



### Patrocinadores













ISBN: 978-607-95228-2-7

Editado por: Centro de Investigaciones en Óptica, A. C. Loma del Bosque 115 Col. Lomas del Campestre León, Gto.

Dra, Amalia Martinez Garcia Dra, Cristina E. Solano Sosa Dra, Ma, Eugenia Sánchez Dra, Gloria Verónica Vázquez



CENTRO DE INVESTIGACIONES EN OPTICA, A.C.



### S2-BCA33 PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE POLÍMEROS VEGETALES.

Canale-Guerrero, A1., Landeros-Vidrio, I.A.2 , Reyna-Villela M.Z.2 , Rojas-Bravo, D.2

 Departamento de Salud Pública. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara. Carretera Guadalajara-Nogales, Km 15.5. Las Agujas, Nextipac. C.P. 45110. Zapopan, Jal., México. acquero@yahoo.com.mx

2. Depto. de Ciencias Básicas. CUCiénega. Universidad de Guadalajara. Av. Universidad 1115, Col. Linda Vista. C.P. 47810. Ocotlán, Jal. México.

# S2-BCA34 REGENERACIÓN DE PLANTAS DE *CARICA PAPAYA* VAR. MARADOL A TRAVÉS DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA Y EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD GENÉTICA

Li-Wei Lin<sup>a</sup>, B. Rodríguez Garay<sup>b</sup>, E. Tapia-Campos<sup>b</sup>, A. Gutiérrez-Mora<sup>b</sup>, <sup>a</sup>Estudiante del posgrado del PICYT, <sup>b</sup> Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

# S2-BCA35 IDENTIFICACIÓN DE LAS PRINCIPALES PLAGAS Y ENFERMEDADES DEL RAMBUTÁN (NEPHELIUN LAPPACEUM) EN VERACRUZ, MÉXICO

Ángel Capetillo¹, A. Rebolledo M., A. Del Ángel Pérez¹, Juan V. Megchún¹, J Nataren V¹, L Rebolledo M¹ y B. C. Linares B¹. Investigadores del INIFAP-Campo Experimental Cotaxtla. Km. 34.5 Carretera Federal Veracruz-Córdoba, CP. 91700. Veracruz, México. Teléfono (01-285) 59-60-106 al 109. E-mail: <a href="mailto:capetillo.angel@inifap.gob.mx">capetillo.angel@inifap.gob.mx</a>; <a href="mailto:rebolledo.andrés@inifap.gob.mx">rebolledo.andrés@inifap.gob.mx</a>;

#### BIOLOGÍA Y QUÍMICA

# S2-BYQ01 EFECTO ELECTROCATALÍTICO DE NANOPARTICULAS METALICAS Y BIMETALICAS EN LA OXIDACION DE ACIDO OXALICO Y ACIDO FORMICO

D. Flores-Salgado, A. Mercado-Alfian, E. Torres-Santillan, L. A. Estudillo-Wong, A. Manzo-Robledo, Lab. de Electroquímica y Corrosión. ESIQIE-IPN, México D.F

### S2-BYQ02 ESTIMACIÓN DE LA RELACIÓN DE DIASTEROISÓMEROS DE NUCLEÓSIDOS POR CLAR Y RMN 'H: UN ESTUDIO COMPARATIVO

Omar E. Valencia L\*., Rubria Marlen Martinez C\*., Herminia I. Pérez M., Norberto Manjarrez A., Aida Solis O. Departamento Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. e-mail:maan@correo.xoc.uam.mx.

## S2-BYQ03 MICRONUCLEOGENICIDAD DEL EXTRACTO TOTAL DE ROMERO (ROSMARINUS OFFICINALES) EN SANGRE PERIFÉRICA DE RATÓN

<sup>1</sup>Gabriela Morales Velazquez, <sup>1</sup>Ana L. Zamora Pérez, <sup>2</sup>Blanca P. Lazalde Ramos, <sup>1</sup>Rocio P Mariaud Schmidt, <sup>1</sup>Celia Guerrero Velázquez, <sup>3</sup>Belinda C Gómez Meda, <sup>4</sup>Guillermo Zúñiga González.

