



**UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL**

**FACULTAD DE EDUCACIÓN TÉCNICA
PARA EL DESARROLLO**

**CARRERA DE:
INGENIERÍA AGROPECUARIA**

TÍTULO:

Ploidía de mutantes de banano (*Musa acuminata* AAA) tratados con rayos gamma y etilmetanosulfonato, mediante citometría de flujo.

AUTOR:

Díaz Cárdenas Byron Jesús

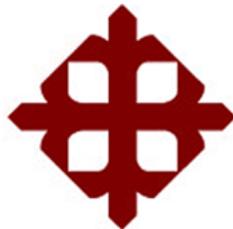
Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:

INGENIERO AGROPECUARIO
con mención en Gestión Empresarial Agropecuaria.

TUTOR:

Guamán Jiménez Ricardo Wilfrido

**Guayaquil, Ecuador
2015**



**UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL**

**FACULTAD DE EDUCACIÓN TÉCNICA
PARA EL DESARROLLO**

**CARRERA DE:
INGENIERÍA AGROPECUARIA**

CERTIFICACIÓN

Certificamos que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por **Byron Jesús Díaz Cárdenas** como requerimiento parcial para la obtención del Título de **Ingeniero Agropecuario** con mención en Gestión empresarial Agropecuaria.

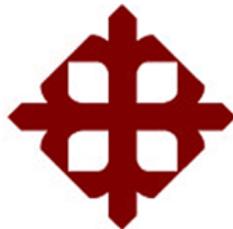
TUTOR

Ing. Agr. Ricardo Guamán Jiménez, M. Sc.

DIRECTOR DE LA CARRERA

Ing. John Franco Rodríguez, M. Sc.

Guayaquil, a los 16 días del mes de marzo del año 2015



**UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL**

FACULTAD DE EDUCACIÓN TÉCNICA PARA EL DESARROLLO

CARRERA DE: INGENIERÍA AGROPECUARIA

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Yo, **Byron Jesús Díaz Cárdenas**

DECLARO QUE:

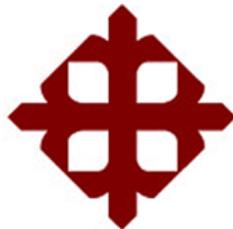
El Trabajo de Titulación: **Ploidía de mutantes de banano (*Musa acuminata* AAA) tratados con rayos gamma y etilmetanosulfonato, mediante citometría de flujo**, previa a la obtención del Título de **Ingeniero Agropecuario con mención en Gestión empresarial Agropecuaria**, ha sido desarrollado respetando derechos intelectuales de terceros conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mi total autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del Trabajo de Titulación referido.

Guayaquil, a los 16 días del mes de marzo del año 2015

EL AUTOR

Byron Jesús Díaz Cárdenas



UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL

FACULTAD DE EDUCACIÓN TÉCNICA
PARA EL DESARROLLO

CARRERA DE:
INGENIERÍA AGROPECUARIA

AUTORIZACIÓN

Yo, **Byron Jesús Díaz Cárdenas**

Autorizo a la Universidad Católica de Santiago de Guayaquil, la **publicación** en la biblioteca de la institución del Trabajo de Titulación: **Ploidía de mutantes de banano (*Musa acuminata* AAA) tratados con rayos gamma y etilmetanosulfonato, mediante citometría de flujo**, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y total autoría.

Guayaquil, a los 16 días del mes de marzo del año 2015

EL AUTOR:

Byron Jesús Díaz Cárdenas

AGRADECIMIENTO

Le agradezco y le doy la gloria a mi Yahvé Dios por amarme tanto, concederme tantas gracias y permitirme culminar con éxito esta fase de mi vida, a Él le dedico el Salmo 99:

El Señor es el Rey supremo

¹ ¡El Señor es Rey!
¡Él tiene su trono sobre los querubines!
Tiembren las naciones, y aun la tierra entera.

² El Señor es grande en el monte Sión;
El Señor está por encima de todos los pueblos.

³ Sea alabado su nombre, grande y terrible;

¡Dios es santo!

⁴ Tú eres un Rey poderoso que ama la justicia;
Tú mismo estableciste la igualdad.
Has tratado a los hijos de Jacob
con justicia y rectitud.

⁵ ¡Alaben al Señor, nuestro Dios,
y arrodíllense delante de sus pies!

¡Dios es santo!

