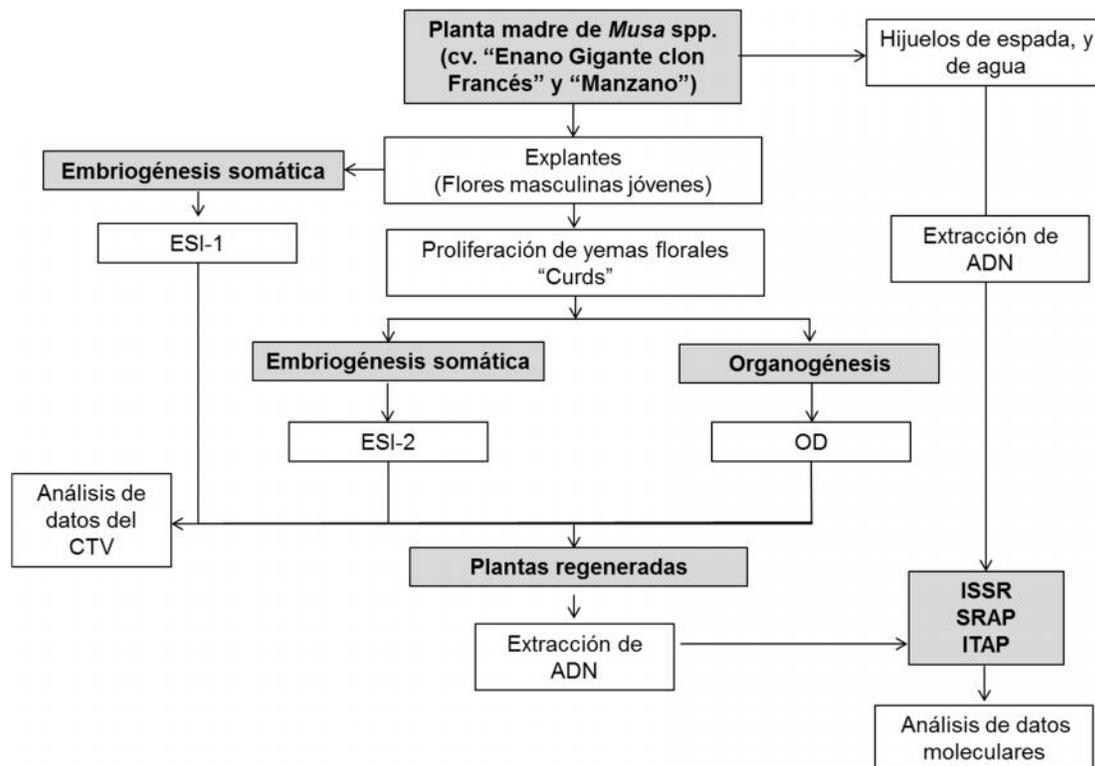


Figura 1.3 Estrategia experimental para alcanzar los objetivos planteados.

BIBLIOGRAFÍA

- Aremu, A.O., M.W. Bairu, L. Szucová, K. Dolezal, J.F. Finnie y J. Van Staden (2013). Genetic fidelity in tissue-cultured Williams bananas - The effect of high concentration of topolins and benzyladenine. *Scientia Horticulturae*, 161, 324-327.
- Arvanitoyannis, I.S., A.G. Mavromatis, G. Grammatikaki-Avgeli y M. Sakellariou (2008). Banana: cultivars, biotechnological approaches and genetic transformation. *International Journal of Food Science & Technology*, 43, 1871-1879.
- Azofeifa-Delgado, A. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas: aplicaciones en frutales del Trópico. *Agronomía Mesoamericana*, 17, 221-242.
- Bairu, M.W., C.W. Fennell y J. Van Staden (2006). The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in Cavendish banana (*Musa* AAA cv. Zelig). *Scientia Horticulturae*, 108, 347-351.
- Bairu, M.W., W.A. Stirk, K. Dolezal y J. Van Staden (2008). The role of topolins in micropropagation and somaclonal variation of banana cultivars "Williams" and "Grand Naine" (*Musa* spp. AAA). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 95, 373-379.
- Brar, D.S. y S.M. Jain (1998). Somaclonal variation: mechanism and applications in crop improvement, *en: Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement*, Jain, S.M., D.S. Brar y B.S. Ahloowalia, (eds.), Springer Netherlands pp. 15-37.
- Clyde, M.M., P.C. Chew, I. Salma, M.N. Normah y V.R. Rao (2005). Genetic diversity of *Nephelium ramboutan-ake* Leenh., assessed using RAPD and ISSR markers. *Acta Horticulturae (ISHS)*, 665, 171-182.
- Cote, F.X., J.A. Sandoval, P.H. Marie y E. Auboiron (1993). Variation in micropropagated bananas and plantains: literature survey. *Fruits*, 48, 15-22.
- Chen, F.Q., Y. Fu, D.L. Wang, X. Gao y L. Wang (2007). The effect of plant growth regulators and sucrose on the micropropagation and microtuberization of

-
- Dioscorea nipponica* Makino. *Journal of Plant Growth Regulation*, 26, 38-45.
- D'Amato, F. (1977). Nuclear cytology in relation to development. CUP Archive p.
- Damasco, O.P., I.D. Godwin, M.K. Smith y S.W. Adkins (1996). Gibberellic acid detection of dwarf offtypes in micropropagated Cavendish bananas. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 36, 237-241.
- Daniells, J., C. Jenny, D. Karamura y K. Tomekpe (2001). *Musalogue a catalogue of musa germplasm. Diversity in the genus Musa*. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 213 p.
- Darvari, F.M., M. Sariah, M.P. Puad y M. Maziah (2010). Micropropagation of some Malaysian banana and plantain (*Musa* sp.) cultivars using male flowers. *African Journal of Biotechnology*, 9, 2360-2366.
- Denchev, P.D., A.I. Kuklin y A.H. Scragg (1992). Somatic embryo production in bioreactors. *Journal of Biotechnology*, 26, 99-109.
- Escalant, J.V., C. Teisson y F. Cote (1994). Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). *In Vitro Cellular and Development Biololgy-Plant*, 30, 181-186.
- Escobedo-GM, R.M., J.I. Maldonado-Borges, M.J. Burgos-Tan, N. Valadez-González y J.R. Ku-Cauich (2014). Using flow cytometry and cytological analyses to assess the genetic stability of somatic embryo-derived plantlets from embryogenic *Musa acuminata* Colla (AA) ssp. *malaccensis* cell suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 116, 175-185.
- Evans, D.A., W.R. Sharp y H.P. Medina-Filho (1984). Somaclonal and gametoclinal variation. *American Journal of Botany*, 71, 759-774.
- Fang, D.Q., M.L. Roose, R.R. Krueger y C.T. Federici (1997). Fingerprinting trifoliolate orange germ plasm accessions with isozymes, RFLPs, and inter-simple sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 95, 211-219.

- Feuser, S., K. Meler, M. Daquinta, M.I.P. Guerra y R.O. Nodari (2003). Genotypic fidelity of micropropagated pineapple (*Ananas comosus*) plantlets assessed by isozyme and RAPD markers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 72, 221-227.
- Funchain, P., A. Yeung, J. Lee-Stewart, R. Lin, M.M. Slupska y J.H. Miller (2000). The consequences of growth of a mutator strain of *Escherichia coli* as measured by loss of function among multiple gene targets and loss of fitness. *Genetics*, 154, 959-970.
- García, L.R., P.J. Pérez, I.C. Bermúdez, P.P. Orellana, N.R. Veitía, L.R. García, Y.M. Padrón y C.Q. Romero (2002). Estudio comparativo de la variabilidad producida por la inducción de mutaciones y el cultivo de tejidos en banano (*Musa* sp.) cv Grande naine. *Infomusa*, 11, 4-6.
- George, E.F., M.A. Hall y G.J.D. Klerk (2008). Somatic Embryogenesis, *en: Plant Propagation by Tissue Culture*, George, E., M. Hall y G.J. Klerk, (eds.), Springer Netherlands pp. 335-354.
- Giménez, C., E. De García, N.X. De Enrech y I. Blanca (2001). Somaclonal variation in banana: cytogenetic and molecular characterization of the somaclonal variant Cien BTA-03. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 37, 217-222.
- Giraud, A., I. Matic, O. Tenaillon, A. Clara, M. Radman, M. Fons y F. Taddei (2001). Costs and benefits of high mutation rates: adaptive evolution of bacteria in the mouse gut. *Science*, 291, 2606-2608.
- Grafi, G., H. Ben-Meir, Y. Avivi, M. Moshe, Y. Dahan y A. Zemach (2007). Histone methylation controls telomerase-independent telomere lengthening in cells undergoing dedifferentiation. *Developmental Biology*, 306, 838-846.
- Grabin, A., J.L. Ortiz, T. Lescot, N. Ferrère y F.X. Cote (2000). Recovery and regeneration of embryogenic cultures from female flowers of False Horn Plantain. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 61, 237-244.
- Gupta, M., Y.S. Chyi, J. Romero-Severson y J.L. Owen (1994). Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-

-
- sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics*, 89, 998-1006.
- Hakkinen, M. (2013). Reappraisal of sectional taxonomy in *Musa* (Musaceae). *Taxon*, 62, 809-813.
- Hautea, D.M., G.C. Molina, C.H. Balatero, N.B. Coronado, E.B. Pérez, M.T.H. Alvarez, A.O. Canama, R.H. Akuba, R.B. Quilloy, R.B. Frankie y C.S. Caspillo (2004). Analysis of induced mutants of Philippine bananas with molecular markers, *en: Banana improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations*, Jain, S.M. y R. Swennen, (eds.), Science Publishers, Inc., Enfield. pp. 45-58.
- Hrahnel, L., A. Basu, L. Sahoo y R. Thangjam (2014). *In vitro* propagation and assessment of the genetic fidelity of *Musa acuminata* (AAA) cv. Vaibalhla derived from immature male flowers. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172, 1530-1539.
- Hwang, S.C. y W.H. Ko (2004). Cavendish banana cultivars resistant to *Fusarium* Wilt acquired through somaclonal variation in Taiwan. *Plant Disease*, 88, 580-588.
- Hwang, S.C., C.Y. Tang, E.A. Frison, J.P. Horry y D. De Waele (1997). Somaclonal variation and its use for improving Cavendish (AAA dessert) bananas in Taiwan. *en: "Workshop on new frontiers in resistance breeding for nematode, Fusarium or Sigatoka, Kuala Lumpur (Malasia) 2-5 Oct 1997"*.
- Jaligot, E., T. Beul, F.C. Baurens, N. Billotte y A. Rival (2004). Search for methylation-sensitive amplification polymorphisms associated with the mantled variant phenotype in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq). *Genome*, 47, 224-228.
- James, A.C., S. Peraza-Echeverria, V. Herrera-Valencia y O. Martinez (2004). Application of the amplified fragment length polymorphism (AFLP) and the methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) techniques for the detection of DNA polymorphisms and changes in DNA methylation in micropropagated bananas, *en: Banana Improvement: Cellular, Molecular Biology and Induced Mutations*, Jain, S.M. y R. Swennen, (eds.), Science Publishers, Inc., Enfield. pp.
- Jankowicz-Cieslak, J., O.A. Huynh, M. Brozynska, J. Nakitandwe y B.J. Till (2012). Induction, rapid fixation and retention of mutations in vegetatively propagated

banana. *Plant Biotechnology Journal*, 10, 1056-1066.

Jiménez, V.M. (2001). Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 13, 196-223.

Kacar, Y.A. y B. Faber (2012). Micropropagation of Banana, *en: Plant Cell Culture Protocols*, Loyola-Vargas, V.M. y N. Ochoa-Alejo, (eds.), Humana Press pp. 143-151.

Krikorian, A.D., H. Irizarry, S.S. Cronauer-Mitra y E. Rivera (1993). Clonal fidelity and variation in plantain (*Musa AAB*) regenerated from vegetative stem and floral axis tips *in vitro*. *Annals of Botany*, 71, 519-535.

Krikorian, A.D., H. Irizarry, R. Goenaga, M.E. Scott y B.E.L. Lockhart (1999). Stability in plant and bunch traits of a "French-type" dwarf plantain micropropagated from the floral axis tip and five lateral corm tips of a single mother plant: Good news on the tissue culture and bad news on banana streak virus. *Scientia Horticulturae*, 81, 159-177.

Kubis, S.E., A.M. Castilho, A.V. Vershinin y J.S. Heslop-Harrison (2003). Retroelements, transposons and methylation status in the genome of oil palm (*Elaeis guineensis*) and the relationship to somaclonal variation. *Plant Molecular Biology Reporter*, 52, 69-79.

Kulkarni, V.M., P. Suprasanna y V.A. Bapat (2006). Plant regeneration through multiple shoot formation and somatic embryogenesis in a commercially important and endangered indian banana cv. Rajeli. *Current science*, 90, 842-846.

Lagercrantz, U., H. Ellegren y L. Andersson (1993). The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acids Research*, 21, 1111-1115.

Lakshmanan, V., S.R. Venkataramareddy y B. Neelwarne (2007). Molecular analysis of genetic stability in long-term micropropagated shoots of banana using RAPD and ISSR markers. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10, 106-113.

-
- Larkin, P.J. y W.R. Scowcroft (1981). Somaclonal variation –a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, 60, 197-214.
- Li, G. y C.F. Quiros (2001). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *Theoretical and Applied Genetics*, 103, 455-461.
- Loyola-Vargas, V., C. De la Peña, R.M. Galaz-Avalos y F.R. Quiroz-Figueroa (2008). Plant Tissue Culture, *en: Molecular Biomechanics Handbook*, Walker, J.M. y R. Rapley, (eds.), Humana Press, Hertfordshire, UK. pp. 875-904.
- Loyola-Vargas, V. y N. Ochoa-Alejo (2012). An Introduction to Plant Cell Culture: The Future Ahead, *en: Plant Cell Culture Protocols*, Loyola-Vargas, V.M. y N. Ochoa-Alejo, (eds.), Humana Press, Hertfordshire, UK. pp. 1-8.
- Maldonado-Borges, J.I., J.R. Ku-Cauich y R.M. Escobedo-GM (2013). Annotation of differentially expressed genes in the somatic embryogenesis of *Musa* and their location in the banana genome. *The Scientific World Journal*, 2013, 1-7.
- Manjula, R., P. Jholgiker, K.V. Subbaiah, G. Prabhuling, G.S.K. Swamy y K.Y. Lenin (2014). Morphological abnormality among hardened shoots of banana cv. Rajapuri (AAB) after *in vitro* multiplication with TDZ and BAP from excised shoot tips. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*, 7, 465-470.
- Martin, K.P., S.K. Pachathundikandi, C.L. Zhang, A. Slater y J. Madassery (2006). RAPD analysis of a variant of banana (*Musa* sp.) cv. Grande Naine and its propagation via shoot tip culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 42, 188-192.
- Meyer, W., T.G. Mitchell, E.Z. Freedman y R. Vilgalys (1993). Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 2274-2280.

- Miguel, C. y L. Marum (2011). An epigenetic view of plant cells cultured *in vitro*: somaclonal variation and beyond. *Journal of Experimental Botany*, 62, 3713-3725.
- Miri, S.M., A. Mousavi, M.R. Naghavi y B.N. Khiabani (2014). Molecular analysis of *Musa* mutants resistant to salinity by microsatellite markers. *Trakia Journal of Sciences*, 2, 114-120.
- Mohamed, A.E. (2007). Morphological and molecular characterization of some banana micro-propagated variants. *International Journal of Agriculture & Biology*, 9, 707-714.
- Moreno, S., J.P. Martín y J.M. Ortiz (1998). Inter-simple sequence repeats PCR for characterization of closely related grapevine germplasm. *Euphytica*, 101, 117-125.
- Muhammad, A. y F.Y. Othman (2005). Characterization of *Fusarium* wilt-resistant and *Fusarium* wilt-susceptible somaclones of banana cultivar rastali (*Musa* AAB) by random amplified polymorphic DNA and retrotransposon markers. *Plant Molecular Biology Reporter*, 23, 241-249.
- Nakamura, T., T. Taniguchi y E. Maeda (1992). Studies on somatic embryogenesis of coffee by scanning electron microscope. *Japanese journal of crop science*, 61, 476-486.
- Navarro, C., R.M. Escobedo y A. Mayo (1997). *In vitro* plant regeneration from embryogenic cultures of a diploid and a triploid, Cavendish banana. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 51, 17-25.
- Nelson, S.C., R.C. Ploetz y K.A. Kay (2006). *Musa* species (banana and plantain), Rep. No. 2.2. Species Profiles for Pacific Island Agroforestry. Permanent Agriculture Resources, Holualoa, Hawai'i, 33 p.
- Novak, F.J., R. Afza, M. Van Duren, M. Perea-Dallos, B.V. Confer y T. Xiolang (1989). Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB) bananas (*Musa* spp.). *Bio/Technology*, 7, 154-

159.

- Nwauzoma, A.B., A. Tenkouano, J.H. Crouch, M. Pillay, D. Vuylsteke y L.A. Daniel-Kalio (2002). Yield and disease resistance of plantain (*Musa* spp., AAB group) somaclones in Nigeria. *Euphytica*, 123, 323-331.
- Oh, T.J., M.A. Cullis, K. Kunert, I. Engelborghs, R. Swennen y C.A. Cullis (2007). Genomic changes associated with somaclonal variation in banana (*Musa* spp.). *Physiologia Plantarum*, 129, 766-774.
- Ortiz, R. (1995). *Musa* genetics, en: Bananas and plantains, Gowen, S., (eds.), Chapman & Hall, London. pp. 84-109.
- Ortiz, R. (1997). Morphological variation in *Musa* germplasm. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 44, 393-404.
- Patil, P.V. y P.A. Navale (2000). Somaclonal variation in fruit crops: a review. *Journal of Maharashtra Agricultural Universities*, 25, 8-14.
- Patzak, J. (2003). Assessment of somaclonal variability in hop (*Humulus lupulus* L.) *in vitro* meristem cultures and clones by molecular methods. *Euphytica*, 131, 343-350.
- Peraza-Echeverria, S., V.A. Herrera-Valencia y A.J. Kay (2001). Detection of DNA methylation changes in micropropagated banana plants using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP). *Plant Science*, 161, 359-367.
- Pérez-Hernández, J.B. y P. Rosell-García (2008). Inflorescence proliferation for somatic embryogenesis induction and suspension-derived plant regeneration from banana (*Musa* AAA, cv. Dwarf Cavendish) male flowers. *Plant Cell Reports*, 27, 965-971.
- Phillips, G.C. (2004). *In vitro* morphogenesis in plants-recent advances. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 40, 342-345.
- Prado, M.J., M.V. Gonzalez, S. Romo y M.T. Herrera (2007). Adventitious plant regeneration on leaf explants from adult male kiwifruit and AFLP analysis of genetic variation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 88, 1-10.

- Quiróz-Figueroa, F., C. Fuentes-Cerda, R. Rojas-Herrera y V. Loyola-Vargas (2002). Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. *Plant Cell Reports*, 20, 1141-1149.
- Quiróz-Figueroa, F.R., R. Rojas-Herrera, R.M. Galaz-Avalos y V. Loyola-Vargas (2006). Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86, 285-301.
- Ray, T., I. Dutta, P. Saha, S. Das y S.C. Roy (2006). Genetic stability of three economically important micropropagated banana (*Musa* spp.) cultivars of lower Indo-Gangetic plains, as assessed by RAPD and ISSR markers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 85, 11-21.
- Reddy, M.P., N. Sarla y E.A. Siddiq (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128, 9-17.
- Reuveni, O. y Y. Israeli (1990). Measures to reduce somaclonal variation in *in vitro* propagated bananas. *Acta Horticulturae (ISHS)*, 275, 307-3014.
- Rodrigues, P.H.V., N.A. Tulmann, N.P. Cassieri y B.M.J. Mendes (1998). Influence of the number of subcultures on somaclonal variation in micropropagated Nanico (*Musa* spp., AAA group). *Acta Horticulturae (ISHS)*, 490, 469-474.
- Roels, S., M. Escalona, I. Cejas, C. Noceda, R. Rodriguez, M.J. Canal, J. Sandoval y P. Debergh (2005). Optimization of plantain (*Musa* AAB) micropropagation by temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82, 57-66.
- Rojas-Herrera, R. y V.M. Loyola-Vargas (2002). Induction of a class III acidic chitinase in foliar explants of *Coffea arabica* L. during somatic embryogenesis and wounding. *Plant Science*, 163, 705-711.
- Sahijram, L., J.R. Soneji y K.T. Bollamma (2003). Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa* spp.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 39, 551-556.

-
- Sales, E.K. y N.G. Butardo (2014). Molecular analysis of somaclonal variation in tissue culture derived bananas using MSAP and SSR markers. *International Journal of Biological, Veterinary, Agricultural and Food Engineering*, 8, 611-619.
- Shchukin, A., D. Ben-Bassat y Y. Israeli (1997). Plant regeneration via somatic embryogenesis in Grand Nain banana and its effect on somaclonal variation. *Acta Horticulturae (ISHS)*, 447, 317-317.
- Sheidai, M., H. Aminpoor, Z. Noormohammadi y F. Farahani (2008). RAPD analysis of somaclonal variation in banana (*Musa acuminata* L.) cultivar Valery. *Acta Biologica Szegediensis*, 52, 307-3011.
- Shiddalingeswara, T., S. Saroja, M. Nalina y K.N. Chandrashekara (2014). Molecular analysis of variants identified from orchards growing with micro propagated Robusta banana (*Musa* spp. "AAA") using RAPD markers. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 7, 25-30.
- Simmonds, N.W. (1962). The evolution of the bananas. pp. 101-131. Longman Scientific and Technical, London UK.
- Simmonds, N.W. y K. Shepherd (1955). The taxonomy and origins of the cultivated bananas. *Journal of the Linnean Society of London, Botany*, 55, 302-312.
- Stover, R.H. y N.W. Simmonds (1987). Bananas. pp. 468. Wiley.
- Strosse, H., R. Domergue, B. Panis, J.V. Escalant, F. Cote, A. Vézina y C. Picq (2003). Banana and plantain embryogenic cell suspensions. (Picq, A.V.a.C., ed.), pp. 32. INIBAP.
- Strosse, H., H. Schoofs, B. Panis, E. Andre, K. Reyniers y R. Swennen (2006). Development of embryogenic cell suspensions from shoot meristematic tissue in bananas and plantains (*Musa* spp.). *Plant Science*, 170, 104-112.
- Sugiyama, M. (1999). Organogenesis *in vitro*. *Current Opinion in Plant Biology*, 2, 61-64.
- Sui, X., X. Gao, M. Ao, Q. Wang, D. Yang, M. Wang, Y. Fu y L. Wang (2011). cDNA

- cloning and characterization of UDP-glucose: anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase in *Freesia hybrida*. *Plant Cell Reports*, 30, 1209-1218.
- Venkatachalam, L., R.V. Sreedhar y N. Bhagyalakshmi (2008). The use of genetic markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and phylogenetic relationships among banana cultivars. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 47, 974-985.
- Vroh-Bi, I., C. Anagbogu, S. Nnadi y A. Tenkouano (2011). Genomic characterization of natural and somaclonal variations in bananas (*Musa* spp.). *Plant Molecular Biology Reporter*, 29, 440-448.
- Vuylsteke, D., R. Swennen, G.F. Wilson y E. De Langhe (1988). Phenotypic variation among in-vitro propagated plantain (*Musa* sp. cultivar "AAB"). *Scientia Horticulturae*, 36, 79-88.
- Wang, Q.M. y L. Wang (2012). An evolutionary view of plant tissue culture: somaclonal variation and selection. *Plant Cell Reports*, 31, 1535-1547.
- Wong, C., R. Kiew, G. Argent, O. Set, S.K. Lee y Y.Y. Gan (2002). Assessment of the validity of the sections in *Musa* (Musaceae) using AFLP. *Annals of Botany*, 90, 231-238.
- Wu, Z., L. Fang, J. Wang y Y. Shen (2009). Analysis of genetic diversity of *Vitis* by using ISSR markers. *Acta Horticulturae (ISHS)*, 827, 125-130.
- Xiong, F., J. Liu, R. Zhong, J. Jiang, Z. Han, L. He, Z. Li, X. Tang y R. Tang (2013). Intron targeted amplified polymorphism (ITAP), a new sequence related amplified polymorphism-based technique for generating molecular markers in higher plant species. *Plant Omics*, 6, 128-134.
- Youssef, M., A. James, A. Mayo-Mosqueda, J.R. Ku Cauich, R. Grijalva-Arango y R.M. Escobedo-GM (2010). Influence of genotype and age of explant source on the capacity for somatic embryogenesis of two Cavendish banana cultivars (*Musa acuminata* Colla, AAA). *African Journal of Biotechnology*, 9, 2216-2223.

- Youssef, M., J.R. Ku-Cauch, A.C. James y R.M. Escobedo-GM (2011). Genetic analysis of somatic embryogenesis derived plants in banana. *Assiut Journal of Agricultural Science*, 42, 287-300.
- Yu, F., S. Park y S.R. Rodermel (2004). The Arabidopsis FtsH metalloprotease gene family: interchangeability of subunits in chloroplast oligomeric complexes. *The Plant Journal*, 37, 864-876.
- Zaffari, G.R., L.E.P. Peres y G.B. Kerbauy (1998). Endogenous levels of cytokinins, indoleacetic acid, abscisic acid, and pigments in variegated somaclones of micropropagated banana leaves. *Journal of Plant Growth Regulation*, 17, 59-61.
- Zheng, J., Z.S. Zhang, L. Chen, Q. Wan, M.C. Hu, W. Wang, K. Zhang, D.J. Liu, X. Chen y X.Q. Wei (2008). Intron-targeted intron-exon splice junction (IT-ISJ) marker and its application in construction of upland cotton linkage map. *Agricultural Sciences in China*, 7, 1172-1180.
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski y D. Labuda (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20, 176-183.
- Zimmerman, J.L. (1993). Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *The Plant Cell*, 5, 1411-1423.

CAPÍTULO II

DESARROLLO DE LA MORFOGÉNESIS IN VITRO

2.1 INTRODUCCIÓN

En este capítulo se describen los procedimientos que se llevaron a cabo para el desarrollo de los protocolos por ESI y OD en los cultivares evaluados, así como de los experimentos llevados a cabo en algunas etapas de cada ruta morfogénica.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Material biológico

Se colectaron inflorescencias masculinas de *Musa acuminata*, AAA, cv. Enano Gigante clon Francés de la colección de germoplasma de Musáceas del Campo Experimental Rosario Izapa del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP-CERI) y de *M. acuminata* x *M. balbisiana*, AAB, cv. Manzano de la colección de germoplasma de musáceas del CICY, ubicada en el Sitio Experimental Uxmal del INIFAP (INIFAP-Uxmal).

2.2.2 Desinfección

Una vez colectadas las bellotas con flores masculinas de las inflorescencias, éstas se lavaron con agua destilada esterilizada y el exceso de agua se eliminó con la ayuda de toallas absorbentes. Las brácteas de las bellotas se eliminaron gradualmente hasta reducirla a un tamaño de entre 6 y 8 cm. Las porciones de inflorescencias reducidas se trasladaron a la campana de flujo laminar y se desinfectaron con etanol al 80% durante 20 minutos, se hicieron tres enjuagues con agua destilada esterilizada. Se redujo nuevamente a un tamaño aproximado de 3 cm de largo x 1 cm de ancho, mediante la eliminación sucesiva de brácteas con ayuda de un estereoscopio. Entonces, se aislaron las manos de flores masculinas inmaduras, los cuales se localizaron a partir de la posición 12 a la 1, considerando a la posición 0 la que ocupa el meristemo apical de la inflorescencia. Conforme se obtuvieron las manos florales, éstas se inocularon en los medios de cultivo correspondientes (Youssef *et al.* 2010).

2.2.3 Inducción de yemas florales por OD

Con la finalidad de incrementar la formación de material biológico bajo condiciones *in vitro*, la mitad de las manos florales masculinas por cada posición se sembró en medio de inducción de yemas florales (TDZ/2.5 modificado), cuatro piezas por frasco, en total se obtuvieron tres frascos para este medio de cultivo. Se vertieron 25 mL del medio en un frasco con capacidad de 100 mL (Pérez-Hernández y Rosell-García 2008). Los frascos con los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 120°C durante 20 min. Una vez inoculados los explantes, se etiquetaron y sellaron herméticamente. Los frascos se colocaron en condiciones de oscuridad a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ durante cuatro meses. Se realizaron subcultivos al mismo medio cada dos semanas, hasta su aparición. Posteriormente se realizaron subcultivos cada mes. En esta etapa se evaluó el número de yemas florales por explante.

2.2.4 Experimento para elegir la mejor concentración de TDZ para el mantenimiento y proliferación de yemas florales (OD)

Con la finalidad de determinar la concentración de TDZ adecuado para el mantenimiento de las yemas florales en proliferación, se estableció un experimento que consistió en evaluar tres concentraciones de TDZ (1, 2.5 y 5 μM) en el medio de inducción (TDZ/2.5). Se emplearon piezas de yemas florales en proliferación de los cvs. Manzano y Enano Gigante. Se tuvieron cinco réplicas por tratamiento, y cada réplica fue un frasco con cinco piezas de yemas florales en proliferación. La variable que se evaluó fue el número de yemas florales por explante a los 30 y 60 d después de la siembra en condiciones de oscuridad a $24 \pm 2^\circ\text{C}$.

2.2.5 Inducción de brotes (OD)

Con la finalidad de inducir la OD a partir del explante inicial, los tejidos con mayor grado de diferenciación se seleccionaron y se subcultivaron en el medio TDZ/2.5 (anexo). Una vez inoculados en los medios de cultivo, se transfirieron a condiciones de fotoperiodo (16h/8h, luz/oscuridad) a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ hasta la formación de brotes (aproximadamente 150 d).

2.2.6 Proliferación de brotes (OD)

Una vez obtenida la formación de brotes, éstos se transfirieron a un medio de proliferación

(P). Los cultivos sembrados y sellados herméticamente, se colocaron en oscuridad durante cuatro d y posteriormente se transfirieron a fotoperiodo (16h/8h, luz/oscuridad) a $24 \pm 2^\circ\text{C}$. En esta etapa se evaluó el número de brotes por explante. Los brotes obtenidos en la fase de proliferación, se individualizaron y transfirieron al mismo medio (P). Los brotes se inocularon en frascos de 100 mL con 25 mL del medio de cultivo (cinco brotes por frasco). Los cultivos sembrados y sellados herméticamente, se colocaron en oscuridad durante cuatro d y posteriormente a fotoperiodo (16h/8h, luz/oscuridad) a $24 \pm 2^\circ\text{C}$. Esta etapa duró cuatro meses.

2.2.7 Crecimiento y desarrollo de brotes (OD)

Los brotes obtenidos de las fases de inducción y proliferación, se transfirieron a un medio de crecimiento de brotes (Cbr). Los brotes se inocularon en frascos de 100 mL con 25 mL del medio. Los cultivos sembrados y sellados herméticamente, se colocaron en oscuridad durante cuatro d y después en fotoperiodo (16h/8h, luz/oscuridad) a $24 \pm 2^\circ\text{C}$. La duración de esta etapa fue de tres meses.

2.2.8 Enraizamiento de brotes (OD)

Los brotes obtenidos de la fase de crecimiento se transfirieron a un medio de enraizamiento de brotes (R). En esta etapa se utilizaron recipientes Magenta[®] de 375 mL con 50 mL del medio de cultivo. Los materiales sembrados se cubrieron con plástico celofán de 15 x 25 cm y se mantuvieron en condiciones de oscuridad durante cuatro d y posteriormente se transfirieron a condiciones de fotoperiodo (16h/8h, luz/oscuridad) durante treinta d a $27 \pm 2^\circ\text{C}$. Ésta etapa tuvo una duración de dos meses con subcultivos cada mes hasta obtener plántulas de aproximadamente 7 cm de altura y al menos tres hojas expandidas.