Instituto de Investigación en Odontología, CUCS, U de G, Guadalajara, Jalisco, México, <sup>2</sup>Unidad Académica de Medicina Humana, UAZ, Zacatecas, Zacatecas, México, <sup>3</sup>Instituto de Biología Molecular en Medicina, CUCS, U de G, Guadalajara, Jalisco, México, <sup>4</sup>Laboratorio de Mutagénesis, CIBO, IMSS, Guadalajara, Jalisco, México. Email: <a href="mailto:anazamora@qmail.com">anazamora@qmail.com</a>

#### S2-BYQ04 ALOMETRÍA TEGUMENTARIA DE LA RATA WISTAR

Marina Dorantes Velasco, Arturo Reyes Lazalde, Maria Eugenia Pérez Bonilla

Escuela de Biología. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. maruca\_dv@hotmail.com, arreyes@siu.buap.mx, euperez@siu.buap.mx

#### S2-BYQ05 PROTECCIÓN DEL DAÑO RENAL POR PLOMO

<sup>a</sup>Leticia Navarro, <sup>a</sup>Aurelio Ramírez, <sup>b</sup>José Luis Reyes, <sup>a</sup>Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec, <sup>b</sup>Departamento de Fisiología CINVESTAV-IPN e-mail: <u>Lgnavarrom@hotmail.com</u>.

### S2-BYQ06 EXTRACCIÓN DE ACEITE DE SALVADO DE ARROZ TIPO MORELOS

Maria Patricia Dominguez Echeverria. Gabriela Ramírez Becerrii.

Departamento de Sistemas Biológicos.

<sup>a</sup>Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, Calzada del Hueso No.1100, Col. Villa Quietud, C.P. 06970. Facultad de Quimica, U.N.A.M.

Correo electrónico: mpdomin@correo.xoc.uam.mx

# REGENERACIÓN DE PLANTAS DE *Carica papaya* VAR. MARADOL A TRAVÉS DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA Y EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD GENÉTICA.

Li-Wei Lin<sup>a</sup>, B. Rodríguez Garay<sup>b</sup>, E. Tapia-Campos<sup>b</sup>, A. Gutiérrez-Mora<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Estudiante del posgrado del PICYT. cinramlin@hotmail.com

<sup>b</sup> Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. aqutierrez@ciatej.net.mx

### RESUMEN

La papaya es uno de los principales cultivos en los trópicos, además del consumo en fresco es una fuente de enzimas utilizadas en la industria farmacéutica y alimenticia. Se han desarrollado algunas variedades de *Carica papaya*, sin embargo, la que más se consume a nivel mundial es la variedad Maradol.

La producción de plantas de papaya es a través de semillas, no obstante, existen métodos de propagación *in vitro* mediante los cuales se pueden producir plantas de forma masiva. El método de embriogénesis somática indirecta es caracterizado por la gran capacidad en la regeneración de plantas, sin embargo, el uso de reguladores de crecimiento utilizados en el proceso de obtención de los embriones puede provocar variación somaclonal.

El presente trabajo tiene como objetivo regenerar plantas de *Carica papaya* var. Maradol utilizando la técnica de embriogénesis somática indirecta y posteriormente realizar la caracterización molecular para evaluar la posible existencia de una variación somaclonal.

#### 1. INTRODUCCIÓN

La embriogénesis somática es un proceso por el cual se produce una estructura bipolar (embrión) a partir de una célula no sexual. En la actualidad es aplicado en más de 60 familias, como: Crucíferas, Cucurbitáceas, Gramíneas, Rosáceas, Leguminosas, Palmáceas, etc. La embriogénesis somática (ES) se debe a la totipotencia de las células, la cual es una característica que teóricamente tienen todas las células vegetales para desarrollar nuevos individuos a partir de la planta de procedencia (1, 2).