⁶ Moisés y Aarón están entre sus sacerdotes;
Samuel está entre los que alabaron su nombre.
El Señor les respondía
cuando ellos pedían su ayuda.

⁷ Dios habló con ellos
desde la columna de nube,
y ellos cumplieron sus mandatos
y la ley que les dio.

⁸ Señor, Dios nuestro, ¡tú les respondías!
Fuiste para ellos un Dios de perdón,
pero también castigaste sus maldades.

⁹ Alaben al Señor nuestro Dios,
¡Arrodíllense ante su santo monte!

¡Nuestro Dios, el Señor, es santo!

A mi madre Marisol, gran representante de Dios, la amo y le agradezco por dar su vida por nosotros sus hijos, por mí, gracias por traerme hasta aquí, la llevo siempre en mi corazón; a mi padre y hermanos, a mis tías, a Guisellita Padovani, mis amigos, mis maestros, a todos los que son parte de mi vida y me ayudaron a llegar hasta aquí, ¡Gracias totales!

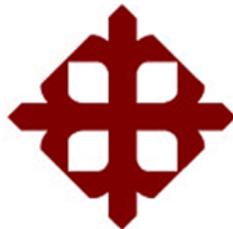
DEDICATORIA

Dedico mi trabajo a mi Dios Todopoderoso, que ha guiado siempre mi camino, ha sido mi Fortaleza en todo momento y Luz de mi vida. A mi Madre María Santísima por ser mi Intercesora y orar por mí ante Dios, por amarme y brindarme su amor.

A mi amadísima Madre Marisol, mi inspiración y mi guía, que con su amor y sabiduría me ha conducido en los caminos del Señor para tomar las decisiones correctas en mi vida.

A mis hermanos, a mi abuelita Delia, mis tías Amparito y Amely, mi prima Solange por ser mi ejemplo a seguir, a Guisellita Padovani y a todos mis seres amados.

Byron Jesús Díaz Cárdenas



**UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL**

**FACULTAD DE EDUCACIÓN TÉCNICA
PARA EL DESARROLLO**

**CARRERA DE:
INGENIERÍA AGROPECUARIA**

CALIFICACIÓN

Ing. Agr. Ricardo Guamán Jiménez, M. Sc.

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁGINA
AGRADECIMIENTO.....	i
DEDICATORIA.....	ii
ÍNDICE GENERAL.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	viii
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO REFERENCIAL.....	3
2.1. Importancia del cultivo de banano en Ecuador.....	3
2.2. La Sigatoka negra en el cultivo de banano.	4
2.3. El mejoramiento genético en banano.	5
2.3.1. La mutagénesis inductiva.	6
2.3.2. Mutación inductiva usando material vegetal in vitro de banano.....	7
2.4. Ploidía y tamaño celular.	8
2.4.1. Variaciones cromosómicas numéricas: Euploidía y Aneuploidía.....	12
2.4.2. Poliploidía en la especiación vegetal.....	14
2.4.3. El contenido de ADN y la ploidía.....	16
2.5. Fundamentos de la citometría de flujo.	17
2.5.1. El Citómetro de flujo.	19
2.5.2. Prestaciones de los citómetros de flujo.....	22
2.5.3. Niveles de análisis por citometría de flujo.....	23

2.6. Aplicación de la citometría de flujo en el estudio del genoma vegetal.....	24
2.6.1. Análisis del Nivel de Ploidía.....	25
2.6.2. Determinación del tamaño del genoma nuclear y el análisis del contenido del ADN nuclear.....	27
2.6.3. Tipos de fluorocromos usados en citometría de flujo.....	29
2.6.4. Referencia interna y externa para el análisis de ploidía.....	31
2.6.5. Análisis y procesamiento de los datos en citometría de flujo.....	32
3. MARCO OPERACIONAL.....	35
3.1. Ubicación del ensayo.....	35
3.2. Materiales.....	35
3.3. Material vegetal.....	37
3.4. Tratamientos estudiados.....	37
3.5. Características de los rayos Gamma.....	37
3.6. Características del mutagénico EMS.....	38
3.7. Manejo del ensayo.....	38
3.7.1. Colecta de muestras vegetales para el análisis de citometría.....	38
3.7.2. Determinación de ploidía mediante citometría de flujo.....	40
3.7.2.1. Protocolo inicial del citómetro de flujo.....	40
3.7.2.2. Control de calidad en el citómetro de flujo.....	40
3.7.2.3. Calibración del control estándar de referencia interno.....	41
3.7.2.4. Ploidía de los mutantes de banano cv. Williams mediante citometría de flujo.....	41
3.7.2.5. Determinación del contenido del ADN nuclear.....	43
3.8. Variables evaluadas.....	44
3.8.1. Ploidía de los mutantes de banano.....	44
3.8.2. Contenido relativo de ADN nuclear.....	44
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46