2.2.8 Inducción de callo embriogénico a partir de flores masculinas inmaduras (ESI-1)

Con la finalidad de inducir callo embriogénico directamente del explante inicial, la mitad de flores masculinas de las manos florales de cada posición se sembraron en el medio de inducción de calogénesis (MA1). Se sembraron cuatro piezas por frasco, en total se obtuvieron tres frascos para este medio de cultivo. Se adicionaron 25 mL del medio en un

frasco con capacidad de 100 mL. Una vez inoculados los explantes sobre el medio de cultivo, se etiquetaron y sellaron herméticamente todos los frascos. Los frascos se colocaron en condiciones de oscuridad a $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por un periodo de tres meses. Los cultivos se examinaron una vez por semana para observar cambios en los explantes y visualizar la formación de callos durante el cultivo. En esta fase de la ESI-1 se evaluó el porcentaje de CE.

2.2.9 Inducción de callo embriogénico a partir de yemas florales en proliferación (ESI-2)

Con la finalidad de inducir la formación de callo embriogénico a partir de las yemas florales, se aislaron del tejido en proliferación, piezas de yemas florales de 2 a 3 mm de ancho y se sembraron en medio de cultivo MA1. Cinco piezas por frasco. Una vez sembrados los explantes, se etiquetaron y sellaron herméticamente. Los frascos con los explantes sembrados se colocaron en condiciones de oscuridad a $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante aproximadamente tres meses, fecha en el cual se evaluaron los porcentajes de tipos de callo producidos. Los cultivos se examinaron visualmente dos veces por semana para observar cambios en los explantes y visualizar la formación de callos durante el cultivo.

2.2.10 Proliferación de callo embriogénico en medio semisólido (ESI-1 y ESI-2)

Para el cv. Enano Gigante, una vez inducido el callo embriogénico (CE) en cada una de las rutas anteriormente descritas, se seleccionaron sólo CE de color blanco-cremoso con expresión de pequeños embriones somáticos para su proliferación en medio M1/45 de acuerdo a lo descrito por Navarro *et al.* (1997). Los callos embriogénicos, sembrados en frascos de vidrio herméticamente sellados y con 25 mL del medio, se incubaron a $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ en completa oscuridad. El medio de cultivo se renovó cada mes y se eliminaron tejidos necróticos y callos compactos para propiciar sólo la proliferación de callo embriogénico. En el caso del cv. Manzano, la proliferación de callo embriogénico se llevó a cabo en el medio de inducción MA1.

2.2.11 Inducción de suspensiones celulares (ESI-1 y ESI2)

El establecimiento de suspensiones se inició con la inoculación de un g de CE en un matraz Erlenmeyer de 125 mL, que contenía 15 mL del medio M2. Los matraces

inoculados se transfirieron a un agitador orbital a 90 rpm a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ en oscuridad, y el medio se renovó cada semana durante tres meses. Transcurridas dos semanas del establecimiento de las suspensiones celulares, las células se filtraron en una malla de 250 μm . Para un volumen final de 50 mL en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, el filtrado se ajustó a un paquete de volumen celular (PVC) del 3% (v/v esto corresponde 1.5 mL) y se renovó 30 mL del medio de cultivo (30 mL) y se completó con medio proveniente de la suspensión celular filtrada. En cada subcultivo a los agregados celulares de mayor tamaño también se les renovó el medio para que continuara la proliferación de las suspensiones celulares. Este procedimiento se realizó cada semana, se registraron datos del PVC y éste se ajustó al 3%.el PVC Después de tres semanas, las células de las suspensiones celulares se transfirieron a un matraz de 250 mL, adicionado con 45 mL del mismo medio y se continuó con la renovación del medio cada siete días. Las condiciones de cultivo fueron en oscuridad a $24 \pm 2^\circ\text{C}$.

2.2.12 Maduración de embriones somáticos

2.2.12.1 Efecto del uso de reguladores del crecimiento

Con la finalidad de determinar el medio de cultivo adecuado para la maduración de embriones somáticos del cv. Enano Gigante en cuanto al uso de reguladores del crecimiento, se llevó a cabo un experimento en el que se tuvo como testigo a un medio denominado como Meg (anexo) a base de sales MS (Murashige y Skoog 1962). El segundo tratamiento consistió en adicionar al medio testigo Meg 1 μM AIA y 1 μM BA.

2.2.12.2 Efecto del extracto de malta, concentración de sacarosa, papel filtro y gelificante

El medio de cultivo base consistió en el Meg (ver anexo). Los tratamientos utilizados se pueden visualizar en el Cuadro 2.1. El experimento se estableció con un diseño completamente al azar, en el cual se tuvieron tres repeticiones por tratamiento. Una repetición consistió en la mitad de una caja de Petri de 100 x 15 mm, con 12.5 mL de medio de cultivo e inoculado con 250 μL de una suspensión celular previamente ajustada a una densidad del 3%. Las cajas Petri con los materiales sembrados y sellados con Kleen Pak®, se incubaron en condiciones de oscuridad a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ por un periodo de 120 d.

Los materiales fueron monitoreados diariamente y se evaluaron, al final del experimento, el número total de embriones, el número de embriones maduros (color blanco opaco) e inmaduros (translucidos) y el peso fresco y a partir de estos datos se calculó el porcentaje de embriones maduros e inmaduros.

Cuadro 2.1 Tratamientos para la maduración de embriones somáticos del cv. Enano Gigante.

Tratamientos	Gelrite (g L ⁻¹)	Sacarosa (mM)	Extracto de malta (mg L ⁻¹)	Papel filtro
1	3	87.45	100	+
2	3	87.45	100	-
3	3	87.45	-	+
4	3	87.45	-	-
5	2	87.45	100	+
6	2	87.45	100	-
7	3	131.2	100	+
8	3	131.2	100	-
9	3	131.2	-	+
10	3	131.2	-	-
11	2	131.2	100	+
12	2	131.2	100	-

+Con papel filtro; -Sin papel filtro

Para el cv. Manzano, la suspensión embriogénica de dos meses se filtró en una malla de 250 µm. En los quince d posteriores a la filtración, las suspensiones celulares se ajustaron a una densidad de 3% de PVC. Dada la experiencia del grupo que encontró un medio de cultivo en la que se obtiene la germinación de embriones somáticos por encima del 90% (Enríquez-Valencia 2013), las suspensiones se establecieron en el medio Mmanz. Se inocularon con 500 µL de la suspensión celular embriogénica con una densidad de 3% PVC a una placa de Petri de 100 x 15 mm y se esparció homogéneamente en la superficie del medio de cultivo. Las condiciones de cultivo fueron de oscuridad a 24 ± 2 °C por un lapso de 120 d.

2.2.13 Germinación de embriones somáticos

Con los embriones somáticos maduros del cv. Enano Gigante provenientes del experimento descrito en el apartado 2.2.12.1, se llevó a cabo un experimento, en el cual se evaluaron concentraciones de AIA y BA en el medio de cultivo. El medio de cultivo base consistió en el medio Geg (anexo) con variaciones del AIA y BA como se pueden visualizar en el Cuadro 2.2.

En esta fase de la regeneración *in vitro*, los embriones provenientes de la fase de maduración se seleccionaron y consideraron embriones maduros a aquellos con coloración blanco-opaca y con presencia visible de la hendidura cotiledonaria. Las condiciones de cultivo fueron en oscuridad a 24 ± 2 °C durante ocho d, y posteriormente se transfirieron a fotoperiodo (16h/8h, luz/oscuridad).

Cuadro 2.2 Tratamientos para la germinación de embriones somáticos del cv. Enano Gigante.

Tratamiento	Benciladenina (μM)	Ácido 3-indolacético (μM)
1	0	0
2	0	0.71
3	0.5	0
4	0.5	0.71
5	1	1.42
6	2	2.85

El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar. Cada tratamiento contó con diez repeticiones, una repetición consistió en un frasco de 100 mL, con 25 mL de medio de cultivo, y cada frasco inoculado con diez embriones somáticos maduros. El medio que propició la tasa de germinación más elevada de este experimento, se empleó después para la germinación de los embriones del experimento del apartado 2.2.12.2 para el cv. Enano Gigante. Para el cv. Manzano, la germinación se llevó a cabo en el medio denominado como Gmanz (anexo).

Una vez que germinaron los embriones, las plántulas se transfirieron al medio Cr (anexo). En esta etapa, se utilizaron recipientes Magenta[®] de 375 mL, con 50 mL del medio de cultivo. Los materiales sembrados se mantuvieron en condiciones de oscuridad durante cuatro d y se transfirieron a condiciones de fotoperiodo (16h/8h, luz/oscuridad) durante un mes. Se subcultivaron cada mes hasta obtener plántulas de aproximadamente 7 cm de altura y al menos tres hojas expandidas. En el último subcultivo, se cubrieron con plástico celofán de 15 x 25 cm y se mantuvieron en condiciones de oscuridad durante cuatro d y se transfirieron a condiciones de fotoperiodo (16h/8h, luz/oscuridad) a 27 ± 2 °C durante un mes previo a la aclimatación.

2.2.14 Aclimatación de plantas regeneradas por embriogénesis somática indirecta (ESI-1 y ESI-2) y organogénesis directa (OD)

Una vez que se contaron con brotes con buen desarrollo, se lavaron con agua purificada

para eliminar los restos del medio de cultivo, y para prevenir contaminación por hongos y bacterias, el área radical se sumergió en una solución bactericida-fungicida [2 g L^{-1} de oxitetraciclina y 1 mL L^{-1} de propiconazol (Tilt 250CE[®])]. Las plántulas se transfirieron a sustratos a base de suelo orgánico y turba de esfagna relación 3:1 (v/v) en bolsas de vivero (13 x 14 cm), a las que se les colocaron en la parte superior como domo, el plástico celofán proveniente del medio de enraizamiento. Estos domos se retiraron de manera gradual, y en estas condiciones permanecieron en invernadero. Luego las plantas se transfirieron a macetas más grandes con el mismo tipo de sustrato, y se regaron al menos tres veces al día para mantener una humedad relativa por encima del 90%, punto crítico para el buen desarrollo de las plantas.

2.2.15 Aspectos generales de la morfogénesis in vitro

En los Cuadros A1 al A5 del apartado de ANEXOS se pueden ver la composición de cada uno de los medios de cultivos aquí mencionados y otras condiciones relacionados con la duración, tiempos de subcultivo y fotoperiodo.

2.2.16 Análisis de datos de la morfogénesis in vitro

En los apartados en los que describieron experimentos, éstos se establecieron bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial y con base en la naturaleza de las variables se aplicaron análisis de varianza y comparación de medias con la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 0.05%. Todo ello se llevó a cabo con la ayuda del programa SAS System 2004 versión 9.0.

2.3 RESULTADOS

Para el cv. Manzano se desarrolló un protocolo por organogénesis directa (OD) y dos protocolos de regeneración mediante embriogénesis somática indirecta (ESI-1 y ESI-2), mismos que se ejemplifican en los diagramas de las Figuras 2.1, 2.2 y 2.3, respectivamente. En el sistema ESI-1, el explante que se utilizó en el medio de formación de callo fue la flor masculina joven (Figura 2.2), mientras que el sistema de ESI-2 se hizo uso de las yemas florales en proliferación obtenidas de la multiplicación de la mitad del explante del sistema ESI-1 en medio con TDZ/2.5 (Figura 2.2).

Para el caso del cv. Enano Gigante se logró desarrollar el protocolo de regeneración vía ESI utilizando yemas florales en proliferación como explante inicial correspondiente al sistema ESI-2, mismo que también se tiene en el cv. Manzano (Figura 2.3), así mismo el de regeneración vía OD (Figura 2.1).

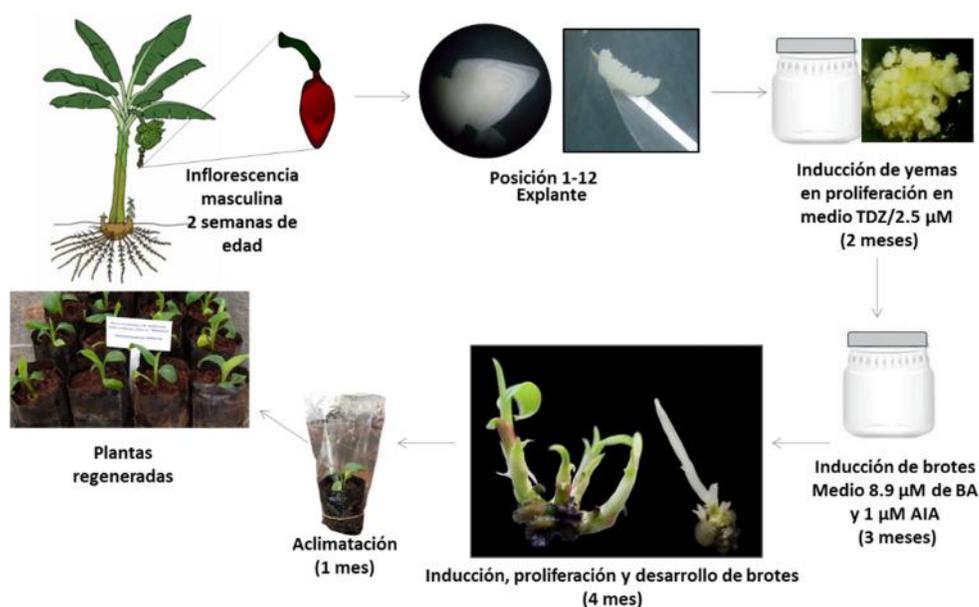


Figura 2.1 Protocolo de regeneración vía OD del cv. Manzano y Enano Gigante, a partir de yemas en proliferación.

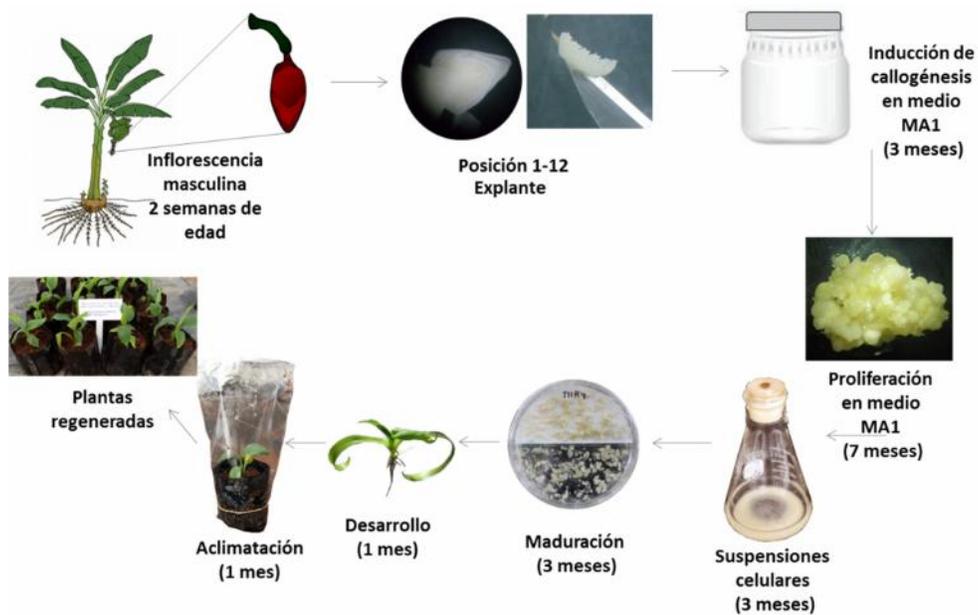


Figura 2.2 Protocolo de regeneración vía ESI-1 partiendo de flor masculina joven del cv. Manzano.

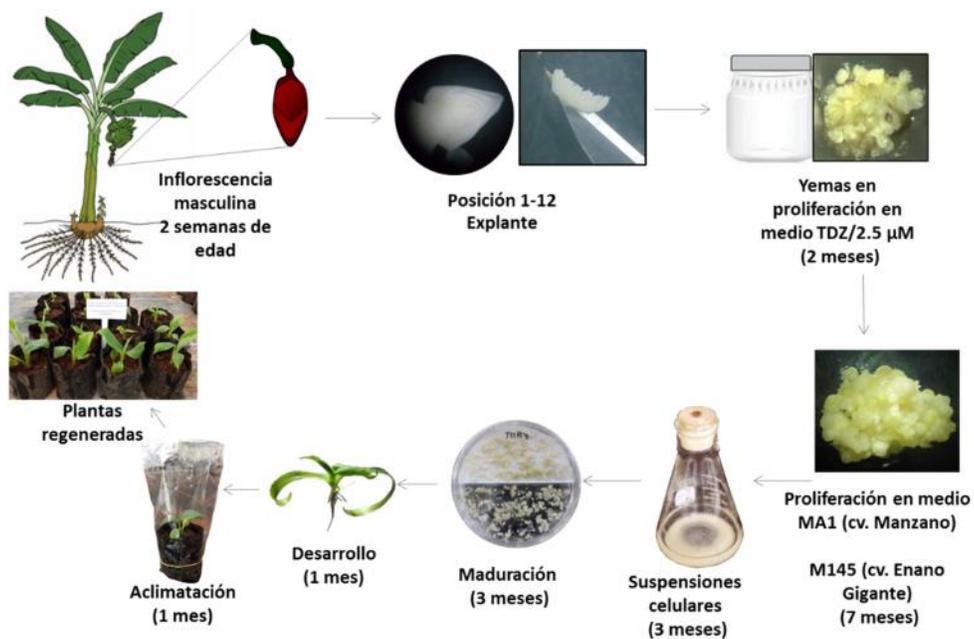


Figura 2.3 Protocolo ESI-2 para los cvs. Manzano y cv. Enano Gigante.

Algunos parámetros evaluados durante el desarrollo de los mismos se describen en los siguientes apartados.

2.3.1 Inducción de yemas florales por OD

En la Figura 2.4 se puede observar el número de yemas florales por explante, formados a partir de flores masculinas jóvenes en el medio con TDZ/2.5 μ M. El cv. Manzano tuvo menor tasa de proliferación de yemas, ya que en promedio solo aumentó de 3.9 a 5.9 yemas por explante.

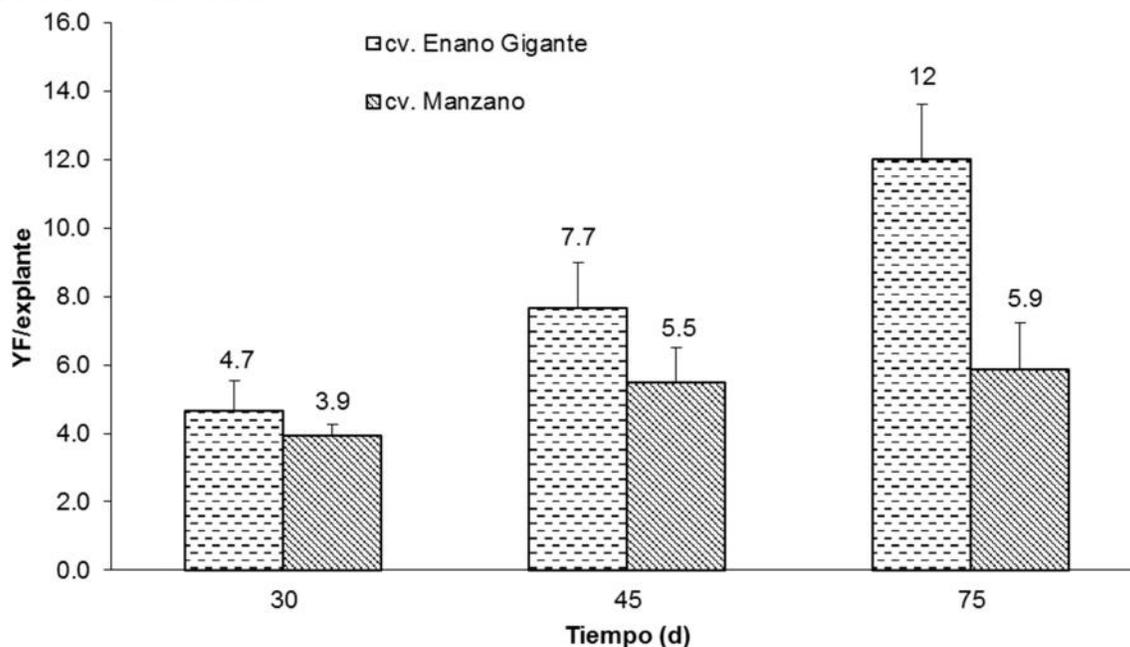


Figura 2.4 Yemas florales (YF) por explante, 30, 45 y 75 días después de inducir la proliferación de flores masculinas jóvenes en presencia de TDZ/2.5, de los cvs. Manzano y Enano Gigante. Las barras indican error estándar ($n=3$).

En el cv. Enano Gigante se observó una tendencia a incrementar el número de yemas por explante de 4.7, 7.7 hasta 12, a los 30, 45 y 75 días después de la inducción, respectivamente (Figura 2.4). En este caso, el procedimiento de limpieza del explante en cada subcultivo no pareció afectar su potencial de proliferación; además se observó un casi nivel bajo de oxidación del mismo en comparación con lo ocurrido en cv. Manzano (Figura 2.5).

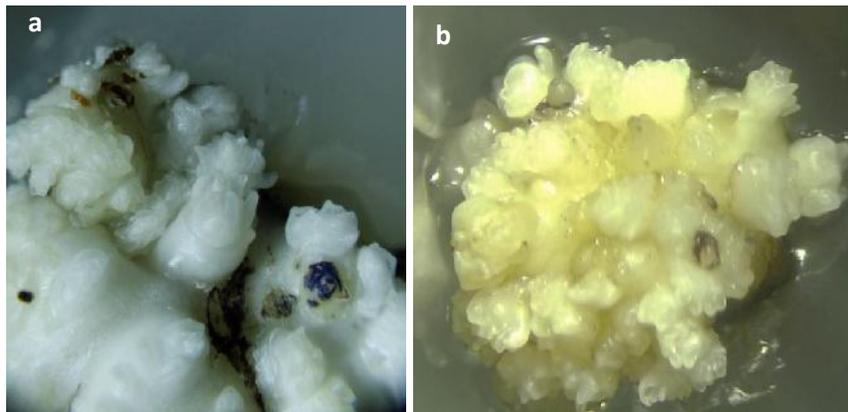


Figura 2.5 Respuesta de dos genotipos de *Musa* spp., a la proliferación de yemas florales; a) cv. Manzano; b) cv. Enano Gigante.

2.3.2 Experimento para elegir la mejor concentración de TDZ para el mantenimiento de la proliferación de yemas florales por OD

En la Figura 2.6 se presentan los resultados del efecto de diferentes concentraciones de TDZ sobre la proliferación de yemas florales del cv. Manzano a los 30 y 60 d de cultivo. A los 30 d de cultivo, el número promedio de yemas florales formados fue de 5.6, 6 y 7.2 para las concentraciones de 1, 2.5 y 5 μM TDZ en el medio de cultivo, sin diferencias significativas ($P > 0.05$). Este mismo comportamiento se observó a los 60 d de cultivo, ya que el número promedio de yemas florales varió entre 9.2, 11 y 11.2 con 1, 2.5 y 5 μM TDZ respectivamente.

La respuesta del cv. Enano Gigante no mostró diferencias significativas a los 30 d de cultivo por efecto de los tratamientos en la proliferación de yemas (Figura 2.6); en tanto que a los 60 d el mejor tratamiento fue el de 2.5 μM TDZ, seguido por 1 μM con un promedio de 10 y 7.4 yemas florales por explante. El promedio más bajo fue en el tratamiento de 5 μM TDZ con 6.2 yemas florales por explante ($P > 0.05$).

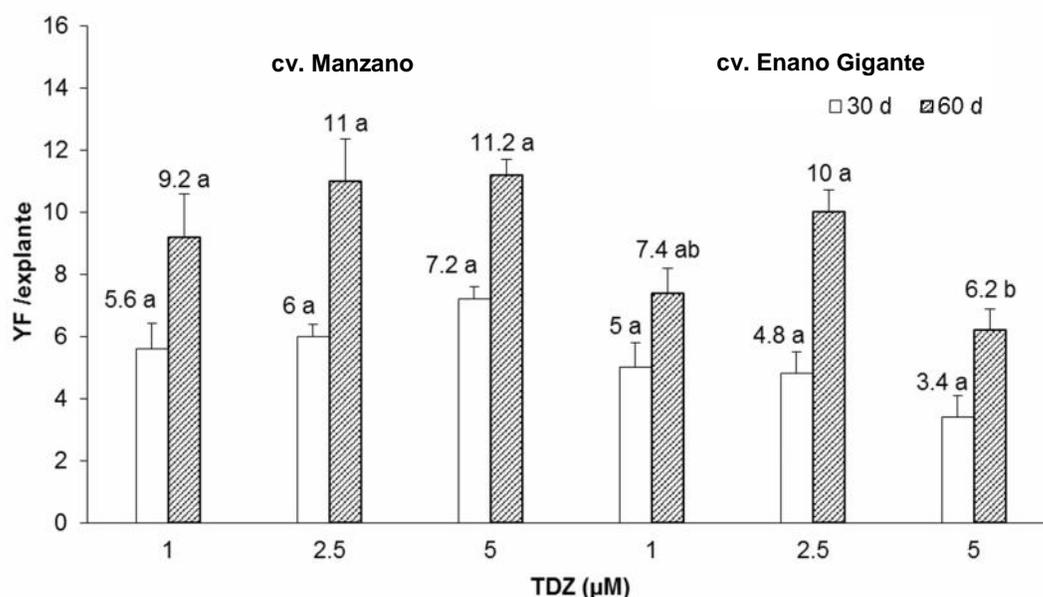


Figura 2.6 Yemas florales (YF) por explante a los 30 y 60 d después de la siembra del cv. Manzano y cv. Enano Gigante, por efecto de diferentes concentraciones de TDZ. Los promedios con letras iguales no difieren estadísticamente según Tukey ($P > 0.05$). Las barras indican error estándar ($n = 5$).

2.3.3 Inducción de brotes por OD

En cuanto a la capacidad de las yemas en proliferación de formar brotes se pudo observar que al aplicar el protocolo (Figura 2.1) existente en nuestro laboratorio, fue más efectivo para el cv. Enano Gigante, con una producción en promedio de 6.6 brotes por explante, en tanto que para el cv. Manzano fue de 4.4 brotes por explante (Cuadro 2.3). El cv. Enano Gigante presentó una respuesta más lenta. En la Figura 2.7 se pueden observar los brotes obtenidos para cada cultivar.

Cuadro 2.3 Número de brotes por explante obtenidos de yemas en proliferación de los cultivares evaluados.

Cultivar	Número de brotes/explante
<i>M. a.</i> cv. Enano Gigante ($n = 5$)	6.6 a
<i>M. a.</i> x <i>M. b.</i> cv. Manzano ($n = 5$)	4.4 b
C.V.	20.73

C.V.= Coeficiente de variación. Medias con letras iguales por columna son estadísticamente iguales según Tukey ($P > 0.05$).

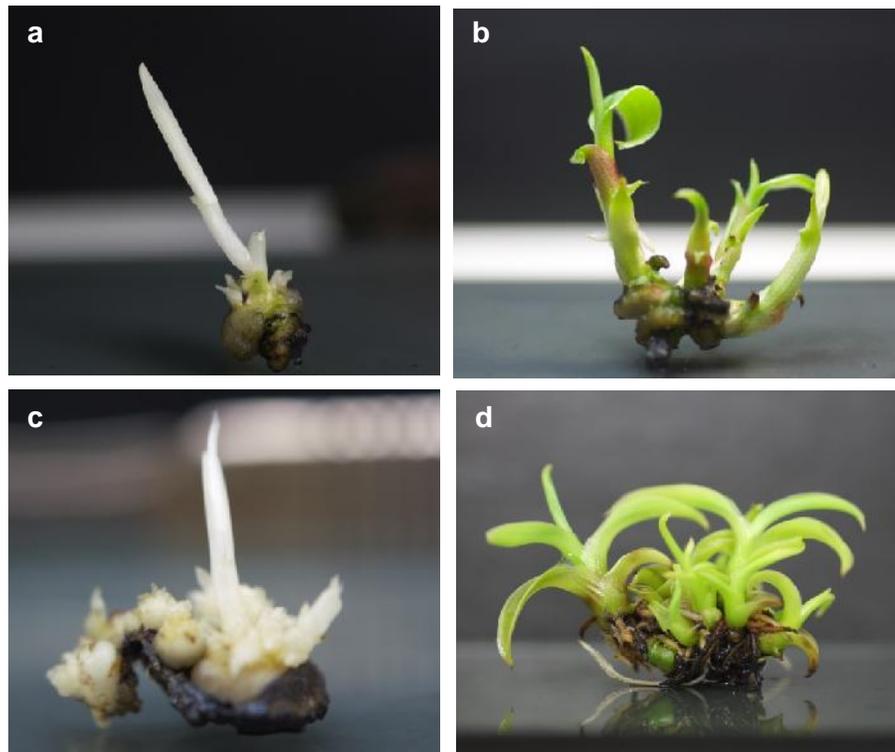


Figura 2.7 Organogénesis directa en el medio de proliferación. a) Desarrollo del brote y b) brotes múltiples del cv. Manzano; c y d) brote y brotes múltiples del cv. Enano Gigante.

2.3.4 Inducción de callo embriogénico a partir de flores masculinas inmaduras (ESI-1)

Se llevó a cabo la inducción de callo embriogénico a partir de las inflorescencias provenientes de campo. Para el cv. Enano Gigante se obtuvo callo después de cuatro meses de cultivo; sin embargo, al inducir la proliferación en el medio de M1/45, y en el séptimo mes de subcultivo, el callo se tornó compacto y no se pudieron regenerar plantas por esta vía. En el caso del cv. Manzano la formación de callo se observó a los tres meses de iniciado el cultivo y una vez que se seleccionó el callo para su proliferación, se obtuvo la suficiente masa para la inducción de suspensiones celulares a los diez meses de cultivo en el medio de MA1 (Figura 2.8).

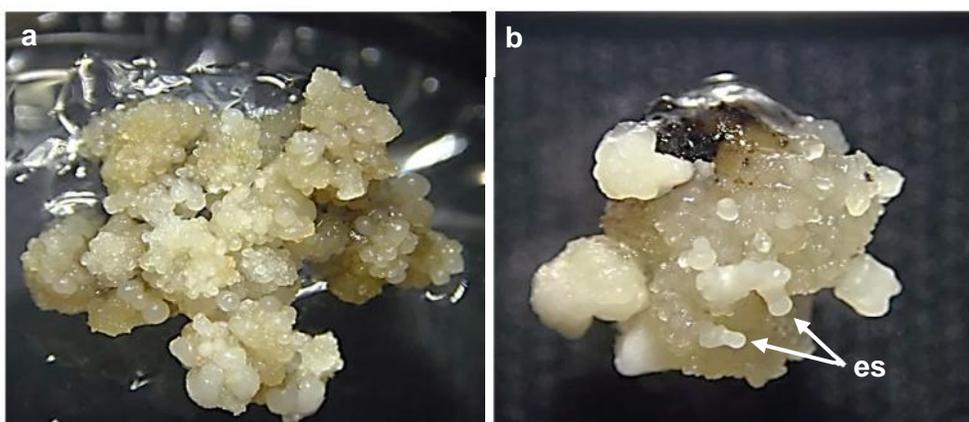


Figura 2.8 Formación de diferentes tipos de callo a partir de inflorescencias inmaduras: a) del cv. Enano Gigante callo compacto y b) del cv. Manzano, callo embriogénico con presencia de embriones somáticos (es).

2.3.5 Inducción de callo embriogénico a partir de yemas florales (ESI-2)

En la Figura 2.10, se pueden observar los tipos de callos que se formaron después de 30 d de inducción en el medio MA1 al emplear yemas en proliferación de los cvs. Manzano y Enano gigante. Para el primero, se observó un 28.2% de formación de callo embriogénico y un porcentaje similar de callo fenolizado, en tanto que la formación de callo compacto y de callo translucido fue de 12.8 y 14% respectivamente ($P = 0.05$). Para el cv. Enano Gigante, el comportamiento fue contrario, ya que se observó mayor producción de callo compacto (34.2%), callo translucido (32.6%) y menor callo embriogénico (18.4%) en tanto que la fenolización del callo fue menor (11.2%, Figura 2.9).