Como una herramienta de propagación, la embriogénesis somática tiene la ventaja de que se puede llevar a cabo a partir de individuos seleccionados, en poco espacio y tiempo, se puede obtener una gran cantidad de embriones. Existen dos tipos de embriogénesis somática, directa que consiste en la formación de embriones desde los explantes, este método presenta limitación en cantidades de embriones producidos; e indirecta, la cual en la primera fase se induce a la formación de callo y posteriormente la formación de embriones somáticos. En diferentes trabajos realizados se ha propuesto el uso de diferentes tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento que favorecen la regeneración de papaya a través de embriogénesis somática, en la mayoría de los protocolos se utiliza el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) para la inducción de de callo embriogénico (3, 4, 5); también se ha reportado el uso de otros compuestos para la producción de embriones somáticos: ácido bórico como micronutriente (6); floridzin en medio de germinación evitar la vitrificación de la raíz (5).

Las plantas que se originan de un algún tipo de cultivo de tejido vegetal son llamadas somaclones. La variación genética que se presenta entre los somaclones es llamada variación somaclonal (1) y está relacionada con el uso de reguladores de crecimiento, la variabilidad y el tiempo de los cultivos, el nivel de ploidía, fuente de explantes y otras condiciones. (7).

La técnica de Polimorfismo en la Longitud de Fragmento Amplificado (AFLP) es reconocida como un sistema de marcador de ADN eficiente y confiable en comparación con (poner el nombre completo de RAPD y RFLP) la Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico (RAPD), Polimorfismo de Longitud de Fragmento de Restricción (RFLP) y microsatélites. (8). Con los AFLP, los fragmentos de ADN son amplificados usando cebadores específicos como adaptadores, los cuales son ligados a esos fragmentos. Además, el análisis AFLP es relativamente fácil de ejecutar, es altamente reproducible y utiliza cantidades pequeñas de ADN.

### 2. PARTE EXPERIMENTAL

Las semillas de *Carica papaya* var. Maradol fueron extraídas del fruto, mismas que fueron desinfectadas de la siguiente manera: se realizó un lavado con detergente y tres enjuagues con agua corriente. Posteriormente, en campana de flujo laminar horizontal se sumergieron en solución de hipoclorito de sodio (Solución comercial Cloralex®) a una concentración de 50% durante 20 minutos; después se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril. Una vez desinfectadas las semillas se extrajeron los embriones cigóticos y se cultivaron en el medio de cultivo descrito por Gutiérrez-Mora (9) y Ascencio-Cabral (5) para la inducción de la embriogénesis somática (Medio M1). El medio está compuesto de la mitad de la concentración de los elementos mayores y menores del medio MS, vitaminas descritas por Chen (10) (0.5 mg/l tiamina; 1.0 mg/l piridoxina; 5.0 mg/l ácido nicotínico; 2.0 mg/l glicina; 1.0 mg/l hidrolizado de caseína; 100 mg/l myo-inositol), 100 mg/l de glutamina, 40 g/l de sacarosa, 2.0 g/l de Phytagel® y 2.0 mg/l de 2,4-D, el pH se ajustó a 5.7. Se incubaron a 27 ± 2°C durante un mes, con fotoperiodo de 16 hrs luz-8 hrs oscuridad y una intensidad luminosa de 1300 luxes.

Los callos formados se resembraron en el medio M2 (M1 con reguladores modificados 0.02 mg/l de 2,4-D y 0.2 mg/l de cinetina), incubados por un mes en las mismas condiciones de incubación. Posteriormente se resembraron en el medio M3 (M2 con la adición de ácido abscísico 0.2 mg/l).

Para la germinación de los embriones se utilizó el medio MG donde contenían la mitad de la concentración de los elementos mayores y menores del medio MS, vitaminas descritas por Chen et al. (1987) (0.5 mg/l tiamina; 1.0 mg/l piridoxina; 5.0 mg/l ácido nicotínico; 2.0 mg/l glicina; 1.0 mg/l hidrolizado de caseína; 100 mg/l myo-inositol), 100 mg/l de glutamina, 40 g/l de sacarosa, agar (Difco®) 7.5 g/l. Con la adición de Floridzin 3mg/l y 0.35mg/l de GA3. Posteriormente, los embriones germinados se trasplantaron al medio de crecimiento (MC), que fue el MG, sin GA<sub>3</sub> y con la adición de 3.0 g/l de carbón activado.