4.1. Ploidía de mutantes de banano irradiado con rayos Gamma.	46
4.2. Ploidía de mutantes de banano tratados con el mutagénico Etilmetanosulfonato.	52
4.3. Contenido relativo de ADN nuclear de las plantas mutantes de banano irradiadas con Rayos Gamma.....	58
4.4. Contenido relativo de ADN nuclear de las plantas mutantes de banano tratadas con EMS.....	60
5. CONCLUSIONES.....	62
6. RECOMENDACIONES.....	64
BIBLIOGRAFÍA.....	65
ANEXOS	73

ÍNDICE DE TABLAS

CONTENIDO	PÁGINA
Tabla 1. Poliploidía de cultivos importantes (Grupo de Investigación de Genética y Microbiología, 2004).....	15
Tabla 2. Parámetros que se pueden analizar por citometría de flujo (Connor, 2012).....	23
Tabla 3. Relación entre el contenido y la ploidía del ADN de los núcleos de la fase G1 (Instituto de Botánica Experimental de la Academia de Ciencias de la República Checa (IEB), 2014).	25
Tabla 4. Tamaño del genoma nuclear de genotipos de Musa estimado por citometría de flujo*, Instituto de Botánica Experimental de la Academia de Ciencias de la República Checa (2014).	29
Tabla 5. Características básicas de los principales fluorocromos de ADN utilizados en el análisis de citometría de flujo de plantas (McCarthy, 2007).....	30
Tabla 6. Comparación de las medias de los coeficientes de variación individuales de cada pico en el histograma, de los mutantes irradiados. UCSG, 2015.	51
Tabla 7. Comparación de las medias de los coeficientes de variación individuales de cada pico en el histograma, de los mutantes tratados con EMS. UCSG, 2015.....	57
Tabla 8. Cantidades de ADN relativo nuclear determinado en picogramos (pg) en las plantas sometidas a irradiación con varias dosis de rayos gamma del INIAP. UCSG, 2015.....	59
Tabla 9. Cantidades de ADN relativo nuclear determinado en picogramos (pg) en las plantas tratadas con EMS del INIAP. UCSG, 2015.....	61

ÍNDICE DE GRÁFICOS

CONTENIDO	PÁGINA
Gráfico 1. a) Haploide b) diploide c) tetraploide (Contreras, 2013).....	9
Gráfico 2. Ciclo celular (Arendt, 2007).	10
Gráfico 3. Al aumentar la proporción de citoplasma respecto a la del núcleo aumenta la cantidad de ciertas moléculas en el núcleo (Baserga, 2007).	11
Gráfico 4. Principales componentes de un citómetro de flujo (Bioacademia S. A. de C. V., 2010).....	18
Gráfico 5. Histograma de frecuencias originado por el citómetro de flujo. (Ramírez Ramírez, 2000).....	19
Gráfico 6. Cámara del citómetro de flujo y sus periféricos (Ramírez Ramírez, 2000).	20
Gráfico 7. Diagrama de la metodología utilizada para la preparación de muestras para la determinación del contenido en ADN por citometría de flujo (Loureiro, Revista Ecosistemas, 2009).	26
Gráfico 8. Tamaño del genoma (Cadavid, 2009).	28
Gráfico 9. Análisis por citometría de flujo: Referencia externa (superior) y referencia interna (inferior).	32
Gráfico 10. A) Disposición de las plantas de banano por dosis. b) Sobres identificados y botellas con PVP 1 %. c) Selección de la hoja. d) Corte de un segmento de la hoja de la planta de banano a ser colectada.	39
Gráfico 11. A: Corte de 0.5 cm ² de ambas muestras di y triploide. Colocación de las muestras en la caja Petri. C: <i>Chopping</i> de la muestra en el buffer de extracción de núcleos. D: Incubación por 30 segundos en el buffer de extracción. E: Filtrado de la muestra en el tubo con	