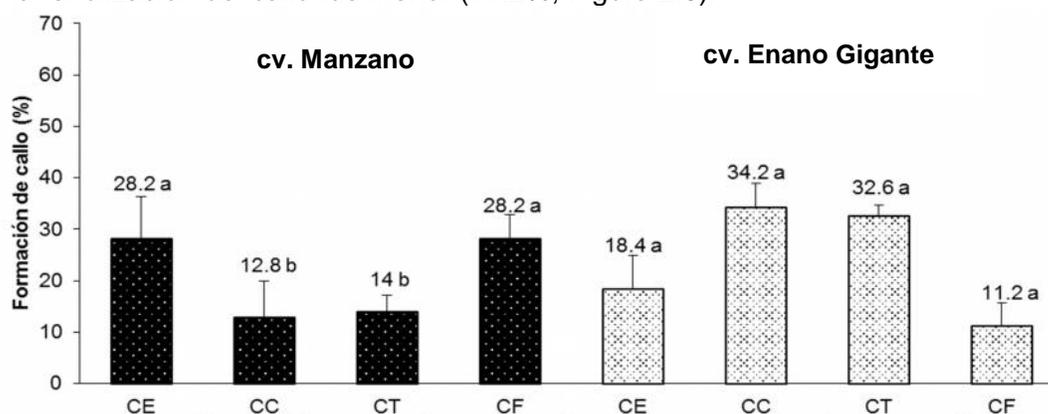


Figura 2.9 Formación de diferentes tipos de callo como respuesta de yemas florales a la inducción de embriogénesis somática indirecta. Callo embriogénico (CE), compacto (CC), translucido (CT) y fenolizado (CF), en medio MA1 a los 90 d después de la inducción. Medias con letras iguales por tipo de respuesta son estadísticamente iguales según Tukey ($P \leq 0.05$). Las barras indican error estándar ($n = 5$).

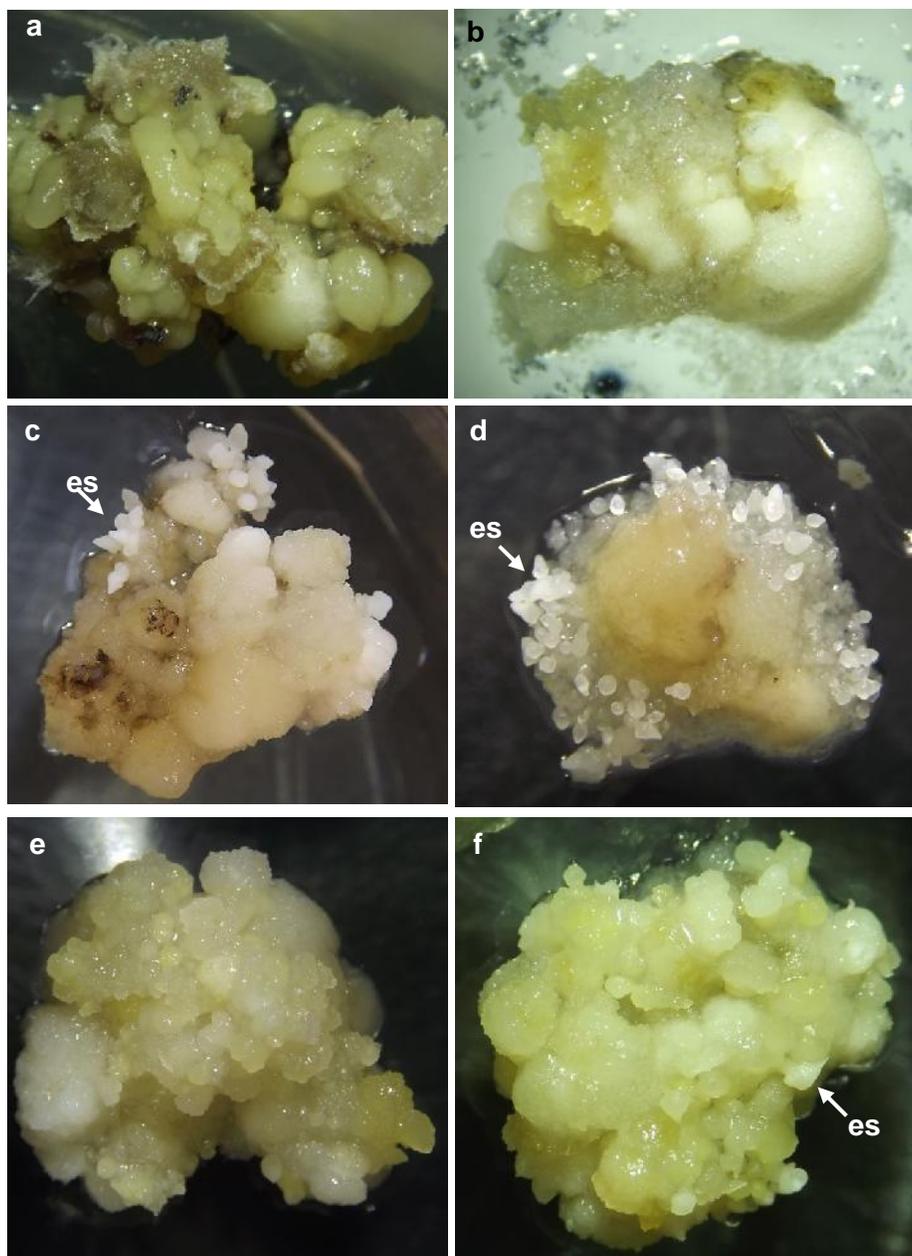


Figura 2.10 Formación de diferentes tipos de callo en medio de inducción de embriogénesis sobre explantes de yemas florales en proliferación. a) Callo amarillo del cv. Manzano; b) callo del cv. Enano gigante en la fase de inducción, c) callo embriogénico en proliferación del cv. Manzano obtenido por ESI-1, d) callo embriogénico en proliferación del cv. Manzano obtenido por ESI-2, e y f) callo embriogénico en proliferación con presencia de embriones somáticos (es) del cv. Enano Gigante obtenido por ESI-2.

2.3.6 Proliferación de callo embriogénico en medio semisólido

Al evaluar la capacidad del callo embriogénico de proliferar en medio semisólido a partir

de un inóculo de 100 mg de peso fresco (PF), se encontró que el cv. Manzano prolifera hasta 268 mg, lo cual fue mayor en comparación con el cv. Enano Gigante con 201 mg en un ciclo de cultivo de 30 d después de la siembra (Cuadro 2.4).

Cuadro 2.4 Proliferación de CE en medio semisólido y paquete de volumen celular (PVC) de células en suspensión del cv. Enano Gigante y cv. Manzano.

Consistencia del medio/Cultivar	
Medio semisólido	Peso fresco de CE (mg)
<i>M.a.</i> AAA cv. Enano Gigante ($n = 9$)	201 b
<i>M. a.</i> x <i>M. b.</i> AAB cv. Manzano ($n = 9$)	268 a
C.V.	14.26
Suspensión celular	PVC (mL)
<i>M.a.</i> AAA cv. cv. Enano Gigante ($n = 37$)	2.5 b
<i>M. a.</i> x <i>M. b.</i> AAB cv. Manzano ($n = 16$)	3.6 a
C.V.	28.02

C.V. = Coeficiente de variación. Medias con letras iguales por columna son estadísticamente iguales según Tukey ($P < 0.05$).

El mismo comportamiento fue observado en las suspensiones celulares, ya que al utilizar un inóculo inicial de 1.5 mL PVC al término de 7 d, en el cv., Manzano se incrementó el PVC hasta 3.6 mL, mayor al obtenido en el caso del cv. Enano Gigante cuya respuesta fue de 2.5 mL PVC en promedio (Cuadro 2.4). En la Figura 2.11, se pueden observar las características del CE en medio semisólido y la suspensión celular de ambos cultivares.

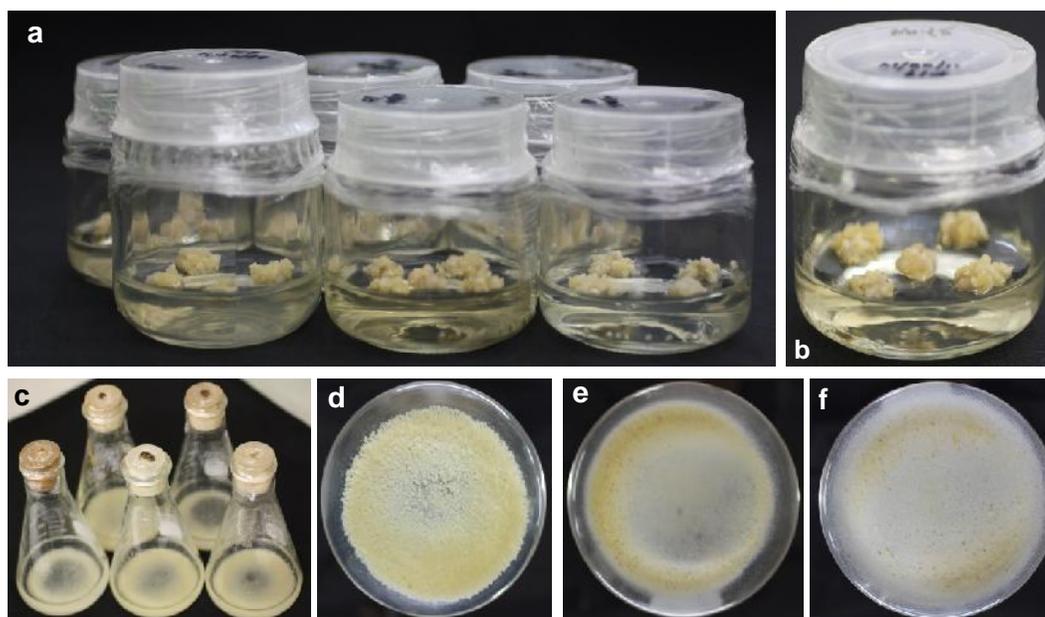


Figura 2.11 Proliferación de callo embriogénico en a y b) medio semisólido; c y d) en medio líquido del cv. Enano Gigante por ESI-2 y cv. Manzano e) por ESI-1 y f) por ESI-2.

2.3.7 Efecto del uso de reguladores del crecimiento en la maduración de embriones somáticos del cv. Enano Gigante por ESI-2

En el Cuadro 2.5 se presentan los resultados sobre el efecto de la presencia de RC durante la etapa de maduración del cv. Enano Gigante. Como se puede observar no se tuvieron efectos significativos sobre el número total de embriones, y en los porcentajes de embriones maduros e inmaduros. Sólo se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) para peso fresco, y al medio MS adicionado con 1 μM AIA y 1 μM BA para propiciar la acumulación de mayor biomasa (1560 mg) a partir de un inóculo inicial de 10 mg de CE. Este efecto se vio reflejado en el tamaño de los embriones, tal y como se observa en la Figura 2.12.

Cuadro 2.5 Efecto de la presencia de reguladores del crecimiento en el medio de cultivo en el peso fresco (PF), número total de embriones (NTE), y los porcentajes de embriones maduros (PEM) e inmaduros (PEI) durante la maduración de embriones somáticos del cv. Enano Gigante.

Tratamiento	PF (mg)	NTE	PEM (%)	PEI (%)
Meg ($n = 5$)	690 b	354 a	62 a	38 a
Meg + 1 μM de AIA + 1 μM de BA ($n = 5$)	1560 a	281 a	52 a	48 a
C.V.	22.28	26.32	28.69	38.05

C.V. = Coeficiente de variación. Medias con letras iguales por columna son estadísticamente iguales según Tukey ($P < 0.05$).

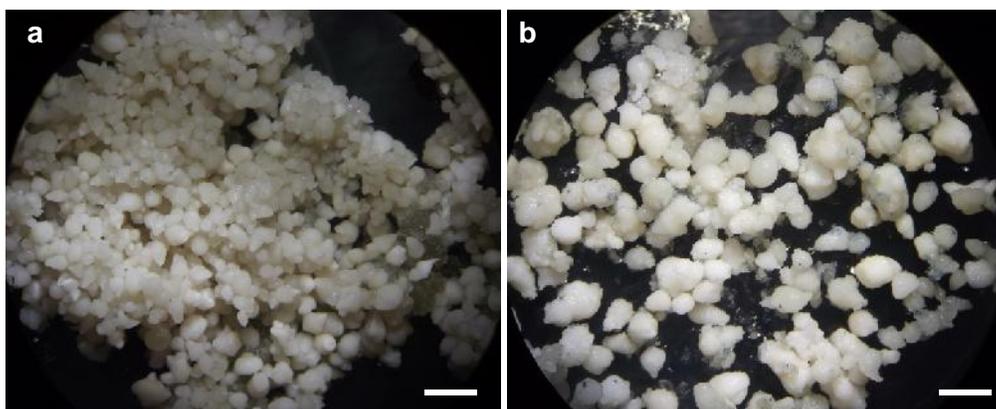


Figura 2.12 Embriones somáticos maduros a los 60 d del cv. Enano Gigante; a) del medio MS y b) del medio MS + 1 μM de AIA + 1 μM de BA. Barra = 1 mm.

2.3.8 Efecto del extracto de malta, la concentración de sacarosa, el uso papel filtro y el gelificante en la maduración de embriones somáticos del cv. Enano Gigante

En el Cuadro 2.6 se presentan los resultados al evaluar en el medio de maduración el efecto de la concentración de sacarosa, extracto de malta, uso de papel filtro y gelificante a

los 120 d. Como se puede apreciar se observaron diferencias significativas por efecto de los tratamientos evaluados, en cuanto al número total de embriones (NTE), y los porcentajes de embriones maduros (PEM) e inmaduros (PEI). El medio que favoreció la formación del mayor número de embriones fue el 3 (87 mM Sac/EM/3 g L⁻¹ GI) con un promedio de 12,102 embriones somáticos, seguido por los tratamientos 9, 1 y 10 con 7,134; 7,096 y 6,941 embriones somáticos en promedio, respectivamente. El resto de los tratamientos formaron entre 2403 y 4964 embriones somáticos. El menor número de ES lo propició el tratamiento 6. En cuanto a la obtención de embriones maduros, el tratamiento que favoreció la mayor tasa (40%) fue el 8 (131 mM Sac/EM//3 g L⁻¹ GI). Sin embargo al someter estos embriones al proceso de germinación, la tasa varió entre 0 y 46%.

Cuadro 2.6 Efecto del medio de cultivo en el peso fresco (PF), número total de embriones (NTE), porcentajes de embriones maduros (PEM), inmaduros (PEI), y porcentaje de germinación (G) por efecto de diferentes tratamientos en la maduración de embriones somáticos del cv. Enano Gigante a los 90 d después de la siembra.

Tratamiento	PF (mg)	NTE	PEM (%)	PEI (%)	G (%) [†]
1 (87.6 mM Sac/EM/PF/3 g L ⁻¹ GI)	986 a	7096 ab	10 ab	90 ab	13 abc
2 (87.6 mM Sac/EM/3 g L ⁻¹ GI)	983 a	4964 b	18 ab	82 ab	10 abc
3 (87.6 mM Sac/PF/3 g L ⁻¹ GI)	1010 a	12102 a	3 b	97 a	20 abc
4 (87.6 mM Sac/3 g L ⁻¹ GI)	760 a	4189 b	8 b	92 a	16 abc
5 (87.6 mM Sac/EM/PF/2 g L ⁻¹ GI)	930 a	2699 b	7 b	93 a	13 abc
6 (87.6 mM Sac/EM/2 g L ⁻¹ GI)	790 a	2403 b	12 ab	88 ab	0 c
7 (131 mM Sac/EM/PF/3 g L ⁻¹ GI)	1203 a	4984 b	17 ab	83 ab	33 ab
8 (131 mM Sac/EM/3 g L ⁻¹ GI)	983 a	3607 b	40 a	60 b	6 bc
9 (131 mM Sac/PF/3 g L ⁻¹ GI)	1340 a	7134 ab	22 ab	78 ab	46 a
10 (131 mM Sac/3 g L ⁻¹ GI)	1020 a	6941 ab	18 ab	82 ab	20 abc
11 (131 mM Sac/EM/PF/2 g L ⁻¹ GI)	1080 a	4606 b	18 ab	82 ab	0 c
12 (131 mM Sac/EM/2 g L ⁻¹ GI)	773 a	2897 b	29 ab	71 ab	0 c
C.V.	31.2	41.3	32.1	6.8	44.2

C.V. = Coeficiente de variación. Sac= Sacarosa; EM= 100 mg L⁻¹ de extracto de malta; PF= Papel filtro; GI= Gelrite. Promedios con letras iguales por columna son estadísticamente iguales según Tukey ($P < 0.05$).
[†]Porcentaje de germinación obtenido en el medio MS + 1.44 μM AIA y 1 μM BA a los 60 d.

El tratamiento que figura como adecuado para una buena consecución de la ESI-1 en el cv. Enano Gigante es el 9 (131 mM Sac/PF/3 g L⁻¹ GI), ya que este favoreció la germinación en un 46% contra un 6% inducido por el tratamiento 8 (131 mM Sac/EM/3 g L⁻¹ GI).

Al analizar estos resultados, se puede observar que en cuanto a la concentración de sacarosa, hubieron efectos significativos para el PEM y PEI ($P < 0.05$). La concentración de sacarosa que favoreció la maduración de embriones somáticos del cv. Enano Gigante

fue 131 mM (24%). Para el uso de extracto de malta, se encontró efecto significativo sólo en el NTE y los datos sugieren que la ausencia de este componente favorece la diferenciación de embriones con un promedio de 7,591 ES. Por otro lado, el uso de papel filtro en la superficie del medio de cultivo, tuvo efectos significativos para NTE, PEM y PEI. Los resultados sugieren que el uso de este soporte favorece la formación de embriones con un promedio de 6,437 ES; sin embargo, afecta la formación de embriones somáticos maduros con 12 y 88% de EI. Por otro lado, la variación de la concentración del gelificante no mostró efectos significativos en PF, PEM y PEI ($P > 0.05$), solamente en el NTE se observó que el uso de 3 g L⁻¹ Gelrite favoreció la formación de embriones somáticos con un promedio de 6,377 (Cuadro 2.7). En la Figura 2.13 se pueden observar las características de los embriones obtenidos en el tratamiento 3 (87.6 mM Sac/PF/3 g L⁻¹ G) que figura con el porcentaje más bajo de embriones maduros en comparación con el tratamiento 8 (131 mM Sac/EM/3 g L⁻¹ G), que favoreció la maduración en un 40%.

Los resultados sugieren eliminar el extracto de malta, el uso de papel filtro y 3 g L⁻¹ de Gelrite ya que se obtienen un rango de 20 a 25% de germinación, contra un rango de 3 a 9% con extracto de malta, sin papel filtro y 2 g L⁻¹ de Gelrite (Cuadro 2.7).



Figura 2.13 Embriones somáticos del cv. Enano Gigante a los 90 d en fase de maduración; a, c y e) embriones provenientes del T3 (87 mM Sac/PF/3 g L⁻¹ G); y b, d y f) provenientes del T8 (131 mM Sac/EM/3 g L⁻¹ G).

Cuadro 2.7 Efecto de la concentración de sacarosa, extracto de malta y Gelrite, y el uso de papel filtro en el medio de cultivo en el peso fresco (PF), el número total de embriones (NTE), el porcentaje de embriones maduros (PEM) e inmaduros (PEI) y el porcentaje de germinación (G) durante la maduración de embriones somáticos del cv. Enano Gigante.

Factores	PF (mg)	NTE	PEM (%)	PEI (%)	G (%)
Sacarosa					
87.6 mM	910 a	5575 a	9 b	91 a	12 a
131 mM	1066 a	5028 a	24 a	76 b	18 a
Extracto de malta					
100 mg L ⁻¹	966 a	4157 b	18 a	82 a	9 b
0	1032 a	7591 a	13 a	87 a	25 a
Papel filtro					
Con	1091 a	6437 a	12 b	88 a	21 a
Sin	885 a	4167 b	20 a	80 b	9 b
Gelrite					
3 g L ⁻¹	1035 a	6377 a	17 a	83 a	20 a
2 g L ⁻¹	893 a	3151 b	16 a	84 a	3 b
C.V.	31.2	41.3	32.1	6.8	55

C.V. = Coeficiente de variación. Promedios con letras iguales por columna y factor son estadísticamente iguales según Tukey ($P < 0.05$). †Porcentaje de germinación obtenido en el medio MS + 1.44 μ M AIA y 1 μ M BA a los 60 d.

2.3.9 Germinación de embriones somáticos

En la Figura 2.14 se pueden observar los resultados del experimento de germinación del cv. Enano Gigante a los 60 d después de la siembra, donde se pueden observar diferencias significativas por efecto de los tratamientos evaluados ($P < 0.05$). El porcentaje de germinación de ES de este cultivar varió de 11 a 32%. El mejor tratamiento fue el medio suplementado con 1.42 μ M AIA y 1 μ M BA con 32%, seguido aquel tratamiento en el que el medio estuvo adicionado por el doble de la concentración de ambos reguladores con un porcentaje de 27.6%. El tratamiento que propició la tasa de germinación más baja fue el testigo, en el cual no se añadieron RC. Por su parte el cv. Manzano tuvo una tasa de germinación del 80% en el medio Gmanz, sin RC.

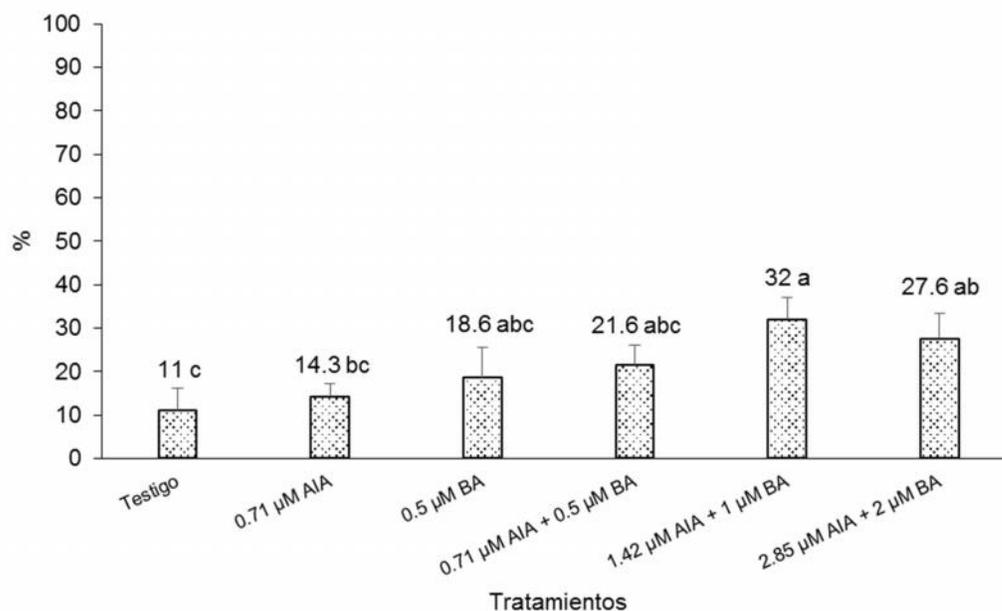


Figura 2.14 Germinación de ES maduros obtenidos por ESI-2 del cv. Enano Gigante provenientes del medio MS a los 60 d después de la siembra bajo los tratamientos evaluados. Promedios con letras iguales entre columnas son estadísticamente iguales según Tukey ($P < 0.05$). Las barras indican error estándar ($n = 11$).

2.3.10 Crecimiento, desarrollo y aclimatación de plantas regeneradas por OD, ESI-1 y ESI-2

Las plantas regeneradas por las rutas morfogénicas antes mencionadas han mostrado un buen crecimiento y desarrollo, lo cual se ha visto reflejado con un 90% de sobrevivencia (datos no mostrados). Por otro lado, las plántulas que se llevaron a la fase *ex vitro* (aclimatación) se han obtenido un buen desarrollo y adaptación. Para las plantas obtenidas por OD se obtuvo un 100% de sobrevivencia, mientras que aquellos originados por ESI-1 y ESI-2 tuvieron 96% de sobrevivencia. Los procesos llevados a cabo hasta la regeneración de plantas en condiciones de invernadero se pueden observar en la Figura 2.15.

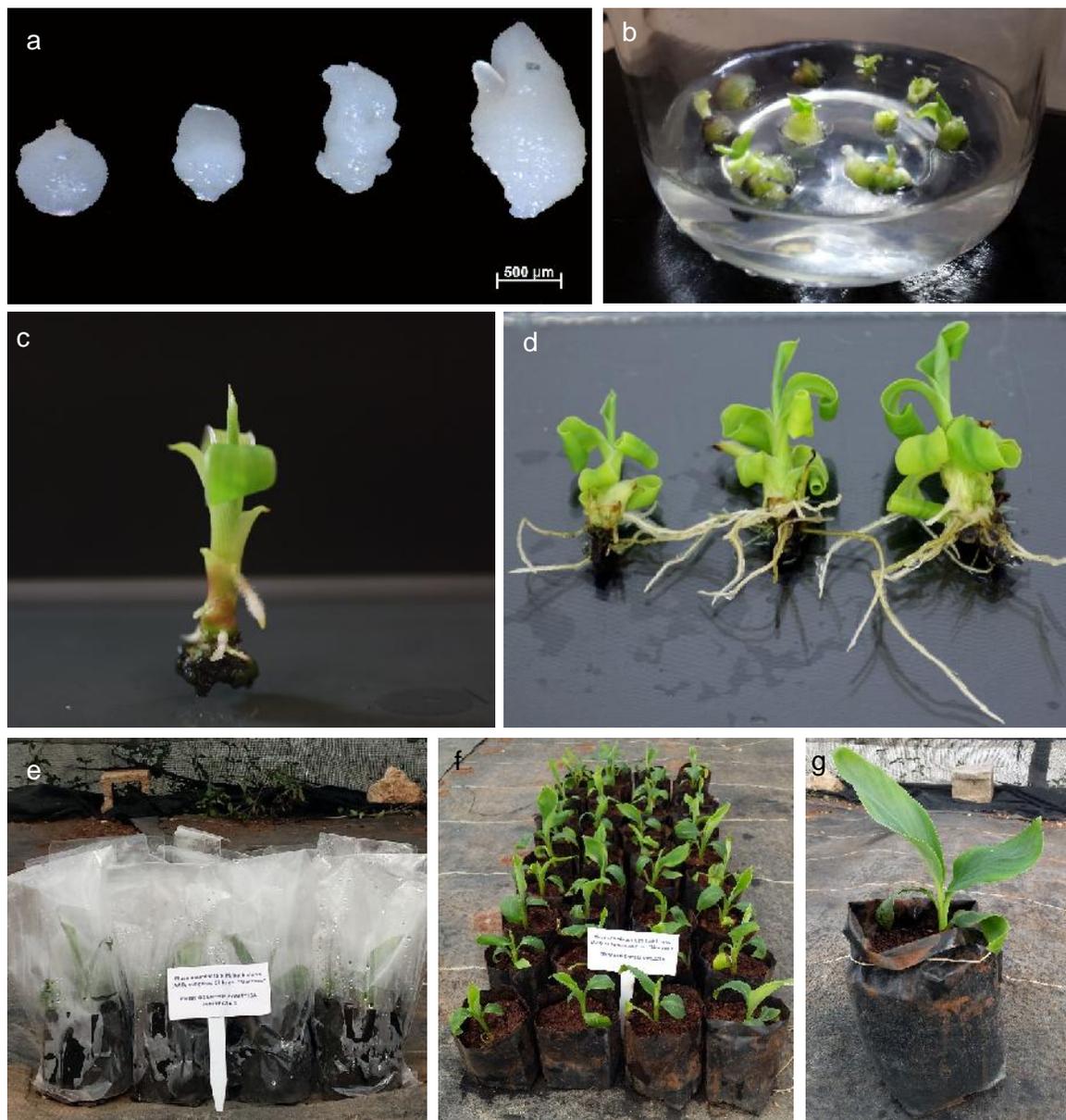


Figura 2.15 Proceso desarrollado para la regeneración *in vitro* de plantas de los cultivares evaluados: a) estadios de la ES (de izquierda a derecha globular, acorazonado, escutelar y coleoptilar) durante la maduración del cv. Enano Gigante; b) embriones germinados del cv. Enano Gigante; c) brote desarrollado del cv. Manzano; d) plántulas desarrolladas del cv. Enano Gigante proveniente de ESI-2; e) inicio de la aclimatación con domo de plástico para mantener la HR; f) plántulas aclimatadas sin domo y g) planta del cv. Manzano de tres meses de edad.

2.4 DISCUSIÓN

Este trabajo consistió en desarrollar protocolos de regeneración *in vitro* de *Musa* spp., por OD y ESI, partiendo de yemas florales masculinas de una sola planta madre de dos cvs. triploides, con diferente constitución genómica. De manera general, en la mayoría de los trabajos que describen protocolos de regeneración y propagación *in vitro* de *Musa*, tanto la OD (Aremu *et al.* 2013; Peraza-Echeverria *et al.* 2001) como la ESI (Strosse *et al.* 2003; Escalant *et al.* 1994) se han estudiado por separado.

Para la inducción de la OD, el explante más empleado ha sido el de las yemas de hijuelos de espada provenientes de campo; sin embargo, recientemente, el uso de yemas florales ha resultado ser una alternativa para el desarrollo de nuevos protocolos de regeneración vía organogénesis (Hrahsel *et al.* 2014; Darvari *et al.* 2010). Por su parte, para inducir ESI se han empleado embriones cigóticos inmaduros (Maldonado-Borges *et al.* 2013), explantes de cormo y bases foliares (Novak *et al.* 1989), meristemo apical del rizoma (escalpo) cultivados *in vitro* y flores jóvenes masculinas (Escalant *et al.* 1994) y femeninas (Grapin *et al.* 2000). Pérez-Hernández y Rosell-García (2008) fueron los primeros en usar flores masculinas jóvenes aisladas de plantas adultas, con el fin de inducir la formación y proliferación de nuevas yemas florales *in vitro*, para emplearlos en la inducción de ESI.

2.4.1 Organogénesis directa (OD)

En cuanto a la inducción de yemas florales *in vitro*, el mayor número de yemas (12 por explante) se observó a los 75 d en *M. a.* cv. Enano Gigante. Este número fue mayor al obtenido por Hrahsel *et al.* (2014), quienes reportan 4.4 yemas por explante en *M. a.* cv. Vaibalhla con 8.9 μM BA y 2.7 μM ANA. La diferencia puede atribuirse al medio de cultivo empleado, ya que en este trabajo se utilizó como RC al TDZ 2.5 μM y AIA 1 μM . En contraste en *M. a.* x *M. b.* cv. Manzano, el mayor promedio de yemas fue de 5.9 a los 75 d., el cual es similar al reportado por Darvari *et al.* (2010), quienes obtuvieron de 6 y 6.5 yemas por explante en *M. a.* x *M. b.* (AAB) cvs. Nangka y Rastali respectivamente. Esta similitud en respuesta puede atribuirse a que estos cultivares comparten el mismo constituyente genómico.

Cuando se evaluó la concentración de TDZ adecuada para el mantenimiento de las yemas florales en proliferación en ambos cultivares, se encontró que la concentración

adecuada fue 2.5 μM TDZ con 10 yemas por explante en *M. a.* cv. Enano Gigante y 5 μM TDZ para *M. a.* x *M. b.* cv. Manzano con 11.2 yemas por explante en promedio. Pérez-Hernández y Rosell-García (2008) reportaron mayor frecuencia de yemas al usar 2.5 y 5 μM TDZ, en *M. a.* Colla cv. Dwarf Cavendish; mientras que Darvari *et al.* (2010), sugieren el uso de 1.8 μM TDZ, pues obtuvieron un máximo de 7.7 yemas por explante en *M. a.* (AAA) cv. Berangan. En contraste al evaluar *M. a.* x *M. b.* (AAB) cv. Rastali y Nangka de constitución genómica idéntica al cv. Manzano, reportaron que el uso de 2.7 μM TDZ produce 6 y 6.5 yemas por explante, respectivamente.