De plantas de 3 cm. de altura se ADN, y el proceso fue realizado de acuerdo con el Genomic DNA Miniprep Kit de Gen Elute TM Plant. El análisis mediante AFLP se realizó de acuerdo con el protocolo propuesto por Vos (8), con algunas modificaciones. Se cortaron alrededor de 250 ng de ADN geonómico con dos enzimas de restricción, una rara cortadora Tru 91 (2.5 U) y una frecuente cortadora EcoRI (2.5 U), en un volumen final de 25 µL por 3 h a 37 °C. El ADN cortado se ligo por 5 h a temperatura ambiente adicionando 25 µL de la mezcla de ligación que contenía 1 U de T4 DNA ligasa (Invitrogen) y 1 µL de cada adaptador EcoRI y Msel previamente alineados. El producto de la ligación se diluyo 1:10 con TE (10 mM Tris-HCL pH 8.0, 0.1 mM EDTA).

La amplificación selectiva se efectuó usando el ADN ligado y usando iniciadores complementarios a los adaptadores pero con una banda selectiva +1 (*Mse* + C y *Eco* + A). Las condiciones de amplificación fueron: una desnaturalización inicial de 94 °C 1 min, 65 °C 1 min, 72 °C 1 min y una extensión final de 5 min a 72 °C. El producto de la preamplificación se diluyo 1:6 para usarse en la amplificación selectiva usando iniciadores complementarios a los adaptadores pero ahora con 3 bases selectivas (*Msel* + 3 y *Eco*RI + 3), en esta fase se probaron 3 combinaciones de iniciadores +3. El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial de 94 °C 2 min y 13 ciclos de 94 °C por 1 min, 65 °C a 56 °C por 1 min (disminuyendo 0.7 °C cada ciclo) y 72 °C por 1 min; finalmente 26 ciclos de 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 60 s. Todas las amplificaciones se desarrollaron en un termociclador Techne (modelo TC-412).

Los productos de PCR generados a partir de la amplificación selectiva para cada combinación se mezclaron con 8  $\mu$ L de búfer de carga (98% formamida, 10 mM EDTA, 0.05% Xylene cyanol, 0.05% azul de Bromophenol), desnaturalizados 3 min a 90 °C, y colocados en hielo, y los fragmento se separaron en geles de acrilamida al 6 % en una cámara de secuenciación (Sequi-Gen® GT Nucleic Acid Electrophoresis Cell), cargando 5  $\mu$ L de la muestra por pozo, usando 1X búfer TBE, a 50 Watts por 2 horas. Después de este tiempo los cristales de la cámara se separaron y los fragmentos se visualizaron por tinción con nitrato de plata usando el procedimiento descrito por Bassam y Caetano-Anolles (11).

Las bandas observadas para cada combinación de iniciadores AFLP se codificaron asignando el valor de 1 a la presencia de una banda dada y 0 a su ausencia; formando así, una matriz de ceros y unos la cuál se utilizó para realizar los análisis correspondientes. El análisis se realizó mediante el uso del paquete computacional Sistema de Análisis Multivariado y Taxonomía Numérica (NTSYS-pc), versión 2.1, en el cual se realizaron los cálculos de similitud entre los ejemplares con el programa de Similitud para datos cualitativos (SIMCUAL), posterior a esto se construyó un

dendrograma por el método secuencial aglomerativo jerárquico y de agrupamiento de anidamientos (SAHN Sequential, Aglomerative, Hierarchical and Nested clustering method). Se estimó el coeficiente de correlación cofenética para determinar la veracidad del arreglo de los agrupamientos entre las matrices de similaridad y cofenética (12).

#### 3. CONCLUSIONES

Con la metodología descrita anteriormente se obtuvo primero callo embriogénico como resultado de la inducción después de un mes, posteriormente la formación de embriones somáticos. Una vez que el embrión fue sembrado en medio de germinación tardó 21 días para crecer hasta un tamaño alrededor de 2 cm. Se transplantó en medio de crecimiento durante 20 días para obtener planta más desarrollada y lista para pasar in vivo. La planta fue cultivado por más de mes y medio para tener suficiente accesión para realizar extracción de ADN (figura 1). Fueron seleccionados en forma aleatoria para analizar la estabilidad genética utilizando la técnica de AFLP.