mercaptoetanol al 0.1 %. F y G: Adición del fluorocromo DAPI. H: Colocación de la muestra en el citómetro para el análisis. I: Corrida de la muestra en el citómetro de flujo.....	43
Gráfico 12. Histograma obtenido de la planta 35, mediante citometría de flujo de la dosis de 20 Grays. UCSG, 2015.	47
Gráfico 13. Histograma obtenido de la planta 15, mediante citometría de flujo de la dosis de 40 Grays. UCSG, 2015.	47
Gráfico 14. Histograma obtenido de la planta 10, mediante citometría de flujo de la dosis de 50 Grays. UCSG, 2015.	48
Gráfico 15. Histograma obtenido de la planta 90, mediante citometría de flujo de la dosis de 60 Grays. UCSG, 2015.	48
Gráfico 16. Histograma obtenido de la planta 45, mediante citometría de flujo de la dosis de 80 Grays. UCSG, 2015.	49
Gráfico 17. Histograma obtenido de la planta 29, mediante citometría de flujo de la dosis de 100 Grays. UCSG, 2015.	49
Gráfico 18. Histograma obtenido mediante citometría de flujo del testigo. UCSG, 2015.....	50
Gráfico 19. Comparación de los Coeficientes de variación de los mutantes analizados para las dosis con rayos gamma. UCSG, 2015.....	51
Gráfico 20. Histograma obtenido mediante citometría de flujo de la dosis de EMS 0.5 % 1 hora, planta 24. UCSG, 2015.	53
Gráfico 21. Histograma obtenido mediante citometría de flujo de la dosis de EMS 0.5 % 3 horas, planta 11 con mixoploidía (4n). UCSG, 2015.	53
Gráfico 22. Histograma obtenido de la planta 5, mediante citometría de flujo de la dosis de EMS 0.5 % 9 horas. UCSG, 2015.	54
Gráfico 23. Histograma obtenido de la planta 105, mediante citometría de flujo de la dosis de EMS 1 % 1 hora. UCSG, 2015.	54
Gráfico 24. Histograma obtenido de la planta 7, mediante citometría de flujo de la dosis de EMS 1 % 3 horas. UCSG, 2015.	55

Gráfico 25. Histograma obtenido mediante citometría de flujo de la dosis de EMS 0.5 % 3 horas, planta 121 con mixoploidía (4n). UCSG, 2015.	55
Gráfico 26. Histograma obtenido mediante citometría de flujo del testigo, para las dosis de EMS. UCSG, 2015.....	56
Gráfico 27. Comparación de los Coeficientes de variación de los mutantes analizados para las dosis con Etilmetanosulfonato. UCSG, 2015. .	57
Gráfico 28. Relación entre el contenido relativo de ADN nuclear y los coeficientes de variación en las dosis de rayos gamma. UCSG, 2015.....	59
Gráfico 29. Relación entre el contenido relativo de ADN nuclear y los coeficientes de variación en las dosis tratadas con EMS. UCSG, 2015.....	61

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó entre los meses de Agosto del año 2014 hasta Enero del año 2015 en el Laboratorio de Biotecnología de la Estación Experimental del Litoral Sur “Dr. Enrique Ampuero Pareja” del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIAP); el objetivo principal de la investigación fue medir el nivel de ploidía de las poblaciones mutagénicas de banano *Musa acuminata* (AAA) cv. *Williams*, producto de los tratamientos con rayos gamma en las dosis de 20, 40, 60, 80 y 100 Grays, así como, los tratados con el mutagénico químico Etilmetanosulfonato (EMS), en las dosis de 0,5 % - 1 hora; 0,5 % - 3 horas; 0,5 % - 9 horas; 1 % - 1 hora; 1 % - 3 horas; 2 % - 3 horas.

Durante la investigación los resultados obtenidos fueron evaluados mediante histogramas y los estadísticos: Media, Valor máximo, Valor mínimo, Varianza, Desviación estándar y Error estándar. Las variables evaluadas fueron las siguientes: Ploidía de los mutantes de banano irradiados y tratados con EMS, reflejado mediante histogramas y el contenido relativo de ADN nuclear expresado en picogramos y millones de pares de bases (Mpb).