Al emplear las yemas florales en proliferación para la inducción de brotes en ambos cultivares, se observó una mayor capacidad de respuesta en el cv. Enano Gigante con 6.6 brotes por explante, mientras que el cv., Manzano formó 4.4 brotes por explante. Las diferencias en la respuesta de los cultivares sugieren que es necesario evaluar tipos y concentraciones de RC para incrementar la proliferación de brotes con este tipo de explante, pues se utilizó el mismo medio para ambos. Cabe señalar que este mismo medio ha sido empleado de manera general para la proliferación de brotes al hacer uso de yemas laterales de meristemos de rizoma. Cuando se usó un medio a base de MS suplementado con 9.3 μM kinetina y 2.7 μM ANA en *M. a.* (AAA) cv. Vaibalha se obtuvieron 3.5 brotes por explante (Hrahsel *et al.* 2014). Mientras que Darvari *et al.* (2010), al evaluar diversos cultivares sugieren el uso de diferentes tipos y concentraciones de citocininas en el medio de proliferación, el cual estuvo en función de la composición genómica del cultivar.

Si bien se tuvo éxito en la regeneración de plantas por la vía de OD para los cultivares evaluados aún es posible optimizar el protocolo. Como se mencionó anteriormente para la inducción de brotes se llevó a cabo en un medio cuya composición de RC fueron el TDZ y AIA. Mientras que para la multiplicación se empleó un medio con BA y AIA para ambos cultivares. La correcta consecución de la organogénesis depende de la plasticidad de los tejidos vegetales y es regulada por los componentes del medio. Principalmente el balance adecuado entre auxinas y citocininas es esencial (Phillips 2004). Para optimizar el proceso desde este enfoque, un estudio dirigido a determinar la concentración endógena de estos RC en los explantes, será de gran relevancia, para que la formulación de los medios de cultivo sea específica para cada cultivar (Arinaitwe *et al.* 2000). Otra alternativa

por explorar es evaluar otras posiciones de la flor masculina dentro del ápice floral, ya que en este trabajo se utilizaron únicamente los que se encuentran entre la posición 1 a la 12 considerando como 0 a la del meristemo del ápice floral, que son las responsivas a la inducción de embriogénesis somática. Por lo que posiciones más alejadas al meristemo, podrían incrementar la respuesta organogénica de las flores masculinas inmaduras. Relacionado con lo anterior otra alternativa podría enfocarse al tipo explante utilizado. Una de las alternativas que han mostrado buenos resultados es el uso de las brácteas florales. Con éste tipo de explantes se obtuvo 15 brotes por explante para los cvs. Virupakshi y Sirumalai (AAB) de *Musa* después de 90 días de cultivo (Mahadev *et al.* 2011). En promedio dichos datos no difieren mucho de los encontrados en el presente trabajo, ya que por explante se obtuvo en promedio alrededor de 5 brotes dependiendo del genotipo.

Un aspecto que requiere atención sobre la OD en *Musa* es el papel de los RC con división celular, crecimiento y des-diferenciación. Estos tres procesos están íntimamente ligados. Por ejemplo, durante el desarrollo temprano de la epidermis, una parte de las células comienzan a diferenciarse, mientras otras continúan en división. Así mismo, cuando las vellosidades de las hojas (tricomos) se diferencian, la mayoría de las células circundantes se dividen. Esto es seguido por el desarrollo de poros (estomas) que se diferencian, vía células especializadas que involucran división y finalmente diferenciación de las células restantes como las del recubrimiento epidérmico (Nadeau 2009; Ishida *et al.* 2008). En animales la organogénesis tiene lugar en gran manera durante la embriogénesis, en plantas la iniciación de órganos y crecimiento es un proceso continuo y reiterativo que ocurre después del proceso embriogénico durante toda la vida del organismo. Esto se basa en la existencia de nichos de células madre en los meristemas (Weigel y Jürgens 2002). Las células madre mantienen su potencial proliferativo y continuamente da lugar a nuevas células que salen de división celular, dejan el meristemo y toman un patrón específico de crecimiento en respuesta a señales ambientales, de desarrollo y hormonales. Componentes claves del ciclo celular, además de controlar la transición de las fases del ciclo, también pueden actuar como blancos que coordinan la división celular, diferenciación y desarrollo. En consecuencia, alteraciones del ciclo celular en una planta en desarrollo, tiene profundas consecuencias para la morfogénesis (Gutierrez 2005). Sin embargo, poco o nada se conoce de estos procesos durante la OD *in vitro* de cultivares

de importancia económica en *Musa*. La relevancia de este tipo de estudios (histológicos, bioquímicos, genéticos, epigenéticos, proteómicos y metabolómicos) radica en que aportarían conocimiento de los factores que conducen al desarrollo de meristemas vegetativos a partir de meristemas florales, sobre todo en el género *Musa*. El poco conocimiento que se tiene sobre este proceso, es sobre cómo se da la transición del ápice floral a partir del ápice vegetativo (Barker y Steward 1962).

2.4.2 Embriogénesis somática indirecta (ESI-1 y ESI-2).

Por otro lado, se desarrolló callo embriogénico a partir de flores masculinas jóvenes con una respuesta de 34.3% en *M. a. x M. b.* cv. Manzano (ESI-1), lo cual no se observó en el cv. Enano Gigante debido a fenolización del tejido. Lo anterior puede atribuirse a que la edad de la inflorescencia fue de dos semanas y el recomendado para este cultivar es de una semana (Youssef *et al.* 2010). El resultado obtenido en el cv. Manzano es uno de los más altos reportado en la literatura hasta el momento para cultivares que tienen constitución genómica AAB, como se demuestra con los resultados de Strosse *et al.* (2006) quienes reportaron una frecuencia de callo embriogénico de 1.8%. Al utilizar las yemas florales en proliferación (ESI-2) como explantes para inducir la formación de callo embriogénico, se obtuvieron 28.2% y 18.4% para los cvs. Manzano y Enano Gigante, respectivamente. Chin *et al.* (2014) mencionan que generalmente los cultivares con genoma AAA responden lentamente y con menor frecuencia de formación de callo embriogénico, que aquellos con genoma AAB y ABB. Por su parte, Assani *et al.* (2002) mostraron que hay mayor respuesta a la ES de los cultivares con grupo genómico AA, seguido por AAB y por último a los AAA. Lo anterior sugiere un fuerte efecto del genotipo e incluso entre cultivares en *Musa*. Por lo que aún son necesarios estudios que permitan formular los medios de cultivo adecuados para la inducción de CE, basados en la concentración endógena de RC vegetal y como estos son afectados por la aplicación exógena de RC. Modificaciones de la concentración de citocinina endógena ya sea por la aplicación de lovastatina (inhibidor de la ruta del ácido mevalónico que bloquea la síntesis de pirofosfato de isopentenilo (IPP) y por consecuencia de citocininas), o por el suministro externo de citocininas, mostró que tanto la acumulación transitoria y falta del mismo son necesarios para una correcta promoción del ciclo celular. La oscilación de los niveles de citocinina endógena es acompañada por una variación en la actividad biosintética y su degradación. Si bien la interacción entre los niveles variables de citocininas con los

factores de control del ciclo celular no están muy claros, se podría demostrar una correlación entre los niveles de citocinina y la expresión de diferentes genes relacionados a ciclinas en una fase específica y la modificación artificial del patrón endógeno puede resultar en una alteración de la expresión de ciclinas (Hartig y Beck 2006).

El porcentaje de callo embriogénico obtenido mediante ESI-2 en el cv. Enano Gigante (18.4%) este fue mucho mayor al reportado en cultivares de la misma constitución genómica. Por ejemplo, Navarro *et al.* (1997) obtuvieron una respuesta que fue de 3.3 a 5.6% en el mismo cultivar al utilizar yemas florales como explante inicial, mientras que Youssef *et al.* (2010) reportaron 7.5% para el mismo cultivar y 10 % para el cv. Williams con genoma AAA con el sistema de ESI-1. Sin embargo, fue menor al obtenido por Pérez-Hernández y Rosell-García (2008) quienes reportaron 25% de callo embriogénico con el uso de yemas florales en proliferación como explante inicial.

Una vez obtenido el callo embriogénico se llevó a cabo la proliferación del mismo en medio semisólido, y que a su vez sirvió para el establecimiento de suspensiones celulares de ambos cultivares. En medio semisólido, se observó mayor peso en el cv. Manzano (268 mg), con respecto al cv. Enano Gigante. Los resultados indican que el cv. Manzano fue más reactivo en comparación con el cv. Enano Gigante. Otro factor muy importante para obtener esta respuesta fue el medio de cultivo. Para el cv. Enano Gigante se utiliza un medio MS adicionado con 4.5 μM 2,4-D y 131 mM sacarosa (M1/45) y por lo tanto un choque osmótico moderado; mientras que para el cv. Manzano, la proliferación se debe mantener en el medio de inducción MA1 cuya composición consiste en las sales de MS con 18.1 μM 2,4-D, 5.7 μM AIA, 5.4 μM ANA y 87 mM sacarosa. Como se puede observar la concentración de 2,4-D en el medio de MA1 es cuatro veces presente que en el medio M1/45, además de emplear otras auxinas como el AIA y el ANA. En general se sabe el papel que tienen estos RC vegetal como inductores de la proliferación celular. Este mismo rango de concentraciones de 2,4-D (5-18 μM) fue evaluado para inducir ESI en diferentes cultivares con diferente composición genómica (Strosse *et al.* 2006).

Al inducir suspensiones celulares a partir del callo embriogénico proliferado en medio semisólido, y comparando ambos cultivares, se observó nuevamente mayor capacidad de proliferación del cv. Manzano, ya que a partir de un inóculo inicial de 1.5 mL de PVC se obtuvieron un PVC de 3.6 mL al término de 7 d, en tanto que para el cv. Enano Gigante se

generaron un PVC de 2.5 mL. Las tasas de multiplicación fueron 2.4 y 1.6 PVC para cv. Manzano y Enano Gigante, respectivamente. Estos resultados son superiores a los de Cote *et al.* (1996) para el cv. Enano Gigante, quienes obtuvieron una tasa multiplicación del PVC de 2 a 5 al término de un mes de cultivo. Por su parte Namanya *et al.* (2014) reportaron una tasa de multiplicación de 1.5 a 2 al mes de cultivo en *M. a.* cv. Nakyatengu. No existen reportes sobre cultivares con composición genómica AAB respecto a su comportamiento en la proliferación en medio líquido.

Las diferencias obtenidas en este trabajo se pueden atribuir a los periodos de subcultivo. Si bien en la literatura se recomiendan periodos de subcultivo de 14 d después de los primeros dos meses de cultivo (Youssef *et al.* 2010; Pérez-Hernández y Rosell-García 2008; Cote *et al.* 1996), en este trabajo esto no dio buenos resultados, pues se favorecía el necrosamiento de las células, por lo que se decidió renovar el medio de cultivo cada 7 d. Este mismo problema fue observado por Namanya *et al.* (2014), quienes contrarrestaron dicho efecto con la renovación del medio de cultivo cada 10 d.

Para mejorar las condiciones de cultivo durante la proliferación del CE en medio semisólido y de suspensiones celulares, se sugiere realizar estudios relacionados con el crecimiento de los cultivos, mediante el establecimiento de las curvas de crecimiento de cada tipo de cultivo y la densidad de inóculo para propiciar el incremento de biomasa, de tal forma que se determine el tiempo de duplicación de cada cultivo y así hacer las resiembras a su debido tiempo para evitar la fenolización de los callos y suspensiones celulares por competencia de nutrientes e inadecuada aireación en los medios líquidos.

Al evaluar el uso de RC en el medio de maduración del cv. Enano Gigante, se encontró que la presencia de estos en el medio sólo incrementa el tamaño de los embriones somáticos, en tanto que el porcentaje de embriones maduros no mostró diferencias significativas, el cual alcanzó un máximo de 62% a los 60 d de cultivo. Lo anterior concuerda con lo obtenido cuando se emplearon los cvs. Manzano (AAB) y Dátil (AA) se consiguieron embriones maduros por encima del 70% sin el uso de RC (Enríquez-Valencia 2013). En contraste Cote *et al.* (1996) llevaron a cabo la maduración de embriones somáticos del mismo cv. Enano Gigante en medio MS, adicionado con 1.1 μM ANA, 0.2 μM zeatina, 0.5 μM kinetina y 0.7 μM 2-iP. Navarro *et al.* (1997) sugieren el empleo de un medio MS adicionado con 1.1 μM ANA, 0.4 μM kinetina y 0.2 μM zeatina.

Para la germinación de los embriones maduros de 60 d provenientes del medio MS (experimento descrito en el apartado 2.2.12.1) se utilizaron diferentes tratamientos en los que se variaron la concentración de BA y AIA. Los resultados indicaron que fue necesaria la presencia de al menos uno de los RC evaluados ya que el testigo propició la tasa más baja con 11%. En el tratamiento que propició la tasa de germinación más alta (32%) se usó el MS adicionado con 1.42 μM AIA y 1 μM BA. Esta tasa supera por mucho los datos reportados por Cote *et al.* (1996), (3 al 20%) al utilizar un medio MS 0.2 μM BA y 1.1 μM AIA y por Pérez-Hernández y Rosell-García (2008) 12.5% en el medio anterior. En contraste Navarro *et al.* (1997), reportaron un rango de 13 a 25% al utilizar un medio basado en sales de MS con 11.4 μM AIA y 2.2 μM BA con este mismo cultivar. Los datos sugieren que utilizar una concentración muy alta de AIA con respecto a la de BA, afecta la germinación de los embriones somáticos de este cultivar. Sin embargo, Youssef *et al.* (2010) reportaron una tasa de germinación del 35% al utilizar un medio MS adicionado con 1.1 μM AIA y 0.2 μM BA, similar al de este trabajo.

Un aspecto que no se consideró en el experimento con RC en la fase de maduración fue regular el estado osmótico del medio de maduración, por lo que se decidió evaluar el efecto de las concentraciones de sacarosa, extracto de malta, gelificante y el uso de papel filtro en el medio de maduración para el cv. Enano Gigante. De manera específica el tratamiento que presentó el porcentaje más alto de embriones maduros fue el 8 (131 mM Sac/EM/3 g L⁻¹ G) con 40% a los 120 d. Al respecto, Khalil y Elbanna (2004) al evaluar diferentes medios para la maduración de embriones somáticos de *M. a. x M. b.* (AAB) cv. Dwarf Brazilian encontraron que el medio MS suplementado con 1 mg L⁻¹ biotina, 100 mg L⁻¹ extracto de malta, 100 mg L⁻¹ glutamina, 5.4 μM ANA, 2.3 μM kinetina, 0.9 μM zeatina, 131 mM sacarosa y 2.6 g L⁻¹ fitagel favoreció la frecuencia de embriones en estadio globular, torpedo y maduros (19.8 a 33%). Al evaluar los mismos factores en el cv. Manzano, el tratamiento que indujo el mayor porcentaje de embriones maduros (64%) fue aquel compuesto por 87 mM sacarosa y 3 g L⁻¹ Gelrite (Enríquez-Valencia 2013). Sin embargo, el tratamiento 8 propició 6%. Tal y como ya había sido observado en el cv. Manzano, el mejor tratamiento de maduración, no siempre favorece la mayor tasa de germinación (Enríquez-Valencia 2013). Por lo que es necesario realizar estudios bioquímicos y fisiológicos (no sólo morfológicos) para definir el mejor estado de maduración, en función de la mejor tasa de germinación y conversión a planta. Businge *et*

al. (2013) al germinar embriones somáticos del abeto rojo, provenientes del mejor tratamiento de maduración, obtuvieron una tasa del 30%; mientras que con un tratamiento que no favoreció la frecuencia de embriones maduros, la tasa de germinación fue entre el 70 y 80%. En este trabajo el tratamiento que favoreció la germinación del cv. Enano Gigante fue el 9 (131 mM Sac/PF/3 g L⁻¹ GI) con 46%, mayor al obtenido en el experimento con reguladores del crecimiento, lo cual representa un gran avance (14%) al obtenido en este mismo trabajo y 11 % mayor al reportado por Youssef *et al.* (2010) con 35%. Sin embargo, sigue siendo menor al que se obtiene en el cv. Manzano. Enríquez-Valencia (2013) reportó una tasa de germinación del 85%, similar al obtenido en este trabajo para este cultivar (80%).

Al analizar los factores que influenciaron esta respuesta en cuanto a la maduración se encontró que una concentración una alta de sacarosa (131 mM) favorece la maduración de embriones somáticos, lo cual concuerda con lo obtenido por Khalil y Elbanna (2004) quienes al evaluar diferentes medios, encontraron que el uso de 87 mM de sacarosa no favorece la obtención de embriones maduros (0%). Estos efectos pueden explicarse con base en el papel que tiene la sacarosa en el medio de cultivo. La sacarosa es uno de los componentes más importantes en el medio de cultivo, el cual es hidrolizado en glucosa y fructosa, lo que aumenta la presión osmótica del medio; sin embargo, este cambio en el estado osmótico no parece favorecer directamente el proceso de maduración de los embriones (Jain y Gupta 2005). Es necesario mantener un gradiente de sacarosa entre el medio y el tejido, ya que en ausencia de sacarosa como fuente de energía, el proceso de maduración de embriones somáticos en abeto blanco se vio afectado por un aumento en la actividad de la sacarosa sintasa, enzima involucrada en el mantenimiento de dicho gradiente (Iraqi y Tremblay 2001).

Otro factor que afectó la formación de embriones somáticos maduros fue el uso de papel filtro como soporte en el medio de cultivo. En este trabajo, se determinó que para el cv. Enano Gigante el uso de papel filtro implica que la obtención de embriones somáticos maduros fuera 12%. En general, los protocolos descritos para la propagación por ES de diversos cultivares sugieren su uso durante la maduración como un medio físico para regular la disponibilidad de agua para el tejido (Maldonado-Borges *et al.* 2013; Navarro *et al.* 1997; Cote *et al.* 1996), esto puede estar asociado a que el inicio del proceso de

desarrollo de embriones somáticos implica la adquisición de tolerancia a la desecación para favorecer la acumulación de nutrientes que servirán para la germinación (Coelho y Benedito 2008). Es por esto que en concordancia con Enríquez-Valencia (2013), se sugiere omitir el uso del soporte de papel filtro (mayor concentración de gelificante) en el medio de maduración.

Por lo que respecto a la variación de la concentración del agente gelificante, no se observó efecto significativo en la obtención de embriones maduros. Al parecer la diferencia de concentración de 1 g L^{-1} de gelrite, no tuvo influencia en los resultados. Sin embargo, este factor si tuvo efecto sobre entre el número total de embriones y los datos mostraron que el uso de 3 g L^{-1} incrementó al doble el número de embriones respecto a 2 g L^{-1} . Cuando se evaluaron cinco tipos de agentes gelificantes se observó un aumento en el número de embriones somáticos de *Pinus strobus* L. a medida que se aumentó la concentración del gelificante (Klimaszewska *et al.* 2000). Este comportamiento se determinó con los cinco agentes gelificantes. Otros autores sugieren que el agente gelificante afecta la maduración de embriones somáticos al restringir la disponibilidad de agua (Teyssier *et al.* 2011; Klimaszewska *et al.* 2000).

Al comparar la respuesta de los dos cultivares evaluados en el presente trabajo, se observó que para el caso del cv. Manzano ya se cuenta con un protocolo de regeneración vía ES que permite una buena tasa de maduración (60%) con una buena tasa de germinación [80% en este trabajo y 85% reportado por Enríquez-Valencia (2013)]. Lo cual no se ha logrado aún para el cv. Enano Gigante. Es notable remarcar que cuando se obtuvo 62% de maduración la germinación fue de 32%, y cuando se obtuvo 22% de maduración, la tasa de germinación fue de 46%. Para poder elucidar los factores que están afectando al cv. Enano Gigante, un estudio en el que se utilice el mismo medio de cultivo y que evalúe parámetros fisiológicos y bioquímicos, por ejemplo, el estudio de los niveles hormonales (ABA como indicador de estrés o posibles inhibidores de la ES) podrán aportar resultados que nos conduzcan a establecer las mejores condiciones de cultivo para para lograr una correcta diferenciación de ES del cv. Enano Gigante basado en una condición favorable de estrés (Grafi y Barak 2015; Nic-Can *et al.* 2015; Quiróz-Figueroa *et al.* 2006). Otro factor que pareció afectar la correcta maduración de ES en el cv. Enano Gigante fue la densidad de inóculo ($500 \mu\text{L}$ de suspensión celular en 25 mL de

medio). Por lo que una correcta distribución de los nutrientes y del agua disponible en el medio es necesaria para la maduración de embriones somáticos. Un estudio basado en mutantes de genes involucrados en el control de ciclo celular que involucró la expresión de un gen dominante negativo de una versión de CDK-a *cdc2aDN*, el cual inhibe la división celular, se observaron una variedad de fenotipos de embriones. En el más severo de los casos, con estudios histológicos, la organización básica del tejido no pudo ser reconocido, mientras en otros, ciertos tejidos se observaron distorsiones en el patrón basal-apical, aunque el patrón de división radial fue normal. Por tanto, estos resultados muestran que las tasas de perturbación de división celular durante la embriogénesis, alteran la morfogénesis apical y basal (Meijer y Murray 2001; Hemerly *et al.* 1999).

BIBLIOGRAFÍA

- Aremu, A.O., M.W. Bairu, L. Szucová, K. Dolezal, J.F. Finnie y J. Van Staden (2013). Genetic fidelity in tissue-cultured Williams bananas - The effect of high concentration of topolins and benzyladenine. *Scientia Horticulturae*, 161, 324-327.
- Arinaitwe, G., P.R. Rubaihayo y M.J.S. Magambo (2000). Proliferation rate effects of cytokinins on banana (*Musa spp.*) cultivars. *Scientia Horticulturae*, 86, 13-21.
- Assani, A., R. Haicour, G. Wenzel, B. Foroughi-Wehr, F. Bakry, F.X. Côte, G. Ducreux, A. Ambroise y A. Grapin (2002). Influence of donor material and genotype on protoplast regeneration in banana and plantain cultivars (*Musa spp.*). *Plant Science*, 162, 355-362.
- Barker, W.G. y F.C. Steward (1962). Growth and development of the banana plant: II. The Transition from the vegetative to the floral shoot in *Musa acuminata* cv. Gros Michel. *Annals of Botany*, 26, 413-423.
- Businge, E., J. Bygdell, G. Wingsle, T. Moritz y U. Egertsdotter (2013). The effect of carbohydrates and osmoticum on storage reserve accumulation and germination of Norway spruce somatic embryos. *Physiologia Plantarum*, 149, 273-285.
- Coelho, C.M.M. y V.A. Benedito (2008). Seed development and reserve compound accumulation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Seed Science and Biotechnology*, 2, 42-52.
- Cote, F.X., R. Domergue, S. Monmarson, J. Schwendiman, C. Teisson y J.V. Escalant (1996). Embryogenic cell suspensions from the male flower of *Musa AAA* cv. Grand Nain. *Physiologia Plantarum*, 97, 285-290.
- Chin, W.Y.W., M.S.M. Annuar, B.C. Tan y N. Khalid (2014). Evaluation of a laboratory scale conventional shake flask and a bioreactor on cell growth and regeneration of banana cell suspension cultures. *Scientia Horticulturae*, 172, 39-46.
- Darvari, F.M., M. Sariah, M.P. Puad y M. Maziah (2010). Micropropagation of some Malaysian banana and plantain (*Musa sp.*) cultivars using male flowers. *African*

Journal of Biotechnology, 9, 2360-2366.

Enríquez-Valencia, A.J. (2013). Transcritos involucrados en la maduración del embrión somático de *Musa*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México. 103 p.

Escalant, J.V., C. Teisson y F. Cote (1994). Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). *In Vitro Cellular and Development Biology-Plant*, 30, 181-186.

Grafi, G. y S. Barak (2015). Stress induces cell dedifferentiation in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1849, 378-384.

Grabin, A., J.L. Ortiz, T. Lescot, N. Ferrere y F.X. Cote (2000). Recovery and regeneration of embryogenic cultures from female flowers of False Horn Plantain. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 61, 237-244.

Gutierrez, C. (2005). Coupling cell proliferation and development in plants. *Nature Cell Biology*, 7, 535-541.

Hartig, K. y E. Beck (2006). Crosstalk between auxin, cytokinins, and sugars in the plant cell cycle. *Plant Biology*, 8, 389-396.

Hemerly, A.S., P.C.G. Ferreira, M. Van-Montagu y D. Inzé (1999). Cell cycle control and plant morphogenesis: is there an essential link? *BioEssays*, 21, 29-37.

Hrahsel, L., A. Basu, L. Sahoo y R. Thangjam (2014). *In vitro* propagation and assessment of the genetic fidelity of *Musa acuminata* (AAA) cv. Vaibalhla derived from immature male flowers. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172, 1530-1539.

Iraqi, D. y F.M. Tremblay (2001). Analysis of carbohydrate metabolism enzymes and cellular contents of sugars and proteins during spruce somatic embryogenesis suggests a regulatory role of exogenous sucrose in embryo development. *Journal of Experimental Botany*, 52, 2301-2311.

Ishida, T., T. Kurata, K. Okada y T. Wada (2008). A genetic regulatory network in the

- development of trichomes and root hairs. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 365-386.
- Jain, S.M. y P.K. Gupta (2005). Protocol for somatic embryogenesis in woody plants. Springer 590 p.
- Khalil, S.M. y A.A.M. Elbanna (2004). Highly efficient somatic embryogenesis and plant regeneration via suspension cultures of banana (*Musa* spp.). *Arab Journal of Biotechnology*, 7, 99-110.
- Klimaszewska, K., D.R. Cyr y B.C.S. Sutton (2000). Influence of gelling agents on culture medium gel strength, water availability, tissue water potential, and maturation response in embryogenic cultures of *Pinus strobus* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 36, 279-286.
- Mahadev, S.R., A. Kathithachalam y M. Marimuthu (2011). An efficient protocol for large-scale plantlet production from male floral meristems of *Musa* spp. cultivars Virupakshi and Sirumalai. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 47, 611-617.
- Maldonado-Borges, J.I., J.R. Ku-Cauich y R.M. Escobedo-GM (2013). Annotation of differentially expressed genes in the somatic embryogenesis of *Musa* and their location in the banana genome. *The Scientific World Journal*, 2013, 1-7.
- Meijer, M. y J.A.H. Murray (2001). Cell cycle controls and the development of plant form. *Current Opinion in Plant Biology*, 4, 44-49.
- Murashige, T. y F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- Nadeau, J.A. (2009). Stomatal development: new signals and fate determinants. *Current Opinion in Plant Biology*, 12, 29-35.
- Namanya, P., G. Mutumba, S.M. Magambo y W. Tushemereirwe (2014). Developing a cell suspension system for *Musa*-AAA-EA cv. 'Nakyetengu': a critical step for genetic improvement of Matooke East African Highland bananas. *In Vitro Cellular &*

Developmental Biology - Plant, 50, 442-450.

Navarro, C., R.M. Escobedo y A. Mayo (1997). *In vitro* plant regeneration from embryogenic cultures of a diploid and a triploid, Cavendish banana. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 51, 17-25.

Nic-Can, G.I., R.M. Galaz-Ávalos, C. De-la-Peña, A. Alcazar-Magaña, K. Wrobel y V.M. Loyola-Vargas (2015). Somatic embryogenesis: identified factors that lead to embryogenic repression. A Case of species of the same genus. *PLoS ONE*, 10, e0126414.

Novak, F.J., R. Afza, M. Van Duren, M. Perea-Dallos, B.V. Confer y T. Xiolang (1989). Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB) bananas (*Musa* spp.). *Bio/Technology*, 7, 154-159.

Peraza-Echeverria, S., V.A. Herrera-Valencia y A.J. Kay (2001). Detection of DNA methylation changes in micropropagated banana plants using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP). *Plant Science*, 161, 359-367.

Pérez-Hernández, J.B. y P. Rosell-García (2008). Inflorescence proliferation for somatic embryogenesis induction and suspension-derived plant regeneration from banana (*Musa* AAA, cv. Dwarf Cavendish) male flowers. *Plant Cell Reports*, 27, 965-971.

Phillips, G.C. (2004). *In vitro* morphogenesis in plants-recent advances. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 40, 342-345.

Quiróz-Figueroa, F.R., R. Rojas-Herrera, R.M. Galaz-Avalos y V. Loyola-Vargas (2006). Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86, 285-301.

Strosse, H., R. Domergue, B. Panis, J.V. Escalant, F. Cote, A. Vézina y C. Picq (2003). Banana and plantain embryogenic cell suspensions. (Picq, A.V.a.C., ed.), pp. 32. INIBAP.

Strosse, H., H. Schoofs, B. Panis, E. Andre, K. Reyniers y R. Swennen (2006).

Development of embryogenic cell suspensions from shoot meristematic tissue in bananas and plantains (*Musa* spp.). *Plant Science*, 170, 104-112.

Teyssier, C., C. Grondin, L. Bonhomme, A.M. Lomenech, M. Vallance, D. Morabito, P. Label y M.A. Lelu-Walter (2011). Increased gelling agent concentration promotes somatic embryo maturation in hybrid larch (*Larix x eurolepsis*): a 2-DE proteomic analysis. *Physiologia Plantarum*, 141, 152-165.

Weigel, D. y G. Jürgens (2002). Stem cells that make stems. *Nature*, 415, 751-754.

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

CAPÍTULO III

EXTRACCIÓN DE ADN Y ANÁLISIS CON MARCADORES MOLECULARES PARA DETERMINAR VARIACIÓN NATURAL Y VS

3.1 INTRODUCCIÓN

En este apartado se describen la extracción de ADN del material biológico, así como las condiciones para el análisis molecular mediante el uso de cebadores ISSR, SRAP e ITAP con el objetivo de determinar el nivel de variación natural entre la planta madre, hijuelo espada y de agua. Posteriormente con los cebadores que detectaron polimorfismo, se utilizaron para determinar el nivel de variación somaclonal de los regenerantes *in vitro* de las rutas morfogénicas desarrolladas con el cv. Manzano y finalmente contrastarlos.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Material biológico

Se utilizaron hojas cigarro de plantas madre, hijuelo de espada, hijuelo de agua de los cvs. Manzano y Enano Gigante y de plantas regeneradas de las rutas descritas en el capítulo anterior del cv. Manzano. Los tejidos fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 6% (v/v) y posteriormente etanol al 70% durante un minuto en cada solución. Se enjuagaron con agua destilada y se eliminó el exceso de agua con toallas de papel. Posteriormente, se pesaron muestras de 100 mg de hojas, y de inmediato se congelaron con nitrógeno líquido. Se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

3.2.2 Extracción de ADN

El ADN genómico total de todas las muestras se extrajo de acuerdo a lo descrito por Dellaporta *et al.* (1983) con algunas modificaciones (ver anexo A1). La concentración de ADN se determinó por espectrofotometría (Stulnig y Amberger 1994).

3.2.3 Selección de cebadores ISSR, SRAP e ITAP

Se evaluaron quince cebadores ISSR, cinco combinaciones SRAP y veinticinco combinaciones ITAP y aquellos que mostraron efectividad para detectar polimorfismo entre la planta madre, hijuelo de espada e hijuelo de agua de ambos cultivares, se

determinó el nivel de variación natural y se desarrolló el análisis molecular para determinar el nivel de variación entre plantas regeneradas a partir de los sistemas OD, ESI-1 y ESI-2 del cv. Manzano, finalmente ambos niveles de variación se contrastaron.

3.2.4 Condiciones de PCR para la selección de cebadores ISSR

La mezcla de reacción de amplificación de ISSR en un volumen final de 20 µl contiene 1 ng µL⁻¹ del templado de ADN genómico (0.8 µL del stock 25 ng µL⁻¹), 1X amortiguador de PCR (2 µl del stock 10X), 0.25 mM dNTP's (2.5 µL del stock 2 mM dNTP's), 1.5 mM MgCl₂ (0.6 µL del stock 50 mM), 0.8 pmol de cebador ISSR (1.6 µL del stock 10 µM; Cuadro 3.1), 0.06 U µL⁻¹ Taq DNA-polimerasa (0.25 µL del stock 5 U µL⁻¹) y 12.25 µL de agua libre de nucleasas.

Cuadro 3.1 Características de cebadores ISSR para evaluar fidelidad genética en banano *Musa* spp.