Con las tres combinaciones de iniciadores evaluadas se generaron 160 fragmentos de los cuales 56 fueron polimórficos, representando un 35% de polimorfismo. La combinación de *Eco*+ ACG – *Mse*+CTG presentó el mayor número de polimorfismo, 30 de los 54 fragmentos totales (56%). El número de bandas obtenido corresponde a lo mencionado por Vos (8), quienes reportan que con una sola combinación de iniciadores selectivos es posible obtener de 50 a 100 fragmentos. Por su parte Kim (13), usando AFLP reportan máximo 36 fragmentos polimorfismos en una combinación de iniciadores. La similaridad entre pares de individuos presentó los valores más bajos entre las plantas 2 y 9 (0.75 de similaridad); mientras que, el valor más alto lo tuvieron las plantas 4 y 5 (0.98). la similaridad promedio entre todos los individuos fue de 86.3%(en matriz de similitud no presentado).

Estos valores de similaridad están de acuerdo a los encontradas en plantas de papaya maradol provenientes de semilla por Kim (13), quienes reportan valores de similaridad máxima similitud entre *C. pubescence* y *C. stipulata* con 87% y mínima similitud entre *C. papaya* y *C. gourdatiana* con 36.4% que sugieren una alta variación dentro de esta variedad. La variación obtenida en sistemas de embriogénesis somática *in vitro* ha sido documentada por otros autores como el Peyvandi (14) en *Olea europaea L "cv. Kroneiki*"., quienes analizaron la variación somaclonal en plantas regeneradas a partir este sistema de propagación, encontrando valores de similaridad de 69-73% de plantas regeneradas por embriogénesis somática respecto a sus plantas madre. Similar a lo reportado previamente por Medina (15), quienes reportan valores de similitud genética de 76-93% en plantas de de *Hevea brasilensis* obtenidas por ES. Los resultados obtenidos en el presente trabajo se pueden deber a la variación generada por el sistema de propagación empleado y por otro lado a que todas las plantas analizadas hasta el momento provinieron de semillas diferentes, que concuerda con la variación reportada por Kim (13), en la variedad maradol.

Con el análisis de agrupamiento realizado a partir de la matriz de similaridad se obtuvo el dendrograma que se presenta en la figura 2. De acuerdo a los niveles de similaridas y polimorfismo mencionados, existen materiales que se separan claramente, como el caso de la planta 9, que fue la que presento los niveles de similaridad menores entre todos los individuos analizados. Por otro lado debido a que no existió ningún individuo que presentara un patrón de bandas idéntico a otro los individuos que se relacionaron más en dendrograma fueron los plantas 3 con 8 y 4 con 5, con coeficientes de similaridad de 0.95 y 0.98 respectivamente.

Del presente trabajo se reconoce que el sistema embriogénesis somatica en papaya variedad maradol es eficiente para la regeneración de plantas por esta via y que con el uso de marcadores AFLP es posible detectar la variación genética en la misma; sin embargo, es necesario la evaluación de un mayor número de individuos regenerados a partir de una sola línea embriogénica para confirmar si los polimorfimos encontrados se deben a la existencia de variación somaclonal producto de la ES o a la variabilidad genética original de la esta especie.

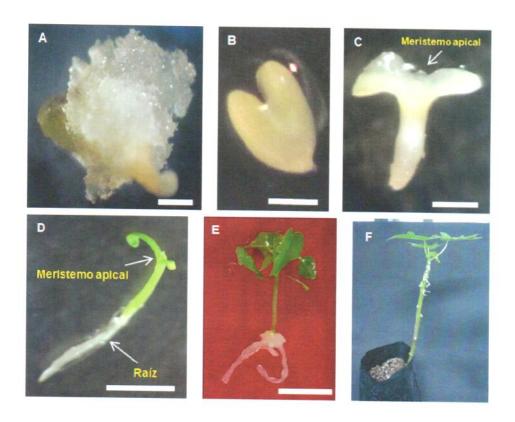


Figura 1. Regeneración de *Carica papaya* var. Maradol por embriogénesis somática. A) Formación de callo embriogénico. Barra= 0.5cm, B) embrión somático en estado de torpedo, barra= 0.5 mm, C) embrión somático maduro en medio 3, barra = 1mm, D) planta germinada en medio de germinación, barra= 0.5cm, E) planta desarrollada en medio de crecimiento, barra= 1cm, F) planta en el invernadero.