Los resultados concluyeron que las dosis de rayos gamma no afectan los niveles de ploidía de las plantas de banano mutante cv. *Williams*, puesto que los histogramas obtenidos muestran que el pico de todos los mutantes en las diferentes dosis de irradiación fueron observadas por el canal 150, mientras que en el contenido relativo de ADN nuclear se observó una pequeña variabilidad de 0.047 a favor de la radiación con 20 Grays. Con EMS, se puede concluir que solamente en las dosis a la concentración del 0.5 % y del 2 % durante una exposición de incubación de 3 horas en el agente mutagénico, se generó una pequeña variación en la ploidía (mixoploidía) y en relación al contenido relativo de ADN nuclear con el tratamiento EMS, se observa que la variación determinada entre las diferentes dosis es insignificante pues apenas llega a un valor de 0.021.

ABSTRACT

This research was conducted between the months of August 2014 to January 2015 at Biotechnology Laboratory at The Experimental Station of South Coast "Dr. Enrique Ampuero Pareja" in The National Institute for Agricultural Research (INIAP); the main objective of the research was to measure the ploidy level of mutagenic populations of banana *Musa acuminata* (AAA) cv. *Williams*, product of gamma rays treatments in doses of 20, 40, 60, 80 and 100 Grays as well as those treated with the chemical mutagen ethylmethanesulfonate (EMS), in doses of 0.5% - 1 hour; 0.5% - 3 hours; 0.5% - 9 hours; 1% - 1 hour; 1% - 3 hours; 2% - 3 hours.

During the investigation the results were evaluated using histograms and statistics: Media, maximum value, minimum value, variance, standard deviation and standard error. The variables evaluated were: Ploidy of banana mutants treated with gamma irradiation and EMS, reflected by histograms and relative nuclear DNA content expressed in picograms and millions of base pairs (Mbp).

The results concluded that levels of ploidy were not affected by any gamma ray doses in mutant banana plants cv. *Williams*, since histograms obtained show that the peak of all mutants in the different irradiation doses were observed by the channel 150, while the relative nuclear DNA showed a little variability of 0.047 observed in favor of radiation with 20 Grays. With EMS, it can be concluded that only in doses to the concentration of 0.5% and 2% during an exhibition of incubation for 3 hours in the mutagenic agent, a small variation was generated in ploidy (mixoploidy) and in relation to nuclear DNA content on the EMS treatment showed that the determined variation between the different doses is negligible as barely worth 0.021.

1. INTRODUCCIÓN.

El cultivo de banano (*Musa AAA*) tiene a nivel mundial gran importancia y es considerado el cuarto cultivo más importante por detrás del arroz, el trigo y el maíz. En Ecuador ésta fruta es muy importante para el desarrollo económico del país, siendo la segunda fuente, después del petróleo, de ingresos al Estado por su participación en el PIB y en la generación de divisas.

En los actuales momentos, la producción de esta fruta, se ve amenazada por varios problemas fitosanitarios, siendo el más importante la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet). Ésta enfermedad puede llegar a reducir hasta el 50 % del rendimiento del cultivo y causar pérdidas totales. De la misma manera, el clima inestable que se ha presentado en los últimos años en el país, ha influido directamente en la aplicación de fungicidas sistémicos, puesto que el hongo ha llegado a presentar resistencia, complicando más la producción bananera.

Actualmente, se ha considerado que la variabilidad genética es el punto de partida de cualquier programa de mejoramiento genético y que en el banano ésta variabilidad es muy restringida, de tal manera que los genes de resistencia a pesar de encontrarse en algunos de sus cultivares, hasta la actualidad, los mejoradores no han logrado combinar la resistencia con la calidad y el sabor de la fruta. Es por ello que es necesario inducir dicha variabilidad en cultivares comerciales a través de mutagénesis inductiva, para generar cambios fenotípicos y genotípicos desarrollando la variabilidad necesaria para la posterior selección de poblaciones mutagénicas con características superiores a los clones comerciales que se cultivan actualmente.

Una vez generada tal variación, es necesario la utilización de la citometría de flujo, como técnica de medición y clasificación de la ploidía, para la selección de los genotipos deseables derivados de explantes irradiados y tratados con EMS (Etilmetanosulfonato), cuya técnica define la cantidad y variación de ADN presente en el material, para analizar los cambios en el contenido del mismo, lo que permitiría la caracterización del genoma.