Código	Secuencia	Tm° de alineamiento [†]
Mat-17	5'-GACACGACAC-3'	39.1
Mat-32	5'-GACACGACAC-3'	54.9
Mat-15	5'-GACAGACAGACARG-3'	47
Mat-21	5'-GAGAGAGAGAGAGARG-3'	48.2
Mat-16	5'-YRGACAGACAGACA-3'	43
UBC-813	5'-CTCTCTCTCTCTCTT-3'	39.1
UBC-817	5'-CACACACACACACAA-3'	47.2
UBC-845	5'-CTCTCTCTCTCTCTRG-3'	52.8
UBC-848	5'-CACACACACACACARG-3'	52
UBC-847	5'-CACACACACACACARC-3'	52
UBC-855	5'-ACACACACACACACYT-3'	52.8
UBC-842	5'-GAGAGAGAGAGAGAYG-3'	58.2
UBC-841	5'-GAGAGAGAGAGAGAYC-3'	50.4
UBC-811	5'-GAGAGAGAGAGAGAC-3'	47
UBC-840	5'-GAGAGAGAGAGAYT-3'	47

UBC= University of British Columbia (Lu *et al.* 2011; Venkatachalam *et al.* 2008). [†]Temperaturas de alineamiento producto de experimentos de PCR en gradiente por cebador.

La reacción de amplificación se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C durante 5 min (1 ciclo), expansión con 35 ciclos de 30 s, desnaturalización a 94°C, alineamiento a temperatura variable de acuerdo al cebador por 30 s y extensión a 72°C durante 2 min, seguido de una extensión final por 5 min a 72°C, en un termociclador de gradiente (Eppendorf).

3.2.5 Condiciones de PCR para la selección de cebadores SRAP e ITAP

La mezcla de reacción de amplificación de SRAP e ITAP en un volumen final de 20 µl

contiene 1.25 ng μL^{-1} del templado de ADN genómico (1 μL del stock 25 ng μL^{-1}), 1X amortiguador de PCR (2 μL del stock 10X), 0.25 mM dNTP's (2.5 μL del stock 2 mM dNTP's), 2 mM MgCl_2 (0.8 μL del stock 50 mM), 0.8 pmol de cebador sentido y antisentido (Me y Em para SRAP; Em y Itrpr para ITAP) (1.6 μL del stock 10 μM ; Cuadro 3.2 y 3.3), 0.06 U μL^{-1} Taq DNA-polimerasa (0.25 μL del stock 5 U μL^{-1}), y 12.25 μL de agua libre de nucleasas.

Cuadro 3.2 Combinación de cebadores SRAP para evaluar fidelidad genética en banano *Musa* spp.

Combinación	Me	Secuencia	Em	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'

Me: cebador sentido; Em: cebador antisentido.

La reacción de amplificación se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C durante 2 min (1 ciclo), pre-amplificación con 5 ciclos de 94°C por 30 s, 35°C durante 30 s y 72°C durante 1 min; seguido de 35 ciclos a 94°C durante 30 s, alineamiento a 50°C durante 30 s y extensión a 72°C durante 1 min, seguido de una extensión final durante 5 min a 72°C, en un termociclador de gradiente (Eppendorf).

3.2.6 Electroforesis del ADN producto de la amplificación

Una vez realizada la amplificación, se mezclaron 3 μL de colorante de carga [2X DNA 10 mM Tris-HCl pH 7.6, 0.03% (p/v) azul de bromofenol, 0.03% (p/v) xilen cianol FF, 60% de glicerol (v/v), 60 mM EDTA] con 2 μL del producto de amplificación de PCR.

Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.8%. Como referencia, se cargó un carril del gel con el marcador de 100 a 3000 pb (Thermo Scientific GenRuler 100 bp Plus DNA Ladder, ready-to-use). El gel fue corrido con amortiguador TBE 1X a 7V cm^{-1} durante 2.5 h. Los geles se analizaron bajo luz UV y se fotografiaron con un equipo DNR Bio-Imaging Systems (MiniBIS Pro).

Cuadro 3.3 Combinación de cebadores ITAP para evaluar fidelidad genética en banano *Musa* spp.

Combinación	Em	Secuencia	ltpr	Secuencia
C1			ltpr1	5'- GACTGCGT <u>ACCTGCAAAT</u> -3'
C2			ltpr2	5'- GACTGCGT <u>ACCTGCATGC</u> -3'
C3	Em-3	5'- GACTGCGTACGA <u>AATTGAC</u> -3'	ltpr3	5'- GACTGCGT <u>ACCTGCAGAC</u> -3'
C4			ltpr4	5'- GACTGCGT <u>ACCTGCAATG</u> -3'
C5			ltpr5	5'- GACTGCGT <u>ACCTGCAGCT</u> -3'
C6			ltpr1	5'- GACTGCGT <u>ACCTGCAAAT</u> -3'
C7			ltpr2	5'- GACTGCGT <u>ACCTGCATGC</u> -3'
C8	Em-6	5'- GACTGCGTACGA <u>AATTGCA</u> -3'	ltpr3	5'- GACTGCGT <u>ACCTGCAGAC</u> -3'
C9			ltpr4	5'- GACTGCGT <u>ACCTGCAATG</u> -3'
C10			ltpr5	5'- GACTGCGT <u>ACCTGCAGCT</u> -3'
C11			ltpr1	5'- GACTGCGT <u>ACCTGCAAAT</u> -3'
C12			ltpr2	5'- GACTGCGT <u>ACCTGCATGC</u> -3'
C13	Em-7	5'- GACTGCGTACGA <u>AATTATG</u> -3'	ltpr3	5'- GACTGCGT <u>ACCTGCAGAC</u> -3'
C14			ltpr4	5'- GACTGCGT <u>ACCTGCAATG</u> -3'
C15			ltpr5	5'- GACTGCGT <u>ACCTGCAGCT</u> -3'
C16			ltpr1	5'- GACTGCGT <u>ACCTGCAAAT</u> -3'
C17			ltpr2	5'- GACTGCGT <u>ACCTGCATGC</u> -3'
C18	Em-8	5'- GACTGCGTACGA <u>AATTAGC</u> -3'	ltpr3	5'- GACTGCGT <u>ACCTGCAGAC</u> -3'
C19			ltpr4	5'- GACTGCGT <u>ACCTGCAATG</u> -3'
C20			ltpr5	5'- GACTGCGT <u>ACCTGCAGCT</u> -3'
C21			ltpr1	5'- GACTGCGT <u>ACCTGCAAAT</u> -3'
C22			ltpr2	5'- GACTGCGT <u>ACCTGCATGC</u> -3'
C23	Em-10	5'- GACTGCGTACGA <u>AATTIAG</u> -3'	ltpr3	5'- GACTGCGT <u>ACCTGCAGAC</u> -3'
C24			ltpr4	5'- GACTGCGT <u>ACCTGCAATG</u> -3'
C25			ltpr5	5'- GACTGCGT <u>ACCTGCAGCT</u> -3'

Me: cebador sentido; ltpr: cebador antisentido.

3.2.7 Análisis de datos

Las bandas ISSR, SRAP e ITAP de igual tamaño y movilidad generadas por el mismo cebador para varias muestras fueron tratadas como idénticas para ese locus. De tal manera que para analizar el polimorfismo generado por alguno de los marcadores ISSR, SRAP e ITAP, se registró la ausencia (0) / presencia (1) de bandas para cada locus, y se construyó una matriz binaria con la información generada con todos los cebadores. Esta matriz se sometió al programa NTSYS-PC (versión 2.21q), 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 especies comunes con similitud A, B representa el número de especies comunes con similitud B y C representa el número de especies con similitudes comunes entre A y B. Los valores de similitud de Jaccard obtenidos se utilizaron para generar un dendograma mediante el procedimiento UPGMA (Unweighted Pair-Group with Arithmetic Mean).

Con las matrices binarias, se calcularon el contenido de información polimórfica (PIC), que

es determinado por la siguiente fórmula $PIC = 2f_i(1-f_i)$, donde f_i es la frecuencia con la que están presentes los fragmentos del marcador. Por otro lado, se calculó el poder de resolución (RP), con la fórmula $RP = \sum I_i$, donde $I_i = 1 - [2|0.5 - p|]$ y p es la proporción de accesiones que contienen una banda i (Roldán-Ruiz *et al.* 2000; Prevost y Wilkinson 1999). El PIC, indica la efectividad de un cebador para detectar polimorfismo basado en que éste es aportado por más de un individuo. El RP se basa en la efectividad de un cebador para detectar polimorfismo, sin importar el número de individuos que aportan el nivel de polimorfismo detectado.

3.2.8 Análisis molecular con marcadores moleculares ISSR, SRAP e ITAP de regenerantes *in vitro*

Con los cebadores que mostraron efectividad para detectar polimorfismo en la planta madre, hijuelo de espada, de agua y basado en los valores de PIC y RP se utilizaron para llevar a cabo el análisis molecular de los regenerantes provenientes de embriogénesis somática indirecta (ESI-1 y ESI-2) y organogénesis directa (OD) del cv. Manzano.

Se llevó a cabo la extracción de ADN de 25 plantas por cada ruta morfogénica. Con la finalidad de reducir el número de muestras a evaluar, se hicieron grupos, conformados por cinco plantas regeneradas, por lo que se tuvieron cinco grupos por cada ruta morfogénica, además de un carril testigo negativo de la mezcla de reacción de amplificación sin ADN (Figura 3.1). El ADN genómico de cada grupo, se amplificó por PCR con los cebadores ISSR, SRAP e ITAP. Las condiciones de PCR y análisis de datos se llevaron a cabo como se describen en los apartados del 3.2.4 al apartado 3.2.7.

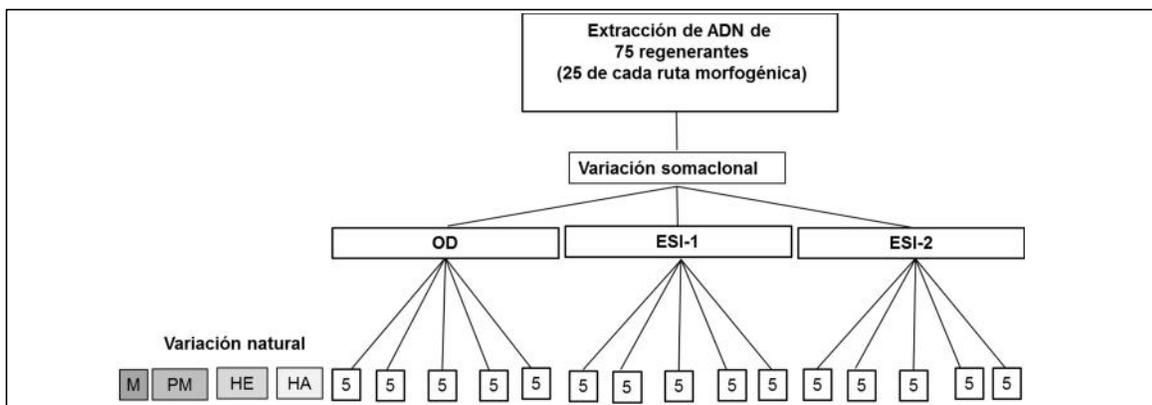


Figura 3.1 Estrategia general seguida para el análisis de la variación natural y somaclonal de plantas regeneradas *in vitro*.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Extracción de ADN de la planta madre (M) e hijuelo de espada (HE) y de agua (HA)

En el Cuadro A5 (anexo) se presentan los resultados de extracción de ADN de planta madre, hijuelo de espada y de agua de los cultivares evaluados. Para el cv. Manzano la concentración de ADN varió desde 79.8 a 154.9 ng μL^{-1} , y los valores de la proporción A260/A280 fueron de 1.73 a 1.81, lo cual indica que estaban libres de contaminación por proteínas, mientras que los valores de la proporción A260/A230 estuvieron entre 1.72 y 1.91, valores que implican ADN libre de contaminación por polifenoles. En el cv. Enano Gigante la concentración fue de 63.1 a 132.9 ng μL^{-1} , los valores de la proporción A260/A280 de 1.63 a 1.7, así como los de la proporción A260/A230 de 1.76 a 2.04. Lo anterior indicó que estos cultivares el protocolo de Dellaporta *et al.* (1983) resultó eficiente con las modificaciones para *Musa* spp.

3.3.2 Análisis molecular con marcadores ISSR, SRAP e ITAP de la planta madre (M), hijuelo de espada (HE) y de agua (HA)

En los Cuadros 3.4, 3.5, 3.6 y 3.7 se puede observar los resultados en cuanto a número total de bandas (NTB), número de bandas polimórficas (NBP), tamaño de bandas (pb), porcentaje de polimorfismo (P), contenido de información polimórfica (PIC) y poder de resolución (RP) de los cebadores ISSR, combinaciones de SRAP e ITAP al comparar la planta madre, los hijuelos de espada y de agua de los cultivares evaluados.

Con los cinco cebadores seleccionados de ISSR (por su alto PIC y RP), para el cv. Manzano se amplificaron de 8 a 12 bandas con un total de 52. Estas bandas se ubicaron en un rango de 200 a 3000 pb. El NBP fue desde 1 a 7, con un total de 17. El cebador que generó el P más bajo fue el Mat-32 con 8.3% y el cebador que generó mayor P fue el Mat-15 con 77.7%. El P total detectado por ISSR fue de 32.6%. Por otro lado, los valores de PIC variaron entre 0.04 y 0.35; mientras que los valores de RP fueron de 0.6 a 4.6 (Cuadro 3.4 y 3.5). El dendograma, elaborado del análisis de agrupamientos (UPGMA) a partir de las distancias genéticas calculadas con del coeficiente de similitud genética de Jaccard, mostró una similitud de 0.88 entre la planta madre y el HE y separó al HA. La similitud de este último con la planta madre y el HE fue de 0.67 y 0.78, respectivamente

(Figura 3.2a y Cuadro A7).

En cuanto al uso de tres combinaciones de cebadores SRAP altamente informativos en los individuos del cv. Manzano se amplificaron de 9 a 16 bandas, con un total de 38 bandas. El rango de BP fue de 2 a 6 con un total de 12. Estas bandas tuvieron un tamaño desde 90 a 2000 pb. La combinación SRAP que generó menor P fue el Me3/Em6 con 22.2% y el Me1/Em7 generó el mayor P con 46.1% y el total con las tres combinaciones fue de 31.6%. Los valores de PIC de las combinaciones SRAP fueron de 0.09 a 0.22; mientras que los de RP fueron de 1.3 a 4 (Cuadro 3.4 y 3.5). El análisis de agrupamiento UPGMA de las muestras aquí analizadas mediante SRAP generó el dendograma de la Figura 3.2b, donde se observa una similitud de 0.84 entre la planta madre y el HE; mientras que el HA mostró una similitud de 0.74 y 0.75 con la planta madre y el HE respectivamente (Cuadro A7).

Con el uso de siete combinaciones de cebadores ITAP en el cv. Manzano se amplificaron un rango de 9 a 20 bandas, con un total de 108. El rango de bandas polimórficas fueron desde 2 a 5 con un total de 21. El tamaño de estas bandas fue desde 100 a 2000 pb. El P varió de 11.1 a 38.4%, generados por la combinación Em7/Itpr5 y Em8/Itpr1 respectivamente, y el total fue de 19.4%. Mientras que los valores de PIC y RP varió de 0.04 a 0.17 y 1.3 a 3.3 respectivamente (Cuadro 3.4 y 3.5). Como se aprecia en el dendograma de la Figura 3.1e, resultado del análisis de agrupamiento (UPGMA) de las muestras analizadas mediante ITAP, la similitud entre la planta madre y el HE de 0.88. Y la similitud del HA entre la planta madre y el HE fue de 0.86 (Figura 3.2c y Cuadro A7).

Del análisis conjunto de los tres marcadores, ISSR, SRAP e ITAP, se obtuvo 198 bandas, de las cuales 50 BP. El P entre la planta madre, HE y HA del cv. Manzano fue de 25.5%, detectado por el conjunto de los tres marcadores (Cuadro 3.5). La similitud entre la planta madre y el HE del cv. Manzano fue de 0.87. La similitud entre el HA con la planta madre y el HE fue de 0.79 a 0.82, respectivamente. Lo anterior al combinar los coeficientes de Jaccard de los tres marcadores (Figura 3.2d y Cuadro A7).

CAPÍTULO III

Cuadro 3.4 Número total de bandas (NTB), número de bandas polimórficas (NBP) porcentaje de polimorfismo (P) de cebadores ISSR, combinaciones SRAP e ITAP entre entre la planta madre, HE y HA del cv. Manzano.

	NTB	NBP	Rango (pb)	P (%)
		ISSR		
UBC-817	11	1	300-1700	9.1
UBC-848	8	2	300-900	25
Mat-32	12	1	200-3000	8.3
UBC-841	12	6	200-1800	50
Mat-15	9	7	300-1000	77.7
		SRAP		
Me1/Em7	13	6	100-2000	46.1
Me3/Em6	9	2	140-1800	22.2
Me4/Em7	16	4	110-2000	25
		ITAP		
Em3/ltpr2	18	3	140-1500	16.6
Em3/ltpr5	20	4	130-2000	20
Em6/ltpr3	14	2	130-1440	14.2
Em7/ltpr4	16	3	140-1700	18.7
Em7/ltpr5	18	2	110-1900	11.1
Em8/ltpr1	13	5	110-2000	38.4
Em10/ltpr5	9	2	100-1500	22.2

Cuadro 3.5 Resumen de resultados obtenidos con cebadores ISSR, SRAP e ITAP empleados para el análisis molecular entre la planta madre, HE y HA del cv. Manzano.

	ISSR	SRAP	ITAP	Total
Número de cebadores evaluados	15	5	25	45
Número de cebadores usados	5	3	7	15
Total de bandas amplificadas	52	38	108	198
Total de bandas polimórficas	17	12	21	50
Promedio de bandas por cebador	10.4	12.6	15.4	13.2
Rango (pb)	200-3000	90-2000	100-2000	90-3000
Rango de PIC	0.04-0.35	0.09-0.22	0.04-0.17	0.04-0.35
Rango de RP	0.6-4.6	1.3-4	1.3-3.3	0.6-4.6
Polimorfismo (%)	32.6	31.6	19.4	25.2

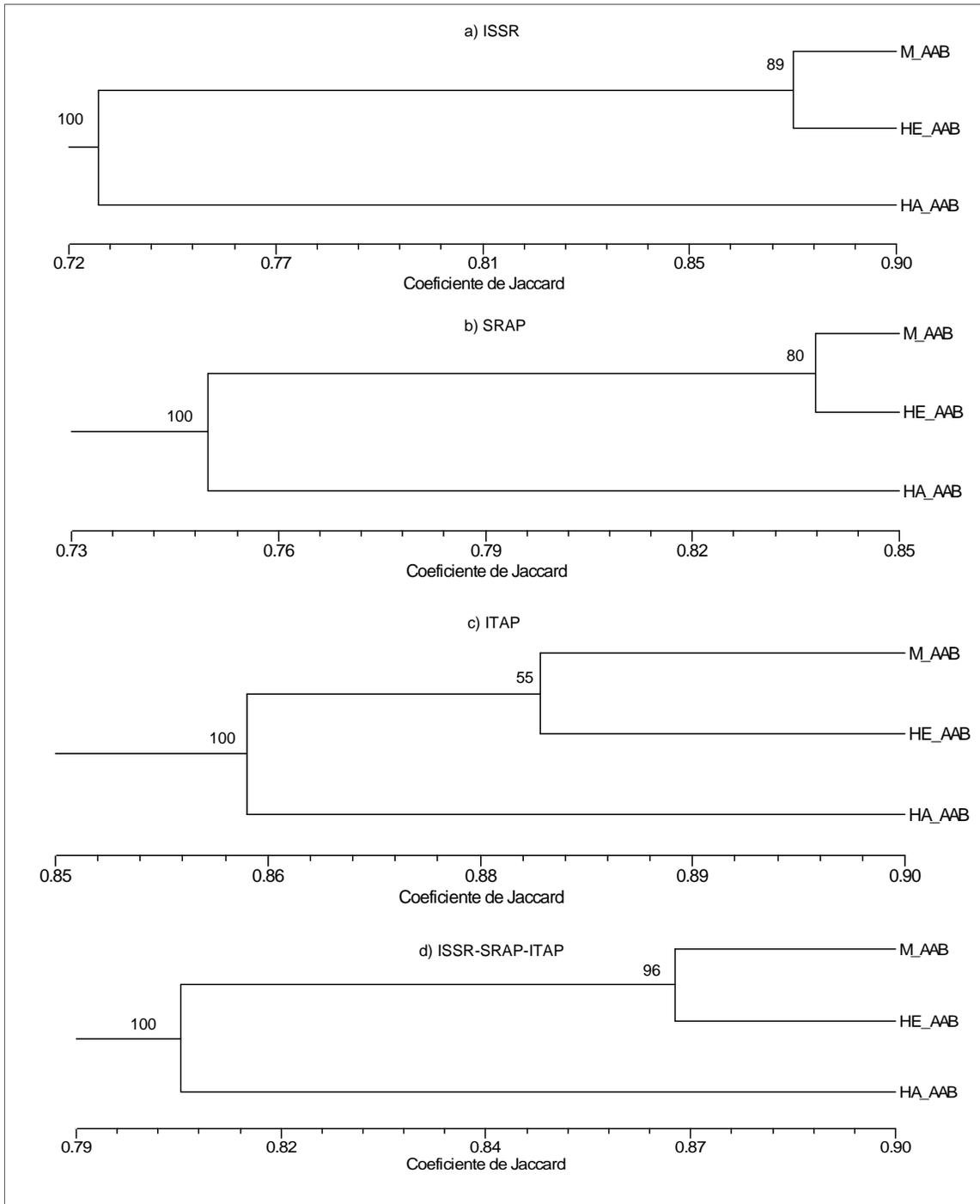


Figura 3.2 Dendrogramas de similitud genética producto del análisis de conglomerados con el procedimiento UPGMA, basado en el coeficiente de Jaccard entre la planta madre (M), hijuelo de espada (HE), hijuelo de agua (HA) con marcadores: a) ISSR; b) SRAP; c) ITAP y d) ISSR-SRAP-ITAP para el cv. Manzano. Los números en cada agrupamiento indican la significancia al realizar un Bootstrap de 1000 repeticiones.

En la Figura 3.3 se muestra el P aportado por la interacción entre la planta madre, el HE y HA, así como entre estos últimos, el polimorfismo total observado con cada cebador del cv. Manzano. Para el cebador ISSR se observó un P de 12.2% entre la planta madre y el hijuelo de espada. Y el polimorfismo entre la planta madre y el hijuelo de agua fue de 32.6%. En tanto que el polimorfismo entre ambos hijuelos (HE y HA), fue de 22% con los cebadores ISSR. Para el uso de tres combinaciones SRAP, el polimorfismo fue de 16.2, 25.7 y 24.3% entre la planta madre y HE, planta madre y HA y entre los HE y HA, respectivamente. Mientras que con el uso de cebadores ITAP, la variación observada fue aportado por las interacciones entre la planta madre con el HE, la planta madre con el HA y entre los hijuelos con valores de 12.1, 13.5 y 14.5% de P respectivamente.

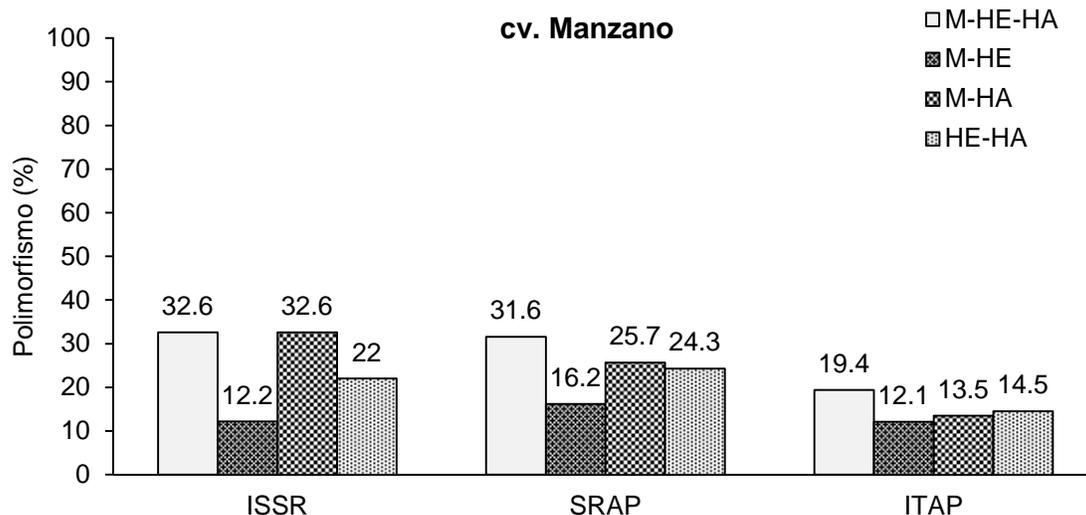


Figura 3.3 Polimorfismo entre la planta madre (M), HE y HA del cv. Manzano revelado con marcadores ISSR, SRAP e ITAP.

La Figura 3.4 presenta los resultados en cuanto al NTB por cada tipo de marcador. Para la planta madre del cv. Manzano se amplificaron 45, 32 y 98 bandas al utilizar los cebadores ISSR, ITAP y SRAP respectivamente. En el hijuelo de espada se observó mayor número de bandas con 47, 36 y 103 con los mismos cebadores. Mientras que en el hijuelo de agua se observó una disminución respecto al observado en la planta madre con la amplificación de 42, 29 y 94 bandas con los cebadores ISSR, SRAP e ITAP, respectivamente.

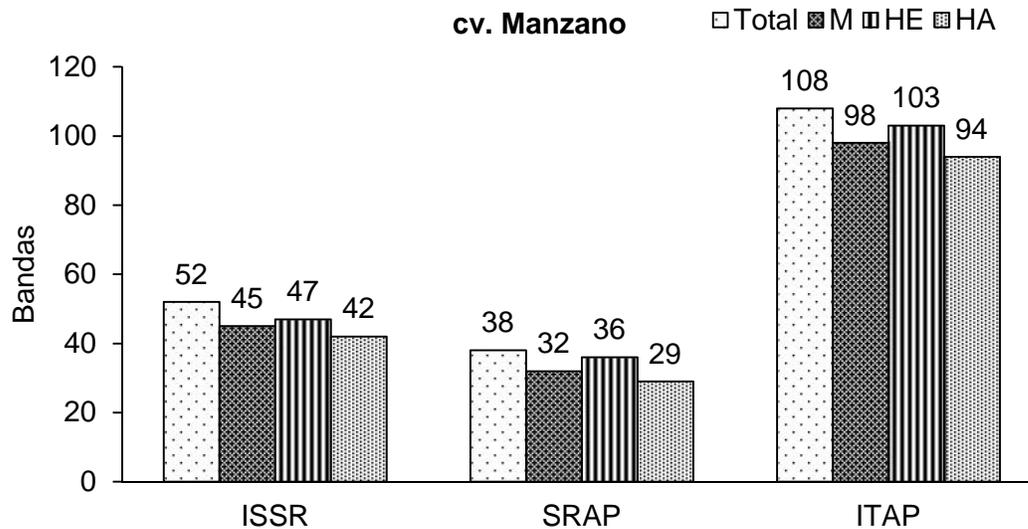


Figura 3.4 Número de bandas amplificadas por cada muestra evaluada mediante cebadores ISSR, ITAP y SRAP en el cv. Manzano.

Para el caso del cv. Enano Gigante, con los cebadores ISSR se amplificó en rango de 9 a 23 bandas con un total de 77 bandas. Se tuvieron en rango de 3 a 7 bandas polimórficas y un total de 22. El tamaño de las bandas varió entre 200 a 3000 pb. El cebador que detectó menor P fue el UBC-841 con 23.5% y el cebador con mayor P fue el UBC-813 con 33.3%. El P con los cinco cebadores fue de 28.6%. Los valores de PIC y RP en este cultivar con el uso de cinco cebadores ISSR varió de 0.10 a 0.14 y 2 a 4.6, respectivamente (Cuadro 3.6 y 3.7). De acuerdo al análisis de agrupamiento UPGMA con la información basada en el marcador ISSR para el cv. Enano Gigante (Figura 3.5a), como se observa en el dendograma, dos fueron los grupos formados, el que acerca a la planta madre y el HE con un índice de similitud de 0.85, mientras que el HA queda en una rama aparte. La similitud del HA con la planta madre y el HE fue desde 0.74 a 0.81 respectivamente (Cuadro A7),

En el caso del cv. Enano Gigante las tres combinaciones de cebadores SRAP seleccionados amplificó un rango de 8 a 14 bandas, con un total de 32 bandas. El NBP fue desde 2 a 5 y se tuvo un total de 10. Estas bandas tuvieron un tamaño desde 110 a 2000 pb. El P con cebadores SRAP varió de 20% generado por Me1/Em7 y 37.5% generado por Me3/Em6 y el total fue de 31.6%. Los valores de PIC variaron desde 0.11 a 0.22; en tanto que los valores de RP fue desde 1.3 a 4 (Cuadro 3.6 y 3.7). El dendograma de las muestras analizadas con estos cebadores para Enano Gigante se puede observar en la Figura 3.5b. El agrupamiento mostró una similitud de 0.84 entre la planta madre y el

HE. La similitud del HA con la planta madre y el HE fue desde 0.75 a 0.76, respectivamente (Cuadro A7).

Para el cv. Enano Gigante las siete combinaciones de cebadores ITAP amplificaron desde 8 a 17 bandas, con un total de 98. El NBP fue desde 2 a 6 con un total de 29. El P generado por cada combinación ITAP varió de 15.3 a 75% y un total de 29.6%. Los cebadores Em3/ltpr3 y Em8/ltpr3 detectaron el polimorfismo más bajo y alto respectivamente con 15.3 y 75%, respectivamente. En tanto que los valores de PIC fueron de 0.06 a 0.33, y los de RP fue desde 1.3 a 4 (Cuadro 3.6 y 3.7). En la Figura 3.5c se presenta el dendograma al usar cebadores ITAP. El procedimiento UPGMA basado en el coeficiente de Jaccard mostró similitud de 0.82 entre la planta madre y HE. La similitud del HA con la planta madre y el HE fue de 0.8 y 0.75 respectivamente (Cuadro A7).

Cuadro 3.6 Número total de bandas (NTB), número de bandas polimórficas (NBP) porcentaje de polimorfismo (P) de cebadores ISSR, combinaciones SRAP e ITAP entre entre la planta madre, HE y HA del cv. Enano Gigante.

	NTB	NBP	Rango (pb)	Polimorfismo (%)
Cebador ISSR				
UBC-848	13	4	300-1700	30.7
Mat-32	23	7	200-3000	30.4
UBC-813	9	3	350-1400	33.3
UBC-841	17	4	200-1400	23.5
Mat-15	15	4	240-1000	26.6
Combinación SRAP				
Me1/Em7	10	2	200-2000	20
Me3/Em6	8	3	140-1400	37.5
Me4/Em7	14	5	110-1950	35.7
Combinación ITAP				
Em3/ltpr3	13	2	100-2750	15.3
Em3/ltpr5	16	4	100-1300	25
Em6/ltpr3	10	4	120-1100	40
Em7/ltpr1	17	3	190-2250	17.6
Em8/ltpr3	8	6	130-1700	75
Em8/ltpr4	17	5	100-2700	29.4
Em10/ltpr4	17	5	100-1400	29.4

La suma de los tres marcadores usados, ISSR, SRAP e ITAP, generó 207 bandas, 61 de las cuales fueron polimórficas para el cv. Enano Gigante. El polimorfismo entre la planta madre, HE y HA fue de 29.4%, detectado por el conjunto de los tres marcadores (Cuadro 3.7). La similitud entre la planta madre y el HE fue de 0.83. La similitud entre él HA con la planta madre y el HE fue de 0.79 a 0.75, respectivamente. Lo anterior en conjunto los coeficientes de Jaccard de los tres marcadores (Figura 3.5d y Cuadro A7)

Cuadro 3.7 Resumen de resultados obtenidos con cebadores ISSR, SRAP e ITAP usados para el análisis molecular entre la planta madre, HE y HA del cv. Enano Gigante.