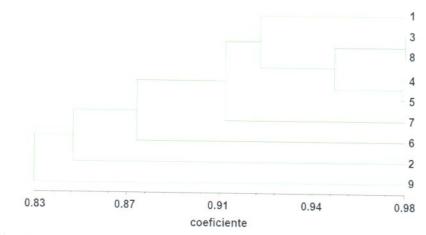


Figura 2. Dendograma de agrupamiento (UPGMA), de individuos de papaya Maradol generados a partir de embryogenesis somatic usando marcadores AFLP (coeficiente Jaccard)..

#### BIBLIOGRAFÍA

- 1. E. F. George, Plant propagation by tissue culture.. Ed. Exegetics. Part 1. 1993, pp. 574.
- 2. J.M. Lackie, J. A. T. Dow. The dictionary of cell biology. Ed. Academic Press, 1989, pp 388.
- S. Monmarson, N. Michaux-Ferriere, C. Teisson, Cals embryogenes haute frecuence issues de plantules de semis chez *Carica papaya* L.: Obtention et germination des embryons somatiques. Fruits Vol. 49, 1995, pp. 279-288.
- J. L. Cabrera-Ponce, L. Vega-Gracia, L. Herrera-Estrella. Herbicidal resistant transgenic papaya plants produced by an efficient particle bombardment transformation method. Plant Cell Rep. Vol. 15, 1995, pp. 1-7.
- A. Ascencio-Cabral, B. Rodríguez-Garay, H. Gutiérrez-Pulido, A. Gutiérrez-Mora. Plant regeneration of *Carica papaya* through somatic embryogenesis in response to light quality, gelling agent and phloridzin. Sci. Hort. Vol. 118, 2008, pp. 155-160.
- N. Renukdas, M.L. Mohan, S.S. Khuspe, S.K. Rawal, Influence of boron on somatic embryogenesis in papaya. Biol. Plant. Vol. 47, 2003, pp. 129-132.
- 7. R.M. Skirvin, K.D. McPheeters, M. Norton. Sources and frequency of somaclonal variation. Hort. Sci., Vol. 29, 1994, pp. 1232-1237.
- 8. P. Vos, R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and M. Zabeau. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. Vol. 23, 1995, pp. 4407-4414.
- A. Gutiérrez-Mora. Micropropagación y mejoramiento genético de papaya (Carica papaya L.).
  Tesis Doctorado. 2002. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías. Universidad de Guadalajara. México.
- M.H. Chen, P.J. Wang, E. Maeda. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Carica papaya* L. tissue culture derived from root explants. Plant Cell Rep. Vol. 6, 1987, pp. 348-351.
- B.J. Bassam, G. Caetano-Anolles. Silver Staining of DNA in polyacrylamide gels. Appl. Biochem Biotech Vol. 42 1993, pp. 181-188.
- F.J. Rohlf. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 2.1 Exceter Sofware, New York U.S.A. 2000.
- M.S. Kim, P.H. Moore, F. Zee, M.M.M. Fitch, D.L. Steiger, R.M. Manshardt, R.E. Paull, R.A. Drew, T. Sekioka, y R. Ming. Genetic diversity of *Carica papaya* as revealed by AFLP markers. Genome.Vol. 45, 2002. pp. 503-512.
- M. Peyvandi, H. Nemat Farahzadi, S. Arbabian, Z. Noormohammadi, and M. Hosseini-Mazinani. Somaclonal variation among Somatic-Embryo derived plants of *Olea europaea* L "cv. Kroneiki" Islamic Republic of Iran. J. Sci., Vol. 21, 1, 2010, pp. 7-14.
- C. Medina, I. García, M. Caro, F. A. Aristizábal, Análisis AFLP de variación somaclonal en embriones somáticos de *Hevea brasiliensis*. Rev. Col. Ciencia. Quím. Farm. Vol.36, 1, 2007, pp. 70-80.