	ISSR	SRAP	ITAP	Total
Número de cebadores evaluados	15	5	25	45
Número de cebadores usados	5	3	7	15
Total de bandas amplificadas	77	32	98	207
Total de bandas polimórficas	22	10	29	61
Promedio de bandas por cebador	15.4	10.6	14	13.8
Rango (pb)	200-3000	110-2000	100-2750	100-3000
Rango de PIC	0.10-0.14	0.11-0.22	0.06-0.33	0.06-0.33
Rango de RP	2-4.6	1.3-4	1.3-4	1.3-4.6
Polimorfismo (%)	28.6	31.6	29.6	29.4

En la Figura 3.6 se muestra el polimorfismo aportado por la interacción entre la planta madre, el HE y HA, así como entre estos últimos al polimorfismo total observado con cada cebador del cv. Enano Gigante. Para ISSR se observó un polimorfismo de 15.1% entre la planta madre y el hijuelo de espada. Y el polimorfismo entre la planta madre y el HA fue de 18.6%. En tanto que el polimorfismo entre ambos hijuelos (HE y HA), fue de 25.6%. En el caso del uso de tres combinaciones SRAP, el polimorfismo fue de 15.6, 25 y 24.1% entre la planta madre y HE, planta madre y HA, y entre los HE y HA, respectivamente. Finalmente para el marcador ITAP, la variación total observada fue aportado por las interacciones entre la planta madre con el HE, la planta madre con él HA y entre los hijuelos con valores de 17.6, 20 y 24.7% de polimorfismo respectivamente.

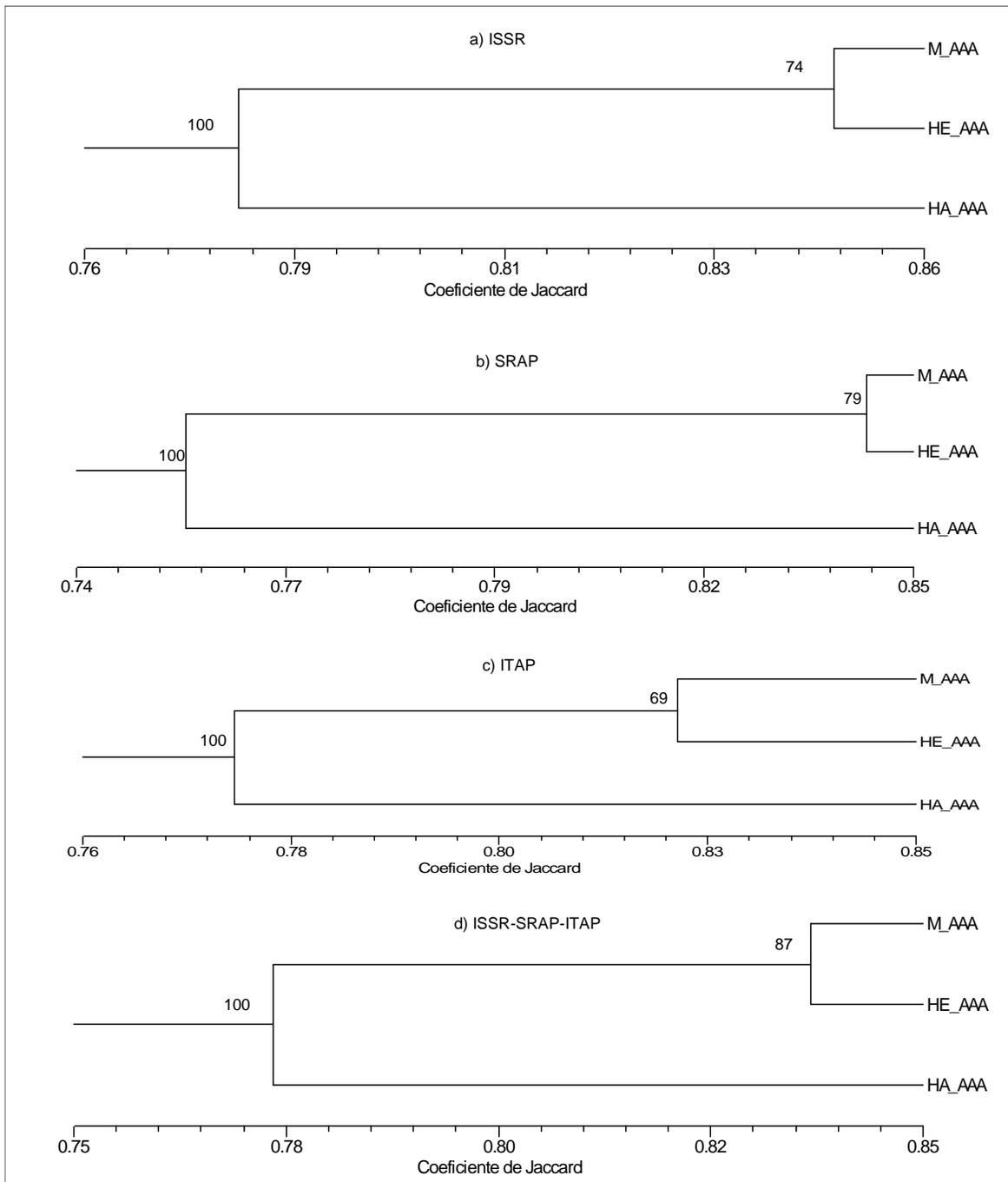


Figura 3.5 Dendrogramas de similitud genética producto del análisis de conglomerados con el procedimiento UPGMA, basado en el coeficiente de Jaccard entre la planta madre (M), hijuelo de espada (HE), hijuelo de agua (HA) con marcadores: a) ISSR; b) SRAP; c) ITAP y d) ISSR-SRAP-ITAP para el cv. Enano Gigante. Los números en cada agrupamiento indican la significancia a realizar un Bootstrap de 1000 repeticiones.

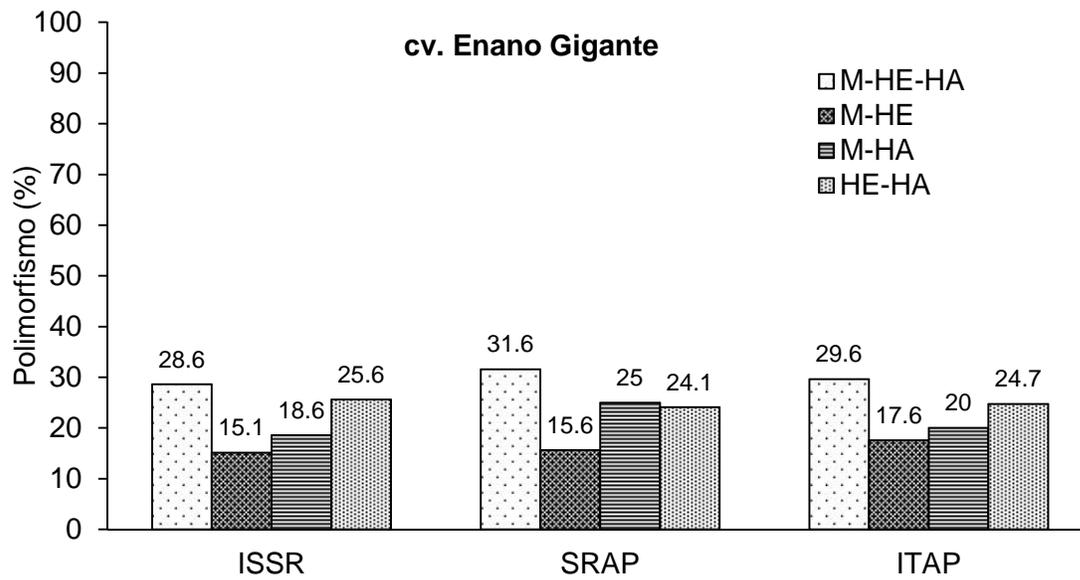


Figura 3.6 Polimorfismo entre la planta madre (M), HE y HA del cv. Manzano revelado con marcadores ISSR, SRAP e ITAP.

En cuanto al número de bandas amplificadas por cada cebador en el cv. Enano Gigante, estas fueron de 71, 32 y 87 al usar cebadores ISSR, ITAP y SRAP respectivamente en la planta madre. A diferencia del cv. Manzano, en los hijuelos, se observó menor número de bandas con respecto a la planta madre en los tres marcadores. El número de bandas amplificadas con los tres cebadores fue de 64, 27 y 79 con ISSR, SARP e ITAP para él HE, respectivamente. Para él HA el número de bandas fue de 65, 24 y 84 con ISSR, SRAP e ITAP respectivamente (Figura 3.7).

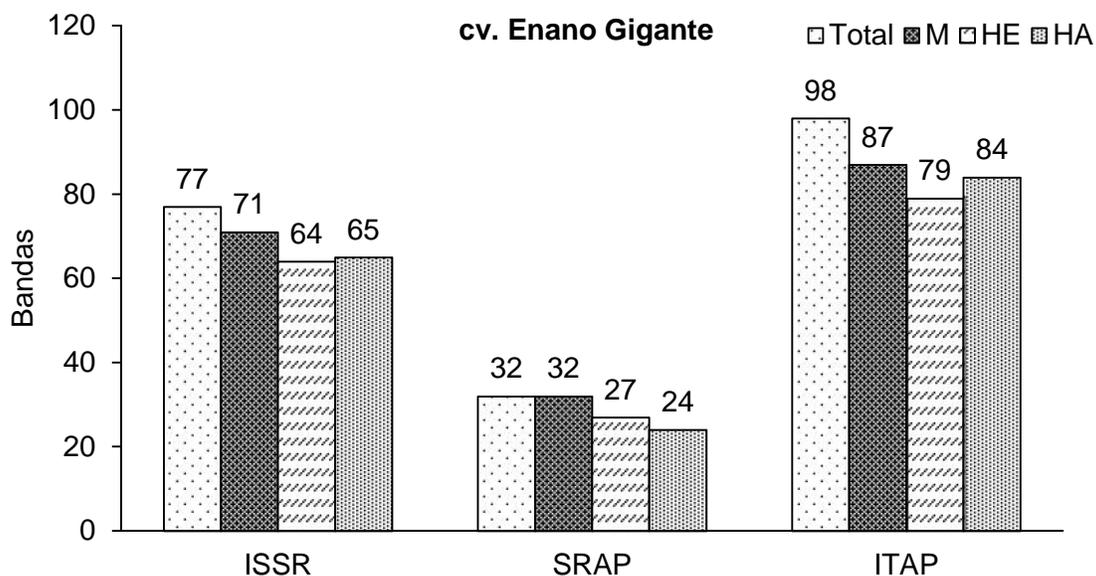


Figura 3.7 Número de bandas amplificadas por cada muestra evaluada mediante cebadores ISSR, ITAP y SRAP en el cv. Enano Gigante.

3.3.3 Extracción de ADN de regenerantes in vitro por OD, ESI-1 y ESI-2 del cv. Manzano

En el Cuadro A6 se pueden observar los resultados en cuanto a las concentraciones de ADN y las proporciones A260/A280 y A260/A230 de las plantas regeneradas por OD, ESI-1 y ESI-2. Como se puede ver nuevamente el protocolo de extracción de Dellaporta *et al.* (1983) y las modificaciones hechas en el grupo de trabajo mostraron eficiencia.

3.3.4 Análisis molecular con marcadores moleculares ISSR, SRAP e ITAP de regenerantes in vitro del cv. Manzano

Con los cebadores seleccionados en el Cuadro 3.7 y 3.8 se presentan los resultados en cuanto al porcentaje de polimorfismo (P), número total de bandas amplificadas (NTB), número de bandas polimórficas (NBP), contenido de información polimórfica (PIC) y poder de resolución (RP) de cebadores ISSR, SRAP e ITAP al evaluar regenerantes del cv. Manzano.

Para las plantas regeneradas por OD se amplificaron un rango de 9 a 12 bandas, con un total de 55, de los cuales un rango de 2 a 5 fueron polimórficas, con un total de 20, con cebadores ISSR. El porcentaje de polimorfismo varió desde 22.2% generado por el cebador UBC-848 a 45% generado por los cebadores UBC-817 y UBC-841. El

polimorfismo de plantas regeneradas por OD revelado con ISSR fue de 36.4%. El valor de PIC varió de 0.08 a 0.32 y el RP de 1.2 a 5.1. Con los datos generados por cebadores ISSR y al someterlos al procedimiento UPGMA, se observó una similitud entre plantas regeneradas por OD que fue desde 0.67 a 0.97 (Figura 3.8a y Cuadro A8). En cuanto al uso de tres combinaciones de cebadores SRAP se amplificaron un total 41 bandas, con un rango de 13 a 15, de los cuales 8 fueron polimórficas. El polimorfismo varió de 7.7 a 33.3%, generados por las combinaciones Me4/Em7 y Me1/Em7 respectivamente, con un total de 19.5%. Los valores de PIC y RP para estos cebadores variaron de 0.02 a 0.12 y 0.4 a 2.8 respectivamente. Con los datos generados por esta combinación de cebadores, se observó una similitud desde 0.86 a 0.95 (Figura 3.8b y Cuadro A8). La combinación de cebadores ITAP detectó polimorfismo que varió de 0 a 62.5% generado por la combinación Em3/ltpr2 y Em8/ltpr1, respectivamente, con un total de 13.7%. Lo anterior fue resultado de la amplificación de 102 bandas, de los cuales 14 fueron polimórficas. Los valores de PIC variaron de 0 a 0.12 y los de RP fueron de 0 a 3.2. Con los datos se generó un dendograma cuya similitud entre plantas regeneradas por OD varió de 0.87 a 0.99 (Figura 3.8c y Cuadro A8). El polimorfismo total entre plantas regeneradas por OD al combinar los tres marcadores evaluados fue de 21.2%. La similitud al usar el coeficiente de Jaccard de los tres tipos de marcadores fue de 0.83 a 0.92 entre plantas regeneradas por OD (Figura 3.8d y Cuadro A8)

Por su parte las plantas regeneradas por ESI-1 se amplificaron un rango de 9 a 11 bandas, con un total de 48, de los cuales un rango de 1 a 4 fueron polimórficas, con un total de 11, con cebadores ISSR. El porcentaje de polimorfismo varió desde 9.1% generado por el cebador Mat-32 a 40% generado por el cebador Mat-15. El polimorfismo total de plantas regeneradas por esta vía revelado con ISSR fue de 22.9. El valor de PIC varió de 0.02 a 0.16 y el RP de 0.8 a 2.4. El dendograma UPGMA, mostró una similitud entre plantas regeneradas por ESI-1 que fue desde 0.78 a 0.98 (Figura 3.9a y Cuadro A9). Con las tres combinaciones de cebadores SRAP se amplificaron un total 32 bandas, con un rango de 9 a 12, de los cuales 4 fueron polimórficas. El polimorfismo varió de 9.1 a 25%, generados por las combinaciones Me1/Em7 y Me4/Em7, respectivamente, con un total de 12.5%. Los valores de PIC y RP para estos cebadores variaron de 0.04 a 0.09 y 0.8 a 1.6 respectivamente. Con los datos generados por esta combinación de cebadores, se observó una similitud desde 0.87 a 0.97 (Figura 3.9b y Cuadro A9). La combinación de

cebadores ITAP detectó polimorfismo que varió de 0 a 27.7%. Las combinaciones Em7/Itpr4, Em8/Itpr1 y Em/Itpr5 generaron bandas monomórficas entre plantas regeneradas por ESI-1. En tanto que la combinación Em6/Itpr3 detectó el polimorfismo más alto con 27.7. El total fue de 24.2%. Lo anterior fue resultado de la amplificación de 88 bandas, de los cuales 10 fueron polimórficas. Los valores de PIC variaron de 0 a 0.1 y los de RP fueron de 0 a 2.4. Con los datos se generó un dendograma cuya similitud entre plantas regeneradas por ESI-1 varió de 0.87 a 0.99 (Figura 3.9c y Cuadro A9). El polimorfismo total entre plantas regeneradas por ESI-1 al combinar los tres marcadores evaluados fue de 14.8% (Cuadro 3.8). La similitud entre plantas regeneradas por ESI-1 al combinar los tres tipos de marcadores evaluados varió de 0.89 a 0.96 (Figura 3.9d y Cuadro A9)

Para las plantas regeneradas por ESI-2 con cebadores ISSR se amplificaron un rango de 8 a 12 bandas, con un total de 48, de los cuales un rango de 4 a 7 fueron polimórficas, con un total de 26. El porcentaje de polimorfismo varió desde 33.3% generado por el cebador Mat-32 a 70% generado por el cebador UBC-841. El polimorfismo total de plantas regeneradas por ESI-2 revelado con ISSR fue de 54.4. El valor de PIC varió de 0.1 a 0.26 y el RP de 1.6 a 3.2. Con los datos generados por cebadores ISSR y al someterlos al procedimiento UPGMA basado en el coeficiente de Jaccard, se observó una similitud entre plantas regeneradas por ESI-2 que fue desde 0.56 a 0.82 (Figura 3.10a y Cuadro A10). En cuanto de cebadores SRAP se amplificaron un total 33 bandas, con un rango de 10 a 13, de los cuales 8 fueron polimórficas. El polimorfismo varió de 10 a 30.7%, generados por las combinaciones Me1/Em7 y Me3/Em6 respectivamente, con un total de 24.2%. Los valores de PIC y RP para la combinación de cebadores SRAP variaron de 0.03 a 0.12 y de 0.4 a 2.4 respectivamente. Con los datos generados por esta combinación de cebadores, se observó una similitud desde 0.78 a 0.96 (Figura 3.10b y Cuadro A10). La combinación de cebadores ITAP detectó polimorfismo que varió de 0 a 28.5%, con un total de 13.7%. Las combinaciones Em6/Itpr3 y Em10/Itpr5 detectaron solo bandas monomórficas. Lo anterior fue resultado de la amplificación de 81 bandas, de los cuales 10 fueron polimórficas. Los valores de PIC variaron de 0 a 0.11 y los de RP fueron de 0 a 1.6. Con los datos se generó un dendograma cuya similitud entre plantas regeneradas por ESI-2 varió de 0.87 a 0.99 (Figura 3.10c y Cuadro A10). El polimorfismo total entre plantas regeneradas por ESI-2 en conjunto de los tres marcadores evaluados

fue de 27.1% (Cuadro 3.8). La similitud de plantas regeneradas por ESI-2 proveniente del conjunto de los tres marcadores varió de 0.77 a 0.95 (Figura 3.10d y Cuadro A10).

Cuadro 3.8 Número total de bandas (NTB), número de bandas polimórficas (NBP) porcentaje de polimorfismo (P) de cebadores ISSR, combinaciones SRAP e ITAP entre regenerantes obtenidos por OD, ESI-1 y ESI-2 *in vitro* del cv. Manzano.

	OD			ESI-1			ESI-2			Rango (pb)
	NTB	NBP	P (%)	NTB	NBP	P (%)	NTB	NBP	P (%)	
ISSR										
UBC-817	11	5	45	11	2	18.2	10	6	60	200-2750
UBC-848	9	2	22.2	9	2	22.2	8	4	50	260-2875
Mat-32	12	3	25	11	1	9.1	12	4	33.3	200-3000
UBC-841	11	5	45	7	2	28.5	10	7	70	200-1400
Mat-15	12	5	41	10	4	40	8	5	62.5	300-2000
SRAP										
Me1/Em7	15	5	33.3	11	1	9.1	10	1	10	90-2000
Me3/Em6	13	2	15.3	9	1	11.1	13	4	30.7	140-1800
Me4/Em7	13	1	7.7	12	3	25	10	3	30	110-1950
ITAP										
Em3/ltpr2	12	0	0	12	2	16.7	12	2	16.7	140-1500
Em3/ltpr5	16	1	6.3	14	1	7.1	14	4	28.5	130-2000
Em6/ltpr3	18	1	5.6	18	6	27.7	12	0	0	130-1440
Em7/ltpr4	18	1	5.6	13	0	0	13	1	7.7	140-1700
Em7/ltpr5	17	5	29.4	12	1	8.3	11	1	9.1	110-1900
Em8/ltpr1	8	5	62.5	7	0	0	7	2	28.5	110-1650
Em10/ltpr5	13	1	7.7	12	0	0	12	0	0	100-1500

CAPÍTULO III

Cuadro 3.9 Resumen de resultados obtenidos con los marcadores ISSR, SRAP e ITAP en el análisis molecular entre plantas regeneradas por OD, ESI-1 y ESI-2 del cv. Manzano.

	ISSR	SRAP	ITAP	Total
OD				
Número de cebadores usados	5	3	7	15
Total de bandas amplificadas	55	41	102	198
Total de bandas polimórficas	20	8	14	42
Promedio de bandas por cebador	11	13.6	14.7	13.2
Rango (pb)	200-3000	90-2000	100-2000	90-3000
Rango de PIC	0.08-0.32	0.02-0.12	0-0.12	0-0.32
Rango de RP	1.2-5.1	0.4-2.8	0-3.2	0-5.1
Polimorfismo (%)	36.4	19.5	13.7	21.2
ESI-1				
Número de cebadores usados	5	3	7	15
Total de bandas amplificadas	48	32	88	168
Total de bandas polimórficas	11	4	10	25
Promedio de bandas por cebador	9.6	10.6	12.6	11.2
Rango (pb)	200-3000	90-2000	100-2000	90-3000
Rango de PIC	0.02-0.16	0.04-0.09	0-0.1	0-0.16
Rango de RP	0.8-2.4	0.8-1.6	0-2.4	0-2.4
Polimorfismo (%)	22.9	12.5	11.4	14.8
ESI-2				
Número de cebadores usados	5	3	7	15
Total de bandas amplificadas	48	33	81	162
Total de bandas polimórficas	26	8	10	44
Promedio de bandas por cebador	9.6	11	11.6	10.8
Rango (pb)	200-3000	90-2000	100-2000	90-3000
Rango de PIC	0.1-0.26	0.03-0.12	0-0.11	0-0.26
Rango de RP	1.6-3.2	0.4-2.4	0-1.6	0-3.2
Polimorfismo (%)	54.2	24.2	12.3	27.1

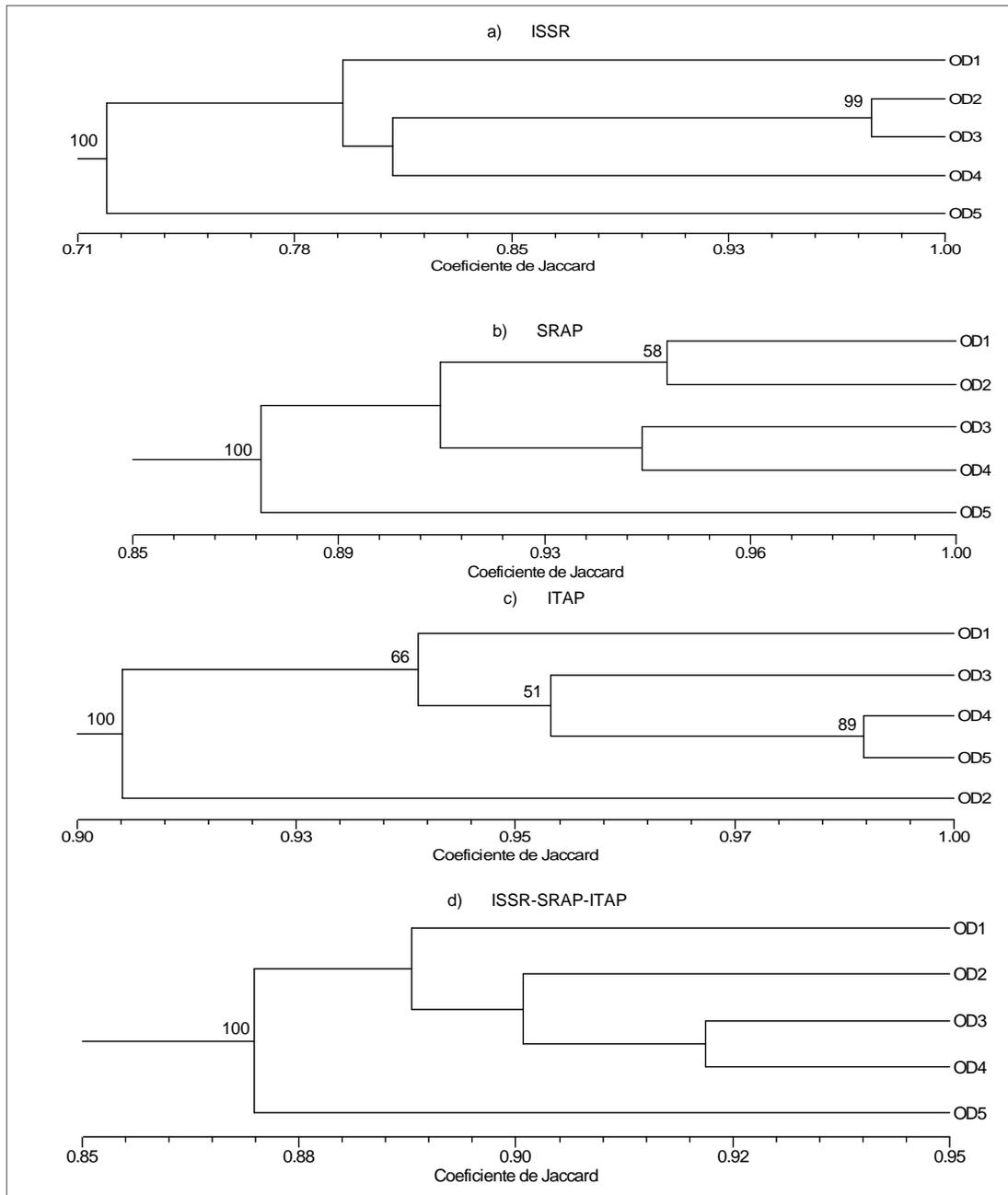


Figura 3.8 Dendrogramas de la similitud genética obtenidos del análisis de conglomerados con el procedimiento UPGMA, basado en el coeficiente de Jaccard de regenerantes *in vitro* por OD del cv. Manzano mediante marcadores: a) ISSR; b) SRAP; c) ITAP y d) ISSR-SRAP-ITAP. Los números en cada agrupamiento indican la significancia al realizar un Bootstrap de 1000 repeticiones.

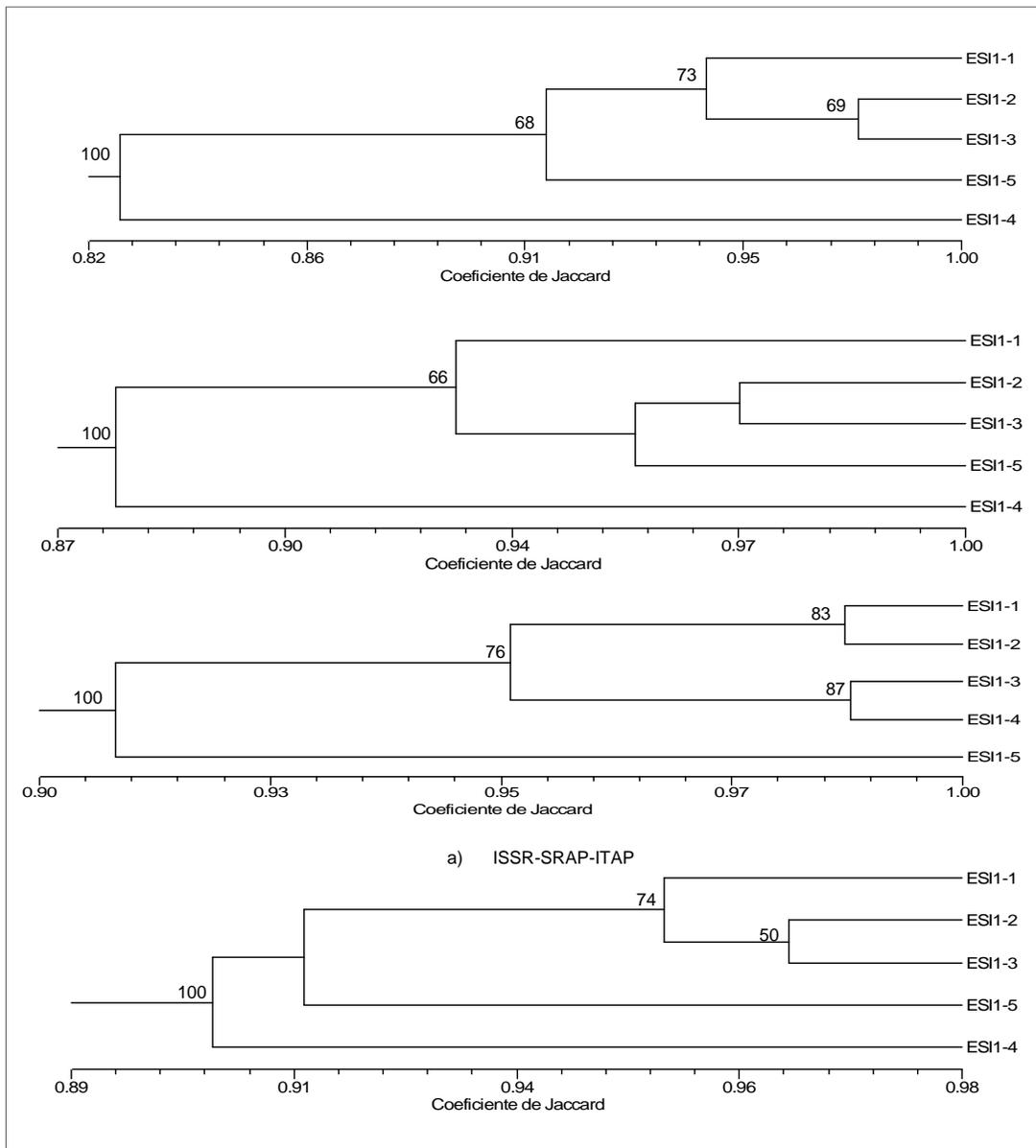


Figura 3.9 Dendrogramas de la similitud genética producto del análisis de conglomerados con el procedimiento UPGMA, basado en el coeficiente de Jaccard regenerantes *in vitro* por ESI-1 mediante marcadores: a) ISSR; b) SRAP; c) ITAP y d) ISSR-SRAP-ITAP para el cv. Manzano. Los números en cada agrupamiento indican la significancia al realizar un Bootstrap de 1000 repeticiones.

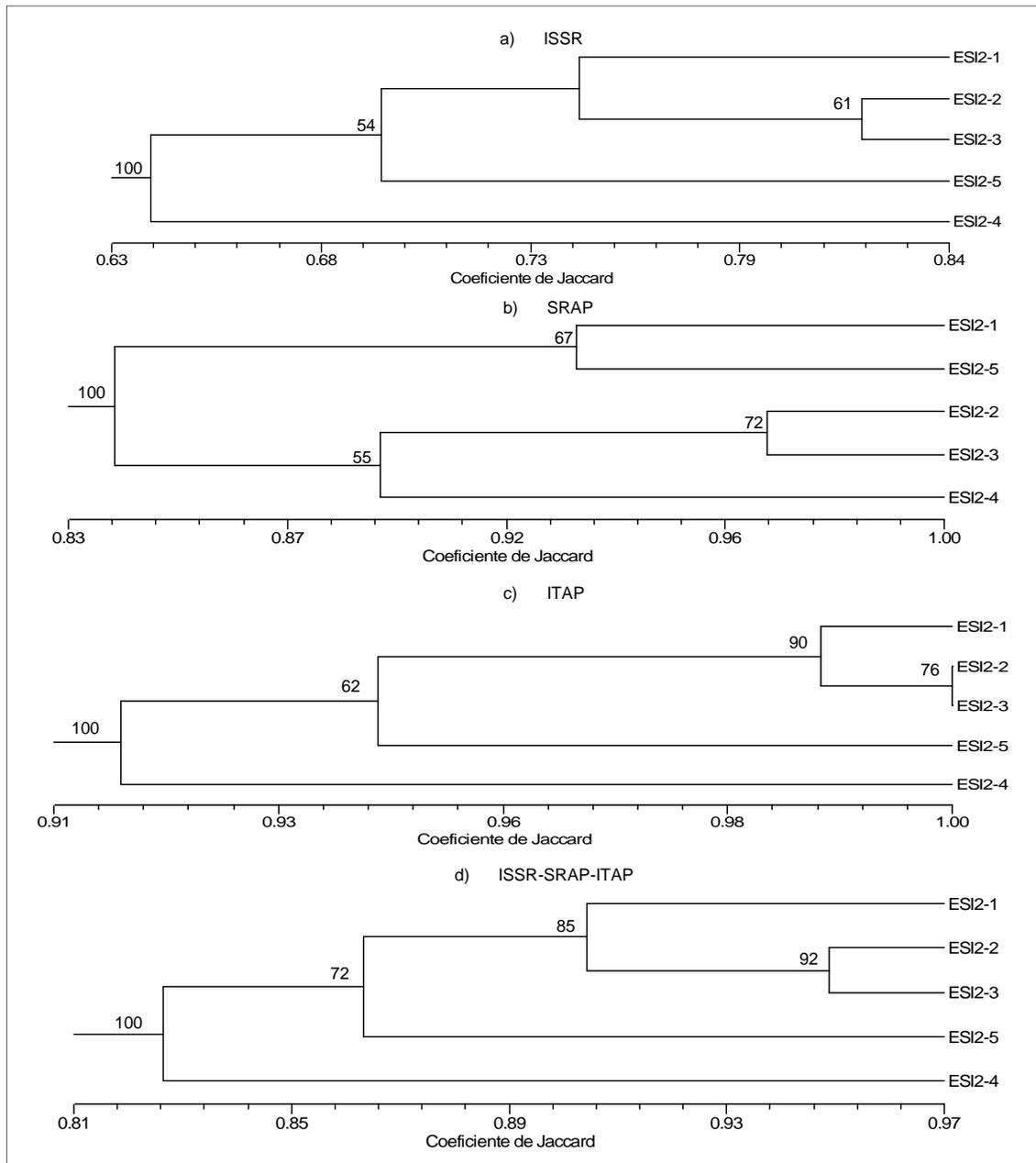


Figura 3.10 Dendrogramas de la similitud genética producto del análisis de conglomerados con el procedimiento UPGMA, basado en el coeficiente de Jaccard regenerantes *in vitro* por ESI-2 mediante marcadores: a) ISSR; b) SRAP; c) ITAP y d) ISSR-SRAP-ITAP para el cv. Manzano. Los números en cada agrupamiento indican la significancia al realizar un Bootstrap de 1000 repeticiones.

En la Figura 3.11 se presenta el número de bandas generadas de las muestras evaluadas por cada marcador. El número de bandas de la planta madre fue de 45, 34 y 93 para los marcadores ISSR, SRAP e ITAP respectivamente. Con ISSR el rango de bandas

amplificadas que varió de 27 a 51; mientras, que para SRAP, el número de bandas varió de 27 a 38 y finalmente para ITAP el número de bandas varió de 71 a 101. Lo anterior indica que hay aumento y pérdida de regiones que reconocen cada marcador. Como ejemplo en la Figura 3.12 se observa la presencia de una banda de 400 pb que fue amplificado solamente por las plantas regeneradas por ESI-2, que no está presente en la planta madre, hijuelo de espada, de agua y plantas regeneradas por OD y ESI-1.

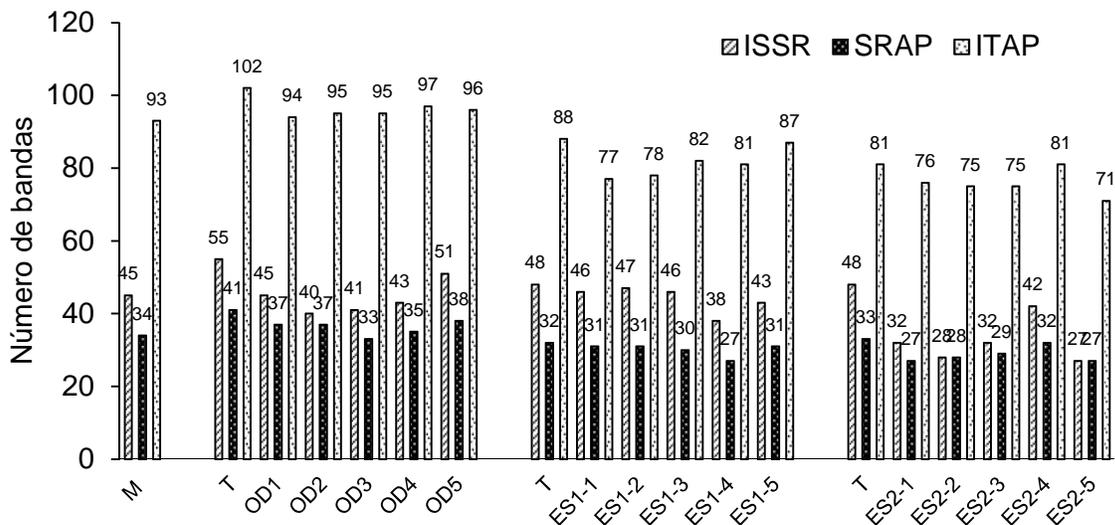


Figura 3.11 Número de bandas generadas por los cebadores ISSR, ITAP y SRAP en la planta madre (M) y plantas regeneradas por OD, ESI-1 y ESI-2 del cv. Manzano. T=Total de bandas amplificadas por cada marcador en cada ruta morfológica.

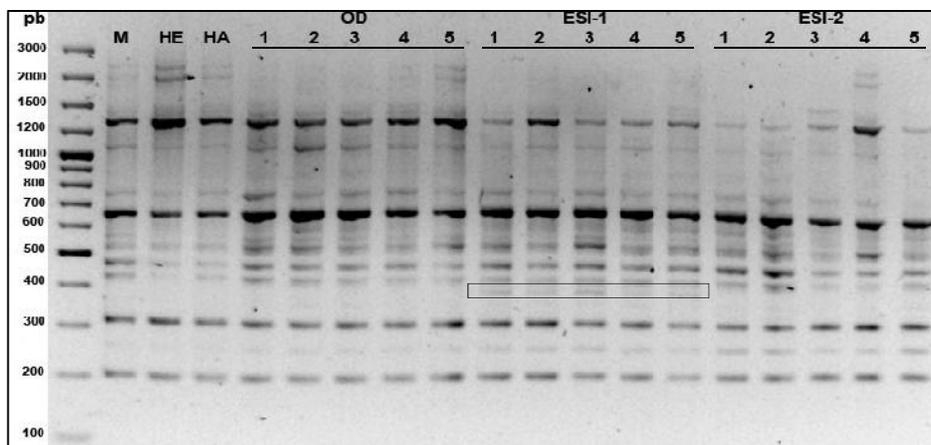


Figura 3.12 Patrón electroforético de ISSR usando el cebador Mat 32 de diferentes sistemas de regeneración. Carril 1, marcador de masa molecular de 100 a 3000 pb (Thermo Scientific GenRuler 100 bp Plus DNA Ladder, ready-to-use) planta madre (M), hijo de espada (HE) e hijo de agua (HA) y agrupaciones de plantas regeneradas vía OD, ES-1 y ES-2 *in vitro*. En el recuadro se observaron bandas de un tamaño de 400 pb, que fueron amplificadas solamente en las plantas regeneradas por ESI-1.

3.3.5 Comparación de la variación genética natural y de las regenerantes in vitro del cv. Manzano revelado con marcadores moleculares ISSR, SRAP e ITAP

En la Figura 3.13 se presenta la comparación del polimorfismo encontrado entre la planta madre, HE y HA (variación natural), y para cada ruta morfogénicas del cv. Manzano. Para ISSR se observó un polimorfismo que fue desde 22.9 hasta 54.7%. La ESI-1 propició el polimorfismo más bajo con 22.9 y el más alto fue con ESI-2 (54.7%). Mientras que para SRAP el polimorfismo varió desde 12.5 a 31.6. La ESI-1 propició el polimorfismo más bajo con 12.5% y la mayor fue la variación natural con 31.6%. Con los cebadores ITAP la variación fue de 12.3 a 19.4%. Con este último marcador se encontró menor polimorfismo por las rutas evaluadas respecto al observado en la variación natural.

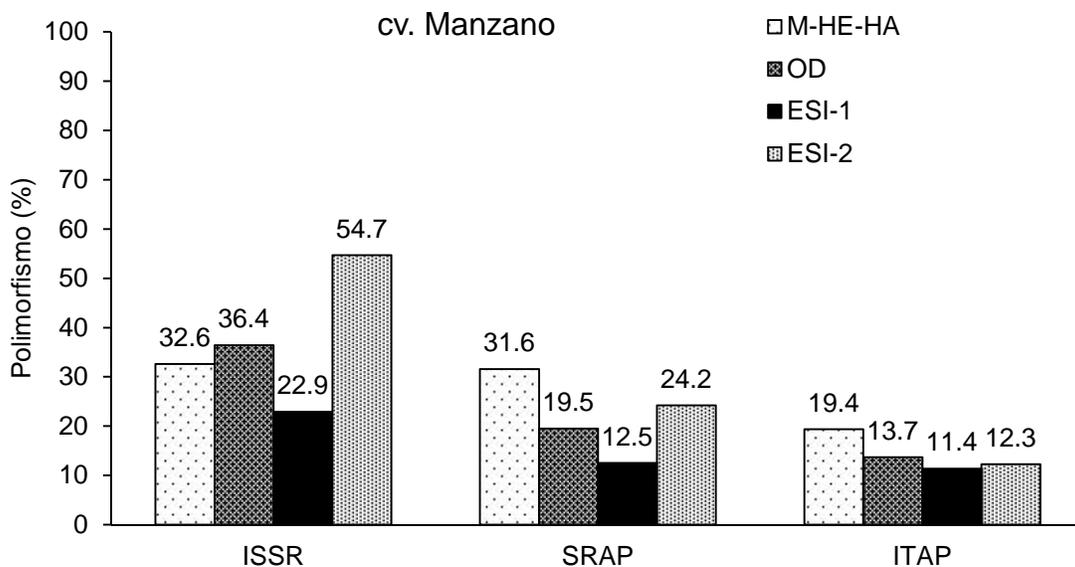


Figura 3.13 Nivel de variación natural entre la planta madre (M), HE, HA y de plantas regeneradas vía OD, ESI-1 y ESI-2 del cv. Manzano.

3.4 DISCUSIÓN

3.4.1 Análisis molecular con marcadores ISSR, SRAP e ITAP de la planta madre (M), hijuelo de espada (HE) y de agua (HA)

Con este trabajo se presenta por primera vez una comparación de la relación genética que existe entre la planta madre, los hijuelos de espada y de agua de dos cultivares de *Musa* spp. Mediante el uso de marcadores moleculares ISSR, SRAP e ITAP. La aportación de este trabajo se basa en el estudio de hijuelos de agua. Hasta el momento lo que se sabía de este tipo de hijuelos era que, las primeras hojas eran anchas además de presentar nula o poca conexión con la planta madre. Además, son considerados individuos no deseables para la renovación de plantaciones comerciales (Nelson *et al.* 2006), hecho que se atribuye a una pérdida de vigor de las plantas y disminución de la producción de fruto de los renuevos de este tipo de plantas. El único trabajo en que se presentan evidencias de las diferencias genéticas entre planta madre e hijo de espada es el de Vroh-Bi *et al.* (2011), quienes evaluaron el nivel de variación entre clones de diversos cultivares de *Musa* spp., encontrando un polimorfismo de 34.04% con el uso de 54 cebadores SSR entre la planta madre y los hijuelos espada, cuando se utilizaron seis combinaciones AFLP, se encontró una variación del 0.5%. Lo cual indica la conveniencia de ampliar el número y tipo de marcadores a usar para descubrir diferencias genéticas de las clonas bajo análisis.

Un aspecto relevante es que tanto en el cv. Manzano (AAB) como en el cv. Enano Gigante (AAA), por lo general se observó menor similitud entre la planta madre con el hijuelo de agua, mientras que siempre se observó mayor similitud entre la planta madre y el hijuelo de espada. Este resultado es congruente con el polimorfismo detectado por cada tipo de marcador a excepción del marcador ITAP en el cv. Manzano, en el sentido de que este fue aportado en buena medida por el polimorfismo que hay entre la planta madre y el hijuelo de agua. Lo anterior puede explicar la razón de la diferencia genética de las plantas, por la cual en campo, los hijuelos de espada, son preferidos para la renovación de plantaciones en comparación a los hijuelos de agua (Nelson *et al.* 2006). Como se mencionó anteriormente, los hijuelos de agua presentan características morfológicas contrastantes al hijuelo de espada, que lo definen como individuos inferiores. Por otro lado, el polimorfismo detectado entre la planta madre y el hijuelo de agua resultó

de la ausencia de bandas que no fueron amplificadas por los cebadores utilizados. En el caso del hijuelo de espada se caracterizó en general por presentar mayor número de bandas respecto de la planta madre. Con lo anterior, un estudio dirigido a correlacionar las regiones que varían dentro del genoma con las nuevas herramientas de secuenciación con estudios en campo podrá contribuir a generar avances significativos en el mejoramiento genético del género *Musa*.

La variación encontrada en este trabajo entre los hijuelos y la planta madre se puede explicar con base en la variación espontánea que se producen de manera natural en bananos y que es considerada como una fuerza que conduce a la evolución del género *Musa* (Heslop-Harrison y Schwarzacher 2007). Este fenómeno no está limitado únicamente a la propagación *in vitro*, sino que puede ocurrir de manera natural en tejidos somáticos y reproductivos de las plantas en respuesta a señales ambientales. Estos cambios se pueden describir como un choque o plasticidad genómica, producto de haber agotada todas las respuestas fisiológicas normales de las plantas, activada por algún tipo de estrés (biótico o abiótico) (Oh *et al.* 2007). Esta respuesta puede inducir una reorganización del genoma, como mecanismo de adaptación al estrés y supervivencia del organismo. La preexistencia de puntos calientes susceptibles a mutación y un repertorio de alelos alternativos es congruente con esta respuesta que se limita a una subfracción del genoma (Cullis 2005).

Otro aspecto relevante del presente trabajo relacionado con el estudio de la variación natural entre los hijuelos y la planta madre fue que para el cv. Manzano, al comparar los marcadores usados, los ISSR y SRAP, estos revelaron mayor polimorfismo (32.6 y 31.6 respectivamente) respecto al detectado por ITAP (19.4%). Lo anterior sugiere que tanto en las regiones altamente repetitivas detectadas por ISSR, y las regiones relacionadas a genes (exones e intrones) manifestada por SRAP, existe mayor variación natural. Y que la variación en regiones relacionadas a genes basados solamente en intrones fue menor para el cv. Manzano. En el cv. Enano Gigante la variación natural fue de 28.6, 31.6 y 29.6 con ISSR, SRAP e ITAP respectivamente. Por lo que a diferencia del cv. Manzano, el cv. Enano Gigante mostró el mismo nivel de variabilidad en las tres regiones evaluados con ISSR, SRAP e ITAP.

Por otra parte, el número de bandas amplificadas con los marcadores ISSR, se encontró

que tanto la planta madre y los hijuelos de espada y de agua del cv. Enano Gigante (AAA) presentaron un mayor número de bandas, con respecto a los amplificados en el cv. Manzano (AAB). Esto coincide con lo reportado por Hribova *et al.* (2010), quienes al analizar microsatélites en aproximadamente 100 Mb de secuencias repetitivas de *M. a.* cv. Calcuta 4 (genoma AA), encontraron mayor proporción de motivos compuestos por tri-, tetra- y pentánucleótidos (32, 12 y 7% respectivamente) contra 3, 2 y 1%, presentes en el *M. b.* cv. Pisang Klutuk Wulang (genoma BB). Esto da lugar a la sugerencia de uso de una mayor proporción de cebadores ISSR con motivos de tri- tetra- y pentánucleótidos al evaluar la variación somaclonal entre clones de cultivares con composición genómica A. Otro factor que pudo contribuir a esta ligera diferencia entre los cultivares evaluados (Manzano y Enano Gigante) en cuanto al número de bandas amplificadas por los cebadores ISSR, podría estar relacionado con el hecho que de los cinco cebadores evaluados, solamente dos de ellos se caracterizaron por contener motivos de tetra- y pentanucleótidos (Mat 15 y Mat 32). Al comparar los tipos de microsatélites presentes en los genomas A y B de *Musa*, se encontró que la densidad de microsatélites tipo 1 (con longitudes de aproximadamente 20 pb) es ligeramente mayor (1 por cada 323 pb) en el cv. Pisank Klutuk Wulang (genoma BB) versus a lo observado en el cv. Pahang (genoma AA), 1 por cada 387 pb (Davey *et al.* 2013).

Las diferencias observadas en cuanto al número de bandas amplificadas por los cebadores SRAP e ITAP se pueden atribuir a las propias de la constitución genómica de los cultivares evaluados (AAB para Manzano y AAA para Enano Gigante). Se mencionan que al alinear el ADN genómico del genoma B con el genoma A, 36.3 Gpb no pudieron ser mapeados, lo que pueden representar regiones estructurales divergentes entre ambos genomas (Davey *et al.* 2013). Sin embargo, el ensamblaje de *novu* de estas regiones del genoma B de *Musa*, no mostraron regiones ricas en genes.

3.4.2 Análisis molecular con marcadores moleculares ISSR, SRAP e ITAP de regenerantes *in vitro* del cv. Manzano

En este trabajo se evaluó el polimorfismo con marcadores ISSR, SRAP e ITAP entre plantas regeneradas *in vitro* por OD, ESI-1 y ESI-2 del cv. Manzano, partiendo de explantes florales de una sola planta, los cuales se contrastaron para evaluar la variación observada entre la planta donadora del material progenitor y sus correspondientes

hijuelos de espada y de agua. Lo anterior se hizo bajo el argumento de eliminar la posible variación somaclonal que puede resultar de la variación genética pre-existente en el explante, i.e., aneusomatías o polisomatías (D'Amato 1977). Por lo que este sería uno de los pocos trabajos que comparan el efecto de la ruta morfogénica (OD y ESI) en la inducción de VS. Cuando se evaluaron explantes florales y brotes de hijuelos espada de una única planta madre para la regeneración vía OD se encontró que el estado quimérico del ápice (ya sea floral o vegetativo) afectaba directamente a la naturaleza genética del explante, cuya proliferación *in vitro* aumentaba la posibilidad de diseminar el estado quimérico del explante inicial (Krikorian *et al.* 1999).

Al analizar el P en conjunto de las plantas regeneradas del cv. Manzano por OD, ESI-1, ESI-2, estos resultaron de 21.2, 14.8 y 27.1% con ISSR, SRAP e ITAP, respectivamente. Estos valores de P se podrían considerar altos respecto a los reportados por otros autores; sin embargo, cabe señalar que el polimorfismo detectado se puede atribuir a que de los cuarenta y cinco cebadores evaluados inicialmente, se seleccionaron únicamente aquellos que mostraron efectividad en la detección de polimorfismo natural (cinco de ISSR, tres combinaciones de SRAP y siete de ITAP). Esta selección se realizó con el fin de aumentar la probabilidad de evidenciar pequeñas diferencias.

Al contrastar el polimorfismo observado por los tres sistemas de marcadores entre plantas regeneradas por OD, se obtuvieron cifras de 36.4, 19.5 y 13.7% con ISSR, SRAP e ITAP, respectivamente. Estos datos son mayores a los observados en el cv. Nanjanagudu Rasabale (AAB), ya que al regenerar plantas por OD, pero con el uso de ápices de brotes de hijuelos de espada, se observaron patrones homogéneos con el uso de 12 y 50 cebadores ISSR y RAPD, respectivamente (Lakshmanan *et al.* 2007). Por su parte, Ray *et al.* (2006) encontraron alta estabilidad genética en el cv. Martaman (AAB) en plantas micropropagadas por OD con el empleo de 12 cebadores ISSR. En contraste, se reportó mayor detección de polimorfismo con los cebadores ISSR comparados con los cebadores de RAPD (Ray *et al.* 2006). El polimorfismo encontrado en este trabajo está dentro de la media del rango de 23.7 a 55.9% de polimorfismo con el uso de 10 cebadores ISSR reportado por Aremu *et al.* (2013) para el cv. Williams (AAA) con el uso de diferentes citocininas. A este respecto los autores sugieren que tanto el tipo de citocininas como el ciclo de subcultivos contribuyen al grado de variación encontrada. En general hay pocas

referencias en cuanto al nivel de polimorfismo entre plantas regeneradas por OD al utilizar explantes florales (0% de polimorfismo con RAPD e ISSR) (Hrahsel *et al.* 2014). En la literatura, se puede encontrar más estudios sobre el uso de ápices vegetativos de hijuelos de espada en *Musa* spp. y otros marcadores, tales como 55% con AFLP (Bairu *et al.* 2006), 9.1 a 100% con RAPD (Mohamed 2007), 51.4% con cebadores RAPD (Sheidai *et al.* 2008), de 3.96 a 23% con MSAP y AFLP, respectivamente (James *et al.* 2004).

El nivel de polimorfismo revelado en plantas regeneradas por OD se puede atribuir a diversos factores. Uno de ellos pudo haber sido el uso del 2.5 μM de TDZ durante la inducción y proliferación de yemas florales, pues en *M. a.* x *M. b.* (AAB) cv. CEMSA ¾, al utilizar un rango de 1.3 a 22.2 μM TDZ, se observaron brotes con apariencia de bulbo carnoso y rodeados de hojas verde claro. Manjula *et al.* (2014) observaron anomalías morfológicas y variación del 11 al 20% en el cv. Rajapari (AAB) al emplear 1 μM TDZ. Así mismo el uso de 8.9 μM BA con 1 μM AIA para la obtención de brotes múltiples pudo influenciar el polimorfismo. Se han descrito diferentes efectos de las citocininas en la inducción de VS en *Musa*. Por ejemplo, Giménez *et al.* (2001) reportaron la obtención del somaclon CIEN-BTA-03 al utilizar 66.6 μM BA y Martin *et al.* (2006) del somaclon CUDBT-B1 con el uso de 13.3 μM de BA. Bairu *et al.* (2006) reportaron 55% de polimorfismo con marcadores RAPD al utilizar de 11.1 a 22.2 μM BA en el cv. Zelig (AAA).

El polimorfismo de 22.9, 12.5 y 11.4% entre plantas regeneradas por ESI-1 del cv. Manzano (AAB) mostrado por los marcadores ISSR, SRAP e ITAP, respectivamente, es mucho mayor a los reportados en la literatura al utilizar esta misma ruta morfogénica, en otros genotipos. Youssef *et al.* (2011b) determinaron de 1.4 a 1.6% de polimorfismo con el uso de marcadores AFLP en el cv. Enano Gigante y Williams, respectivamente (AAA), mientras que con estudios de caracterización morfológica se encontró una variación en un 3.6% en el cultivar Enano Gigante (Shchukin *et al.* 1997). Para la segunda ruta denominada ESI-2, el polimorfismo fue aún mayor, con 54.2, 24.2 y 12.3% para ISSR, SRAP e ITAP, respectivamente. Se menciona que el uso de esta vía embriogénica dio lugar a plantas regeneradas uniformes del cv. *Musa* AAA, cv. 'Dwarf Cavendish', sin embargo, no se llevaron a cabo estudios a nivel molecular que confirme este argumento (Pérez-Hernández y Rosell-García 2008).

El nivel de variación observado en las rutas morfogénicas que involucraron la inducción

de ESI, se pueden atribuir a diversos factores. Uno de ellos es la composición del medio de cultivo para la inducción y proliferación del callo embriogénico, en cuanto a los RC adicionados (18.1 μ M 2,4-D, 5.7 μ M AIA y 5.4 μ M ANA). Esta condición pudo favorecer una mayor proporción de auxinas con respecto a los de citocininas en el tejido. En general, en *Musa* la inducción de callo embriogénico es altamente dependiente de auxinas. Una concentración óptima y la proporción precisa de auxina/citocinina es fundamental para un sistema eficiente de micropropagación (Letham y Gollnow 1985). Esta condición puede favorecer a la VS, ya que los primeros eventos del cultivo de tejidos son controlados por la aplicación de RC de manera exógena, que desencadenan la morfogénesis a través de la disrupción del ciclo celular (Peschke y Philips 1992). Respecto al uso de auxinas durante el cultivo de callos o células en suspensión, se ha reportado que incrementan la variación genética al incrementar la tasa de metilación del ADN (LoSchiavo *et al.* 1989). Por ejemplo, el 2,4-D, utilizado para la inducción y multiplicación del callo embriogénico en medio semisólido y las suspensiones celulares del cv. Manzano, ha sido asociado con anomalías genéticas, tales como poliploidía y estimulación de la síntesis de ADN que puede dar lugar a eventos de endoreduplicación (Mohanty *et al.* 2008; Ahmed *et al.* 2004). Recientemente, Escobedo-GM *et al.* (2014) reportaron un incremento en la cantidad de ADN (de 1.22 a 1.28 pg) en una línea embriogénica de *M. a.* Colla expuesta a 2,4-D por un periodo aproximado de dos años sin cambios en el nivel de ploidía.

3.4.3 Comparación de la variación genética natural y de las regenerantes in vitro del cv. Manzano revelado con marcadores moleculares ISSR, SRAP e ITAP

La variación natural observada en el cv. Manzano con los tres tipos de marcadores evaluados se contrastó con el obtenido por cada una de las rutas morfogénicas desarrolladas para este mismo cultivar. Con ISSR se observó mayor variación entre plantas regeneradas por OD (36.4%) y ESI-2 (54.7%) y el que propició menor variación respecto al natural fue la ESI-1 (22.9 %). Esto mismo se observó con SRAP con 19.5 y 24.2% para OD y ESI-2 respectivamente y 12.5 % para ESI-1. Y con ITAP nuevamente OD y ESI-2 figuraron con mayor nivel de polimorfismo (13.7 y 12.3% respectivamente) contra 11.4 en el ESI-1. El menor nivel de variación observada entre plantas del ESI-1 puede atribuirse a que en el proceso de ES, la adquisición de competencia celular es

necesario para la desdiferenciación del tejido original (yemas florales masculinas), sin embargo, sólo se generaron “células benéficas” que aunque son diferentes, tienen una alta capacidad de adaptación, incluso mayor a la de las “células fieles al tipo”, producto de la variación somaclonal. El término de “células diferentes al tipo” incluye a todas las células, menos a las “células fieles al tipo” (Wang y Wang 2012). Por lo que las plantas regeneradas por ESI-1 pueden haber tenido su origen tanto en “células fieles al tipo” como en aquellas que sufrieron cambios, necesarios para la expresión de la totipotencia celular (células diferentes al tipo) (Miguel y Marum 2011). Por su parte, el nivel de polimorfismo en OD, puede ser explicado por el tipo de explante (yemas florales en proliferación) los cuales consistieron en nuevas yemas que se originaron del tejido original (flor masculina inmadura). Este tipo de explantes se caracterizan por tener conexión vascular con el tejido original, lo cual le da competencia organogénica y de ser tejido meristemático altamente proliferativo en *Musa* (Pérez-Hernández y Rosell-García 2008). Una de las posibles fuentes de variación al usar tejidos meristemáticos es que estos se caracteriza por tener un mosaico en el número de cromosomas. Lo anterior debido a procesos de fragmentación nuclear seguido por mitosis, endoreduplicación da origen a distintos niveles de ploidía en tejidos meristemáticos. Este fenómeno se ha estudiado ampliamente en tabaco (Cionini *et al.* 1978). Por lo que el nivel de variación obtenido en la ESI-2 puede sugerirse por efecto del tipo de explante empleado y de los procesos involucrados para la adquisición de competencia celular para la expresión de la ES.

Los cebadores ISSR han sido utilizados ampliamente para evaluar fidelidad genética entre plantas regeneradas por cultivo de tejidos vegetales, mientras que los de SRAP e ITAP se han empleado en la determinación de la variación y relación genética entre accesiones de *Musa* (Xiong *et al.* 2013; Youssef *et al.* 2011a). Nuestros resultados sugieren que es deseable recurrir a la estrategia del uso de diferentes marcadores moleculares para abarcar diferentes regiones del genoma susceptibles a cambios durante el análisis de variación somaclonal.

Un estudio que esté dirigido a evaluar el nivel de polimorfismo en los puntos marcados con una cruz en la Figura 3.14, y el respectivo análisis citogenético permitirá determinar cuál de los factores antes enunciados, contribuyeron de manera significativa a la variación observada en las plantas regeneradas por OD, ESI-1 y ESI-2 del cv. Manzano, con el fin

de mejorar el proceso basado en el nivel de polimorfismo obtenido en cada etapa, ya sea que el objetivo sea buscar la mayor estabilidad posible, o bien, aprovechar la VS que resulte del CTV como herramienta biotecnológica para contribuir al mejoramiento genético del género *Musa*.

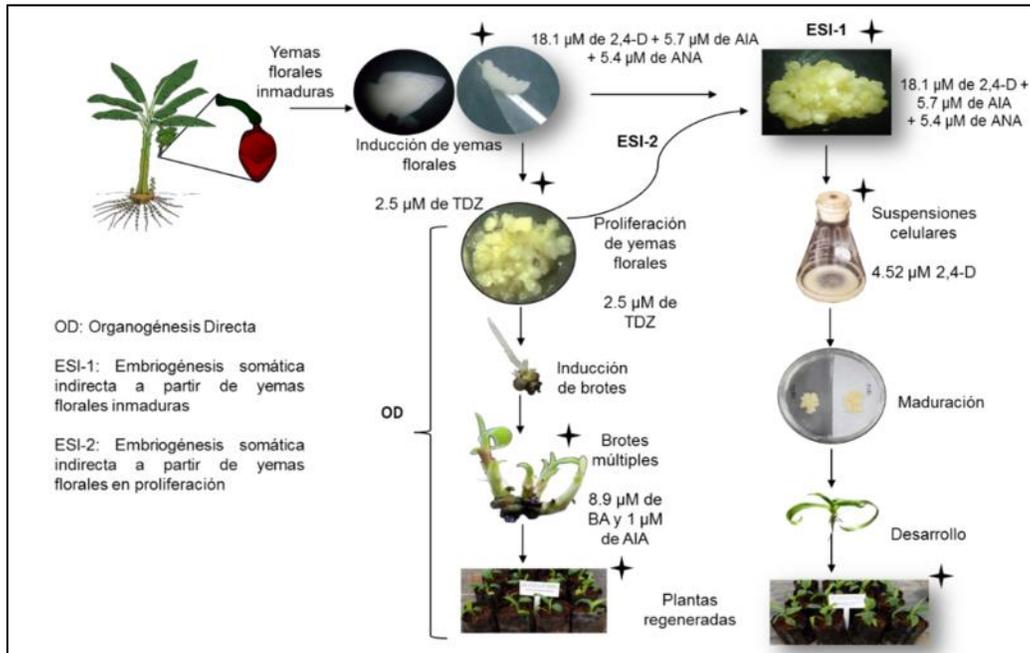


Figura 3.14 Esquema general seguido para la regeneración de plantas por OD, ESI-1 y ESI-2 del cv. Manzano (AAB), en el que se observan los principales factores que pudieron influenciar en el nivel de polimorfismo detectado con marcadores moleculares ISSR, SRAP e ITAP.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, E.U., T. Hayashi y S. Yazawa (2004). Auxins increase the occurrence of leaf-colour variants in *Caladium* regenerated from leaf explants. *Scientia Horticulturae*, 100, 153-159.
- Aremu, A.O., M.W. Bairu, L. Szucová, K. Dolezal, J.F. Finnie y J. Van Staden (2013). Genetic fidelity in tissue-cultured Williams bananas - The effect of high concentration of topolins and benzyladenine. *Scientia Horticulturae*, 161, 324-327.
- Bairu, M.W., C.W. Fennell y J. Van Staden (2006). The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in Cavendish banana (*Musa* AAA cv. Zelig). *Scientia Horticulturae*, 108, 347-351.
- Cionini, P.G., A. Bennici y F. D'Amato (1978). Nuclear cytology of callus induction and development *in vitro*. *Protoplasma*, 96, 101-112.
- Cullis, C.A. (2005). Mechanisms and control of rapid genomic changes in flax. *Annals of Botany*, 95, 201-206.
- D'Amato, F. (1977). Nuclear cytology in relation to development. CUP Archive p.
- Davey, M.W., R. Gudimella, J.A. Harikrishna, L.W. Sin, N. Khalid y J. Keulemans (2013). A draft *Musa balbisiana* genome sequence for molecular genetics in polyploid, inter- and intra-specific *Musa* hybrids. *BMC genomics*, 14, 683.
- Dellaporta, S.L., J. Wood y J.B. Hicks (1983). A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1, 19-21.
- Escobedo-GM, R.M., J.I. Maldonado-Borges, M.J. Burgos-Tan, N. Valadez-González y J.R. Ku-Cauich (2014). Using flow cytometry and cytological analyses to assess the genetic stability of somatic embryo-derived plantlets from embryogenic *Musa acuminata* Colla (AA) ssp. malaccensis cell suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 116, 175-185.
- Giménez, C., E. De García, N.X. De Enrech y I. Blanca (2001). Somaclonal variation in

- banana: cytogenetic and molecular characterization of the somaclonal variant Cien BTA-03. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 37, 217-222.
- Heslop-Harrison, J.S. y T. Schwarzacher (2007). Domestication, genomics and the future for banana. *Annals of Botany*, 100, 1073-1084.
- Hrahsel, L., A. Basu, L. Sahoo y R. Thangjam (2014). *In Vitro Propagation and Assessment of the Genetic Fidelity of Musa acuminata (AAA) cv. Vaibalhla Derived from Immature Male Flowers*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172, 1530-1539.
- Hribova, E., P. Neumann, T. Matsumoto, N. Roux, J. Macas y J. Dolezel (2010). Repetitive part of the banana (*Musa acuminata*) genome investigated by low-depth 454 sequencing. *BMC Plant Biology*, 10, 204-204.
- James, A.C., S. Peraza-Echeverria, V. Herrera-Valencia y O. Martinez (2004). Application of the amplified fragment length polymorphism (AFLP) and the methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) techniques for the detection of DNA polymorphisms and changes in DNA methylation in micropropagated bananas, *en: Banana Improvement: Cellular, Molecular Biology and Induced Mutations*, Jain, S.M. y R. Swennen, (eds.), Science Publishers, Inc., Enfield. pp.
- Krikorian, A.D., H. Irizarry, R. Goenaga, M.E. Scott y B.E.L. Lockhart (1999). Stability in plant and bunch traits of a "French-type" dwarf plantain micropropagated from the floral axis tip and five lateral corm tips of a single mother plant: Good news on the tissue culture and bad news on banana streak virus. *Scientia Horticulturae*, 81, 159-177.
- Lakshmanan, V., S.R. Venkataramareddy y B. Neelwarne (2007). Molecular analysis of genetic stability in long-term micropropagated shoots of banana using RAPD and ISSR markers. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10, 106-113.
- LoSchiavo, F., L. Pitto, G. Giuliano, G. Torti, V. Nuti-Ronchi, D. Marazziti, R. Vergara, S. Orselli y M. Terzi (1989). DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and

- hypomethylating drugs. *Theoretical and Applied Genetics*, 77, 325-331.
- Lu, Y., X. Zhang, J. Pu, Y. Qi y Y. Xie (2011). Molecular assessment of genetic identity and genetic stability in banana cultivars (*Musa* spp.) from China using ISSR markers. *Australian Journal of Crop Science*, 5, 25-31.
- Manjula, R., P. Jholgiker, K.V. Subbaiah, G. Prabhuling, G.S.K. Swamy y K.Y. Lenin (2014). Morphological abnormality among hardened shoots of banana cv. Rajapuri (AAB) after *in vitro* multiplication with TDZ and BAP from excised shoot tips. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*, 7, 465-470.
- Martin, K.P., S.K. Pachathundikandi, C.L. Zhang, A. Slater y J. Madassery (2006). RAPD analysis of a variant of banana (*Musa* sp.) cv. Grande Naine and its propagation via shoot tip culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 42, 188-192.
- Miguel, C. y L. Marum (2011). An epigenetic view of plant cells cultured *in vitro*: somaclonal variation and beyond. *Journal of Experimental Botany*, 62, 3713-3725.
- Mohamed, A.E. (2007). Morphological and molecular characterization of some banana micro-propagated variants. *International Journal of Agriculture & Biology*, 9, 707-714.
- Mohanty, S., M.K. Panda, E. Subudhi y S. Nayak (2008). Plant regeneration from callus culture of *Curcuma aromatica* and *in vitro* detection of somaclonal variation through cytophotometric analysis. *Biologia Plantarum*, 52, 783-786.
- Nelson, S.C., R.C. Ploetz y K.A. Kay (2006). *Musa* species (banana and plantain), Rep. No. 2.2. Species Profiles for Pacific Island Agroforestry. Permanent Agriculture Resources, Holualoa, Hawai'i, 33 p.
- Oh, T.J., M.A. Cullis, K. Kunert, I. Engelborghs, R. Swennen y C.A. Cullis (2007). Genomic changes associated with somaclonal variation in banana (*Musa* spp.). *Physiologia Plantarum*, 129, 766-774.

- Pérez-Hernández, J.B. y P. Rosell-García (2008). Inflorescence proliferation for somatic embryogenesis induction and suspension-derived plant regeneration from banana (*Musa* AAA, cv. Dwarf Cavendish) male flowers. *Plant Cell Reports*, 27, 965-971.
- Peschke, V.M. y R.L. Philips (1992). Genetic implications of somaclonal variation in plants. *Advances in genetics*, 30, 41-75.
- Prevost, A. y M.J. Wilkinson (1999). A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 98, 107-112.
- Ray, T., I. Dutta, P. Saha, S. Das y S.C. Roy (2006). Genetic stability of three economically important micropropagated banana (*Musa* spp.) cultivars of lower Indo-Gangetic plains, as assessed by RAPD and ISSR markers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 85, 11-21.
- Roldán-Ruiz, I., J. Dendauw, E. Van-Bockstaele, A. Depicker y M. De Loose (2000). AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). *Molecular Breeding*, 6, 125-134.
- Shchukin, A., D. Ben-Bassat y Y. Israeli (1997). Plant regeneration via somatic embryogenesis in Grand Nain banana and its effect on somaclonal variation. *Acta Horticulturae (ISHS)*, 447, 317-317.
- Sheidai, M., H. Aminpoor, Z. Noormohammadi y F. Farahani (2008). RAPD analysis of somaclonal variation in banana (*Musa acuminata* L.) cultivar Valery. *Acta Biologica Szegediensis*, 52, 307-3011.
- Stulnig, T.M. y A. Amberger (1994). Exposing contaminating phenol in nucleic acid preparations. *Biotechniques*, 16, 402-404.
- Venkatachalam, L., R.V. Sreedhar y N. Bhagyalakshmi (2008). The use of genetic markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and phylogenetic relationships among banana cultivars. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 47, 974-985.

- Vroh-Bi, I., C. Anagbogu, S. Nnadi y A. Tenkouano (2011). Genomic characterization of natural and somaclonal variations in bananas (*Musa* spp.). *Plant Molecular Biology Reporter*, 29, 440-448.
- Wang, Q.M. y L. Wang (2012). An evolutionary view of plant tissue culture: somaclonal variation and selection. *Plant Cell Reports*, 31, 1535-1547.
- Xiong, F., J. Liu, R. Zhong, J. Jiang, Z. Han, L. He, Z. Li, X. Tang y R. Tang (2013). Intron targeted amplified polymorphism (ITAP), a new sequence related amplified polymorphism-based technique for generating molecular markers in higher plant species. *Plant Omics*, 6, 128-134.
- Youssef, M., A.C. James, R. Rivera-Madrid, R. Ortiz y R.M. Escobedo-GM (2011a). *Musa* genetic diversity revealed by SRAP and AFLP. *Molecular Biotechnology*, 47, 189-199.
- Youssef, M., J.R. Ku-Cauich, A.C. James y R.M. Escobedo-GM (2011b). Genetic analysis of somatic embryogenesis derived plants in banana. *Assiut Journal of Agricultural Science*, 42, 287-300.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

4.1 CONCLUSIONES

Se cuenta con protocolos de regeneración *in vitro* por OD, ESI-1 y ESI-2 para el cv. Manzano. Mientras que para el cv. Enano Gigante se desarrollaron procedimientos por OD y ESI-2. Para ambos cultivares se inició de una sola planta madre.

El medio de cultivo que favoreció la inducción, mantenimiento y multiplicación de yemas florales de ambos cultivares fue el MS suplementado con 2.5 μM TDZ alternativamente se podría usar 5 μM TDZ para el cv. Manzano.

Durante la inducción de callo embriogénico a partir del explante inicial (flor masculina inmadura) se obtuvo un 34.3% en el cv. Manzano.

Con el uso de yemas florales en proliferación como explante para inducir la formación de callo embriogénico, la respuesta fue de 28.2 y 18.4% para el cv. Manzano y Enano Gigante, respectivamente.

En la proliferación de callo embriogénico tanto en medio semisólido como en suspensiones celulares, el cv. Manzano demostró mayor capacidad de proliferación con respecto al cv. Enano Gigante.

Se demostró que no es necesario el uso de RC en la etapa de maduración para el cv. Enano Gigante, ya que se obtuvo 62% de embriones maduros y 32% de germinación.

El tratamiento 9 (131 mM Sac/PF/3 g L⁻¹ Gl), promovió mayor la tasa de germinación de embriones somáticos de 46% en el cv. Enano Gigante.

La tasa de germinación de embriones somáticos del cv. Manzano fue del 80%.

Con el uso de yemas florales en proliferación como explante para inducir la formación brotes de forma directa en ambos cultivares se encontró respuesta de 4.4 y 6.6 brotes/explante para el cv. Manzano y Enano Gigante respectivamente.

El protocolo empleado para la extracción de ADN tanto de la planta madre, hijuelos de espada, agua y regenerantes *in vitro* fue altamente eficiente, lo que permitió en un primer paso optimizar las condiciones de PCR de los cebadores ISSR y la selección de cebadores.

El polimorfismo entre la planta madre, hijuelo de espada e hijuelo de agua del cv. Manzano revelado con marcadores ISSR, SRAP e ITAP fue de 32.6, 31.6 y 19.4%, respectivamente.

El polimorfismo entre la planta madre, hijuelo de espada e hijuelo de agua del cv. Enano Gigante revelado con marcadores ISSR, SRAP e ITAP fue de 28.6, 31.6 y 29.6%, respectivamente.

Se determinó la huella genética de la planta madre, hijuelo de espada, hijuelo de agua y regenerantes *in vitro* con marcadores ISSR, SRAP e ITAP del cv. Manzano y el cv. Enano Gigante.

Se seleccionaron cinco cebadores ISSR, tres combinaciones de SRAP y siete combinaciones ITAP altamente informativos para el análisis de variación somaclonal entre regenerantes *in vitro* del cv. Manzano.

El polimorfismo entre plantas regeneradas por OD del cv. Manzano fue de 36.4, 19.5, 13.7%, evaluado mediante marcadores ISSR, SRAP e ITAP, respectivamente.

El polimorfismo entre plantas regeneradas por ESI-1 del cv. Manzano fue de 22.9, 12.5 y 11.4% evaluado mediante marcadores ISSR, SRAP e ITAP, respectivamente.

El polimorfismo entre plantas regeneradas por ESI-2 del cv. Manzano fue de 54.2, 24.2 y 12.3% evaluado mediante marcadores ISSR, SRAP e ITAP, respectivamente.

4.2 PERSPECTIVAS

Realizar estudios encaminados a evaluar el efecto del medio de cultivo respecto a la proporción auxina/citocinina para incrementar la inducción de brotes al utilizar yemas florales en proliferación en ambos cultivares.

Realizar un estudio morfo-histológico del origen y proceso de formación de las yemas florales en proliferación.

Llevar a cabo experimentos que evalúen la densidad de inóculo (PVC) en las suspensiones celulares con el fin de optimizar los tiempos de subcultivo y mantenimiento de las líneas en ambos cultivares.

Evaluar la densidad de inóculo adecuado para el inicio del proceso de maduración, para incrementar la maduración y evitar competencia por espacio y nutrientes por parte de los embriones somáticos.

Evaluar la implementación de biorreactores en la fase de germinación de embriones somáticos como estrategia para el escalamiento de la propagación de *Musa* por ES.

Ampliar a otros cultivares el estudio con marcadores moleculares del nivel de variación entre la planta madre y los hijuelos de espada y de agua (variación natural).

Dar seguimiento en campo a las plantas regeneradas para determinar si existe correlación entre los diferentes resultados del estudio con marcadores moleculares.

ANEXOS

Cuadro A1 Medios de cultivo empleados para la regeneración *in vitro* vía OD de los cultivares Manzano y Enano Gigante.

Componentes	OD para cv. Manzano y Enano Gigante			
	Inducción de brotes (TDZ/2.5)	Proliferación de brotes (P)	Crecimiento de brotes (Cbr)	Enraizamiento de brotes (R)
Macroelementos	MS	MS	MS	MS
Microelementos	MS	MS	MS	MS
Vitaminas	MS	MS	MS	MS
KH ₂ PO ₄ (mM)	1.47	1.47	1.47	1.47
Reguladores				
AIA (μM)	1	1	1	
TDZ (μM)	2.5			
BA (μM)		8.9	1	
Suplementos				
Sacarosa (mM)	87.6	87.6	87.6	87.6
Gelrite (g L ⁻¹)	2	2	2	2
Luz/oscuridad (h)	0/24	16/8	16/8	16/8
Subcultivos (d)	30	30	30	30
Duración (d)	150	120	90	60
pH	5.7	5.7	5.8	5.8

ANEXOS

Cuadro A2 Medios de cultivo empleados para la regeneración *in vitro* vía ESI-1 del cv. Manzano.

Componentes	ESI-1 para cv. Manzano				
	Inducción y proliferación de callo embriogénico (MA1)	Suspensiones celulares (M2)	Maduración (Mmanz)	Germinación (Gmanz)	Crecimiento (Cr)
Macroelementos	MS	MS	MS	MS	MS
Microelementos	MS	MS	MS	MS	MS
Vitaminas	MS	MS	Morel y Wetmore*	MS	MS
KH ₂ PO ₄ (mM)	1.47		1.47	1.47	1.47
Biotina (µM)	4.1	4.1			
Reguladores					
2,4-D (µM)	18	4.52			
AIA (µM)	5.71				
ANA (µM)	5.4				
Suplementos					
Extracto de malta (mg L ⁻¹)	100	100			
Glutamina (µM)	680	680			
Sacarosa (mM)	87.6	87.6	131	87.6	87.6
Gelrite (g L ⁻¹)	2		3	3	2
Luz/oscuridad (h)	0/24	0/24	0/24	16/8	16/8
Subcultivo (d)	30	7	90	30	30
Duración (d)	90 d de inducción sin subcultivo y 210 d de proliferación con subcultivos	120	90	60	30
pH	5.7	5.3	5.8	5.8	5.8

*(Morel y Wetmore 1951)

Cuadro A3 Medios de cultivo empleados para la regeneración *in vitro* vía ESI-2 del cv. Manzano.

Componentes	ESI-2 para cv. Manzano					
	Inducción y mantenimiento de YF (TDZ/2.5)	Inducción y proliferación de CE (MA1)	Suspensiones celulares (M2)	Maduración (Mmanz)	Germinación (Gmanz)	Crecimiento (Cr)
Macroelementos	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Microelementos	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Vitaminas	MS	MS	MS	Morel y Wetmore*	MS	MS
KH ₂ PO ₄ (mM)	1.47	1.47		1.47	1.47	1.47
Biotina (μM)		4.1	4.1			
Reguladores						
2,4-D (μM)		18	4.52			
AIA (μM)	1	5.71				
ANA (μM)		5.4				
TDZ (μM)	2.5					
Suplementos						
Extracto de malta (mg L ⁻¹)		100	100			
Glutamina (μM)		680	680			
Sacarosa (mM)	87.6	87.6	87.6	131	87.6	87.6
Gelrite (g L ⁻¹)	2	2		3	3	2
Luz/oscuridad (h)	0/24	0/24	0/24	0/24	16/8	16/8
Subcultivos (d)	15-30	30	7	90	30	30
	30 d de inducción con subcultivos	60 d de inducción sin subcultivo y				
Duración (d)	cada 15 d y 90 d de mantenimiento con subcultivos cada 30 d	150 d de proliferación con subcultivos	90	90	60	30
pH	5.7	5.7	5.3	5.8	5.8	5.8

*(Morel y Wetmore 1951)

ANEXOS

Cuadro A4 Medios de cultivo empleados para la regeneración *in vitro* vía ESI-2 del cv. Enano Gigante.

ESI-2 para cv. Enano Gigante							
Componentes	Inducción y mantenimiento de YF (TDZ/2.5)	Inducción de CE (MA1)	Proliferación de CE (M1/45)	Suspensiones celulares (M2)	Maduración (Meg)	Germinación (Geg)	Crecimiento (Cr)
Macroelementos	MS	MS	50% MS	MS	MS	MS	MS
Microelementos	MS	MS	50% MS	MS	MS	MS	MS
Vitaminas	MS	MS	Morel y Wetmore*	MS	Morel y Wetmore*	MS	MS
KH ₂ PO ₄ (mM)	1.47	1.47	1.47		1.47	1.47	1.47
Biotina (µM)		4.1		4.1			
Reguladores							
2,4-D (µM)		18	4.52	4.52			
AIA (µM)	1	5.71				1.42	
ANA (µM)		5.4					
TDZ (µM)	2.5						
BA (µM)						1	
Suplementos							
Extracto de malta (mg L ⁻¹)		100		100			
Glutamina (µM)		680		680			
Sacarosa (mM)	87.6	87.6	131	87.6	131	87.6	87.6
Gelrite (g L ⁻¹)	2	2	2		3	3	2
Luz/oscuridad (h)	0/24	0/24	0/24	0/24	16/8	16/8	16/8
Subcultivos (d)	15	90	30	7	30	30	30
Duración (d)	30 d de inducción con subcultivos cada 15 d y 90 d de mantenimiento con subcultivos cada 30 d	90	210	90	60	30	30
pH	5.7	5.7	5.8	5.3	5.8	5.8	5.8

*(Morel y Wetmore 1951)

Cuadro A5 Proporción de absorbancia (nm) y concentración de ADN genómico de planta madre, HE y HA, de los cvs. Manzano y Enano Gigante.

Muestra	A260/A280	A260/A230	ADN (ng μL^{-1})
cv. Manzano (M)	1.81	1.91	154.6
cv. Manzano (HE)	1.82	1.82	79.8
cv. Manzano (HA)	1.73	1.79	119.5
cv. Enano Gigante (M)	1.64	1.96	132.9
cv. Enano Gigante (HE)	1.65	1.99	80.1
cv. Enano Gigante (HA)	1.67	2.04	63.1

Cuadro A6 Proporción de absorbancia (nm) y concentración de ADN genómico de regenerantes OD, ESI-1 y ESI-2 del cv. Manzano.

Muestra	OD			ESI-1			ESI-2		
	ADN (ng μL^{-1})	A260/A280	A260/A230	ADN (ng μL^{-1})	A260/A280	A260/A230	ADN (ng μL^{-1})	A260/A280	A260/A230
1	149	1.8	1.8	99	1.6	1.8	191	1.7	1.9
2	208	1.8	1.8	102	1.6	2.0	73	1.6	2.3
3	263	1.8	1.9	139	1.6	2.2	112	1.7	2.2
4	226	1.8	1.8	196	1.6	2.2	173	1.6	1.9
5	186	1.8	1.7	63	1.8	2.0	178	1.7	2.1
6	159	1.8	1.9	156	1.8	1.6	212	1.7	1.8
7	235	1.8	1.9	108	1.6	2.0	181	1.7	1.8
8	334	1.8	2.0	163	1.6	1.8	198	1.7	2.3
9	182	1.6	2.3	146	1.7	2.3	125	1.6	2.2
10	255	1.7	2.0	46	1.7	2.3	166	1.7	2.0
11	277	1.8	2.3	49	1.7	2.0	161	1.7	2.3
12	125	1.7	2.1	174	1.7	2.2	46	1.8	1.6
13	118	1.7	2.2	132	1.8	2.2	167	1.7	2.3
14	112	1.7	2.1	117	1.6	2.3	193	1.6	1.6
15	317	1.6	1.8	185	1.7	2.3	323	1.7	1.7
16	233	1.8	1.8	96	1.7	2.4	340	1.8	2.0
17	129	1.7	2.2	63	1.7	2.1	39	1.8	2.0
18	235	1.8	1.9	95	1.6	2.4	211	1.8	1.9
19	297	1.8	1.7	47	1.7	2.1	80	1.6	2.3
20	187	1.7	2.1	152	1.7	2.3	139	1.7	2.1
21	64	1.8	1.8	177	1.6	2.3	84	1.7	2.4
22	162	1.8	2.0	134	1.6	2.3	109	1.7	2.3
23	179	1.8	2.1	110	1.8	2.2	136	1.6	1.9
24	177	1.8	1.9	323	1.6	2.0	123	1.6	2.0
25	214	1.8	1.9	244	1.6	1.8	58	1.7	2.3

Cuadro A7 Matriz del coeficiente de similitud de Jaccard entre la planta madre (M), hijuelo de espada (HE) e hijuelo de agua (HA), calculado entre los cebadores ISSR, SRAP, ITAP y el conjunto de los tres marcadores de los cvs. Manzano y Enano Gigante.

cv. Manzano				cv. Enano Gigante			
ISSR							
	M AAB	HE AAB	HA AAB		M AAA	HE AAA	HA AAA
M AAB	1.00			M AAA	1.00		
HE AAB	0.88	1.00		HE AAA	0.85	1.00	
HA AAB	0.67	0.78	1.00	HA AAA	0.81	0.74	1.00
SRAP							
	M AAB	HE AAB	HA AAB		M AAA	HE AAA	HA AAA
M AAB	1.00			M AAA	1.00		
HE AAB	0.84	1.00		HE AAA	0.84	1.00	
HA AAB	0.74	0.76	1.00	HA AAA	0.75	0.76	1.00
ITAP							
	M AAB	HE AAB	HA AAB		M AAA	HE AAA	HA AAA
M AAB	1.00			M AAA	1.00		
HE AAB	0.88	1.00		HE AAA	0.82	1.00	
HA AAB	0.86	0.86	1.00	HA AAA	0.80	0.75	1.00
ISSR-SRAP-ITAP							
	M AAB	HE AAB	HA AAB		M AAA	HE AAA	HA AAA
M AAB	1.00			M AAA	1.00		
HE AAB	0.87	1.00		HE AAA	0.83	1.00	
HA AAB	0.79	0.82	1.00	HA AAA	0.79	0.75	1.00

Cuadro A8 Matriz del coeficiente de similitud de Jaccard entre plantas regeneradas por OD calculado entre los cebadores ISSR, SRAP, ITAP y el conjunto de los tres marcadores del cv. Manzano.

ISSR					
	OD1	OD2	OD3	OD4	OD5
OD1	1.00				
OD2	0.81	1.00			
OD3	0.79	0.98	1.00		
OD4	0.79	0.80	0.83	1.00	
OD5	0.78	0.65	0.67	0.77	1.00
SRAP					
	OD1	OD2	OD3	OD4	OD5
OD1	1.00				
OD2	0.95	1.00			
OD3	0.89	0.89	1.00		
OD4	0.95	0.89	0.94	1.00	
OD5	0.88	0.83	0.87	0.92	1.00
ITAP					
	OD1	OD2	OD3	OD4	OD5
OD1	1.00				
OD2	0.87	1.00			
OD3	0.95	0.90	1.00		
OD4	0.93	0.92	0.96	1.00	
OD5	0.94	0.93	0.95	0.99	1.00
ISSR-SRAP-ITAP					
	OD1	OD2	OD3	OD4	OD5
OD1	1.00				
OD2	0.87	1.00			
OD3	0.89	0.92	1.00		
OD4	0.89	0.89	0.92	1.00	
OD5	0.88	0.83	0.85	0.92	1.00

ANEXOS

Cuadro A9 Matriz del coeficiente de similitud de Jaccard entre plantas regeneradas por ESI-1 calculado entre los cebadores ISSR, SRAP, ITAP y el conjunto de los tres marcadores del cv. Manzano.

ISSR					
	ESI-1-1	ESI-1-2	ESI-1-3	ESI-1-4	ESI-1-5
ESI-1-1	1.00				
ESI-1-2	0.94	1.00			
ESI-1-3	0.96	0.98	1.00		
ESI-1-4	0.78	0.81	0.83	1.00	
ESI-1-5	0.89	0.92	0.94	0.88	1.00

SRAP					
	ESI-1-1	ESI-1-2	ESI-1-3	ESI-1-4	ESI-1-5
ESI-1-1	1.00				
ESI-1-2	0.94	1.00			
ESI-1-3	0.90	0.97	1.00		
ESI-1-4	0.87	0.87	0.90	1.00	
ESI-1-5	0.94	0.94	0.97	0.87	1.00

ITAP					
	ESI-1-1	ESI-1-2	ESI-1-3	ESI-1-4	ESI-1-5
ESI-1-1	1.00				
ESI-1-2	0.99	1.00			
ESI-1-3	0.94	0.95	1.00		
ESI-1-4	0.95	0.96	0.99	1.00	
ESI-1-5	0.88	0.89	0.92	0.93	1.00

ISSR-SRAP-ITAP					
	ESI-1-1	ESI-1-2	ESI-1-3	ESI-1-4	ESI-1-5
ESI-1-1	1.00				
ESI-1-2	0.96	1.00			
ESI-1-3	0.94	0.96	1.00		
ESI-1-4	0.89	0.89	0.92	1.00	
ESI-1-5	0.89	0.91	0.93	0.91	1.00

Cuadro A10 Matriz del coeficiente de similitud de Jaccard entre plantas regeneradas por ESI-2 calculado entre los cebadores ISSR, SRAP, ITAP y el conjunto de los tres marcadores del cv. Manzano.

ISSR					
	ESI-2-1	ESI-2-2	ESI-2-3	ESI-2-4	ESI-2-5
ESI-2-1	1.00				
ESI-2-2	7.65E-01	1.00			
ESI-2-3	7.30E-01	8.18E-01	1.00		
ESI-2-4	6.82E-01	6.28E-01	6.82E-01	1.00	
ESI-2-5	6.39E-01	7.19E-01	7.35E-01	5.68E-01	1.00
SRAP					
	ESI-2-1	ESI-2-2	ESI-2-3	ESI-2-4	ESI-2-5
ESI-2-1	1.00				
ESI-2-2	0.89	1.00			
ESI-2-3	0.87	0.97	1.00		
ESI-2-4	0.84	0.87	0.91	1.00	
ESI-2-5	0.93	0.83	0.81	0.79	1.00
ITAP					
	ESI-2-1	ESI-2-2	ESI-2-3	ESI-2-4	ESI-2-5
ESI-2-1	1.00				
ESI-2-2	0.99	1.00			
ESI-2-3	0.99	1.00	1.00		
ESI-2-4	0.94	0.93	0.93	1.00	
ESI-2-5	0.93	0.95	0.95	0.88	1.00
ISSR-SRAP-ITAP					
	ESI-2-1	ESI-2-2	ESI-2-3	ESI-2-4	ESI-2-5
ESI-2-1	1.00				
ESI-2-2	0.91	1.00			
ESI-2-3	0.89	0.95	1.00		
ESI-2-4	0.85	0.83	0.85	1.00	
ESI-2-5	0.86	0.87	0.86	0.77	1.00

A1 Protocolo de extracción de ADN de Musa basado en Dellaporta et al. (1983)

1. Se maceró 100 mg de tejido vegetal usando nitrógeno líquido.
2. El polvo se puso en un tubo de 2 mL y se le adicionó 1 mL del buffer de extracción (previamente calentado a 65 °C durante 15 min) y 100 µL de SDS (20%) a cada muestra y se colocó en hielo.
3. Se incubó en baño de agua maría a 65 °C durante 30 min (con inversión cada 5 min) y se dejó que las muestras alcanzaran temperatura ambiente.
4. Se adicionó 550 µL de acetato de potasio 5 M (pH = 8), se incubó en hielo por 30 min, terminado el tiempo se dejó que las muestras alcanzaran temperatura ambiente.
5. Se centrifugó a 13000 rpm (16060 g) durante 30 min a 10°C.
6. Se tomó el sobrenadante a un nuevo tubo y se centrifugó nuevamente, cuando el sobrenadante se observó turbio se centrifugó una vez más (13000 rpm por 20 min a 10°C) y se tomaron 1400 µL y se dividieron en dos tubos de 1.5 mL con 700 µL de sobrenadante cada uno.
7. Se adicionó 5 µL de RNasa (10 mg mL⁻¹) y se agitó suavemente por inversión y se incubó a 37 °C durante 1 h.
8. Se adicionó un volumen igual de isopropanol frío (700 µL) se incubó a -20 °C durante 1h.
9. Se centrifugó a 13000 rpm durante 20 min a 4 °C.
10. Se removió el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol al 70% (v/v) por dos ocasiones (500 µL, 10000 rpm por 5 durante a 4 °C).
11. Se dejó secar completamente la pastilla sobre la mesa.
12. La pastilla se disolvió en 600 µL de TE en baño maría a 45 °C por 12 h (300 µL por tubo).
13. Se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min a 10 °C.
14. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo (600 µL provenientes de 300 µL de cada tubo). Se adicionó un volumen igual de isopropanol frío (600 µL) con una relación 1/10 del volumen de acetato de sodio (60 µL) (3 M, pH = 5.2) y el tubo se agitó por inversión suavemente.
15. El tubo se incubó a -20 °C durante 1 h. Se centrifugó a 13000 rpm durante 15 min a 4 °C.

16. El sobrenadante se removió y la pastilla se lavó con etanol al 70% por dos ocasiones (500 μ L a 12000 rpm durante 5 min a 4 °C).
17. La pastilla se dejó secar completamente en la mesa.
18. Finalmente la pastilla se re-suspendió en 50 μ L de agua de Pisa y se dejó en baño maría a 45 °C, hasta disolver la pastilla (aproximadamente 24 h).

Buffer de extracción

1 mL Tris-HCl 1M pH 8.0
1 mL EDTA 0.5M pH 8.0
3 mL de NaCl 5M
100 mg polientilenglicol (PEG-8000)
50 mg Na₂S₂O₅

Aforar a 10 mL con agua bi-destilada esterilizada.

Buffer TE

100 μ L de Tris-HCl 1M pH 8.0
20 μ L de EDTA 0.5M pH 8.0

Aforar a 10 mL con agua bi-destilada esterilizada.

Preparación de NaCl 5M

Disolver 14.61 g de NaCl en 30 mL de agua bi-destilada, agitar y aforar a 50 mL con agua bi-destilada, esterilizar en autoclave a 120°C durante 20 min. Almacenar a temperatura ambiente.

Preparación de SDS 20%

Disolver 10 g de SDS en 40 mL de agua bi-destilada esterilizada, calentar la solución a 50°C, agitar y aforar a 50 mL con agua bi-destilada esterilizada. Distribuir en alícuotas de 25 mL y almacenar a temperatura ambiente.

Preparación de acetato de sodio 3 M

Disolver 12.31 g de acetato de sodio en 35 mL de agua bi-destilada esterilizada, ajustar el pH a 5.2 con ácido acético glacial, aforar a 50 mL, filtrar, esterilizar en autoclave a 120 °C durante 20 min y almacenar a temperatura ambiente.

Preparación de acetato de potasio 5M

Disolver 24.54 g de acetato de potasio en 35 mL de agua bi-destilada esterilizada, aforar a 50 mL, filtrar, esterilizar en autoclave a 120 °C y almacenar a 4 °C.

Preparación de Tris-HCl 1M

Disolver 6.06 g de Trisma-Base en 40 mL de agua bi-destilada esterilizada, ajustar el pH a 8.0 con HCl (50% v/v), aforar a 50 mL, esterilizar en autoclave a 120 °C y almacenar a temperatura ambiente.

Preparación de EDTA 0.5M

Disolver 9.31 g de EDTA-2H₂O en 40 mL de agua bi-destilada esterilizada (mantener en agitación) adicionar perlas de NaOH (aproximadamente 1 g) para ajustar el pH a 8.0, aforar a 50 mL, esterilizar en autoclave a 120 °C y almacenar a temperatura ambiente.

BIBLIOGRAFÍA

Dellaporta, S.L., J. Wood y J.B. Hicks (1983). A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1, 19-21.

Morel, G. y R.H. Wetmore (1951). Tissue culture of monocotyledons. *American Journal of Botany*, 38, 138-140.