Debido a la gran importancia que representa para el país el cultivo de banano, se está recurriendo a la Biotecnología donde se han realizado varias investigaciones y avances para identificar variedades resistentes a la Sigatoka negra, es así, que el Departamento de Biotecnología de la Estación Experimental Litoral Sur del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), se encuentra desarrollando en ésta área, un proyecto que busca el mejoramiento genético de banano mediante la mutagénesis inductiva, enfatizando estudios de resistencia a esta enfermedad y en productividad. Con lo anteriormente expuesto los objetivos de este proyecto fueron los siguientes:

General

- Determinar la ploidía y contenido relativo de ADN nuclear de mutantes de banano cv. Williams, tratados con rayos gamma y Etilmetanosulfonato, mediante citometría de flujo.

Específicos

- Evaluar la ploidía de los mutantes de banano procesados mediante citometría de flujo.
- Determinar el contenido relativo de ADN nuclear de las plantas mutantes.

2. MARCO REFERENCIAL.

2.1. Importancia del cultivo de banano en Ecuador.

Existen más de 500 variedades de banano, pero es el subgrupo Cavendish el que más se cultiva (Figueroa & Lupi, s.f.). Dentro de este subgrupo los clones de Valery, Gran Enano y Williams, son los que más se destacan debido a sus características e importancia en el comercio mundial, su adaptación climática, su alta resistencia de los fuertes vientos y una alta productividad (Ortiz, 2001).

El clon Williams por sus características, manifiesta una alta producción y la calidad en el fruto que produce, además, por la morfología que presenta éste clon, es una planta semienana de pseudotallo vigoroso y amplio sistema radicular que le da mayor resistencia al volcamiento por vientos. (Sierra, 1993; Ortiz, 2001). Fernández (2006) destaca de éste clon una mayor adaptabilidad a condiciones extremas de clima, suelo y agua, aunque su mayor inconveniente se presenta en alta susceptibilidad frente a los nematodos y a la Sigatoka negra.

Agricultores de 120 países producen cerca de 90 millones de toneladas de bananos al año, y un 80 % de la producción mundial se consume y se comercia localmente en cada país (Revista El agro, 2013).

En las más recientes cifras el 80.64 % de las exportaciones de banano a nivel mundial está representado por 10 países, liderando la lista de acuerdo a su participación al 2012 Ecuador con 21.95 %, seguido de Bélgica con 13.76 %, Colombia con 8.81 %, Costa Rica con 8.45 % y Filipinas con 6.94 %. Mientras que en el período 2008-2012, la TCPA de los principales exportadores indica que Ecuador creció un 5.69 %, seguido de Bélgica con una caída de 4.45 % y Colombia con un incremento de 5.87 %. Otros mercados que han aumentado

significativamente sus exportaciones en el mismo período son Camerún 33.75 %, Honduras 18.98 %, Guatemala 15.80 % y Filipinas 12.42 % (Pro Ecuador, 2013).

Para el Ecuador, la cadena tiene una importancia relevante, ya que en promedio representa un 26 % del PIB agrícola del país y aporta en un 2 % al PIB total, siendo uno de los productos tradicionales dentro de las exportaciones ecuatorianas. El tipo de banano que exporta principalmente Ecuador es el Cavendish, ya que es resistente a una de las enfermedades que sufre dicho producto conocida como “Mal de Panamá” *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Dicha variedad es conocida por ser grande y robusta, es originaria de Vietnam, China y las Islas Canarias (INEC, 2009).

Las bananas Cavendish son un subgrupo de cultivares triploides (AAA) pertenecientes a *Musa acuminata*. Los Cultivares de éste subgrupo se distinguen por la altura y las características de los frutos. Entre los clones más importantes para la producción de ésta fruta se incluyen: *Gran Naine*, *Dwarf Cavendish*, *Valery*, *Lacatan*, *Williams*, *Morado* (Ploetz, Kepler, Daniells, & Nelson, 2007).

2.2. La Sigatoka negra en el cultivo de banano.

Es una destructiva enfermedad foliar que afecta principalmente a plantas del género *Musa*: banano y plátano. Según Index Fungorum, s.f., ésta enfermedad es causada por el hongo de la clase *Dothideomycetes*, *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (anamorfo *Pseudocercospora fijiensis*) y constituye el principal problema fitopatológico en estos cultivos (Guzmán & Paladines, 2012).

Combatir este hongo, uno de los principales males que amenaza la fruta, representa para el productor ecuatoriano un gasto de entre \$ 800 y \$1 000 por hectárea, equivalentes al 35 % de los costos totales de la cosecha. Una plantación bananera requiere de por lo menos 15 ciclos de fumigación para

combatir la enfermedad, lo que a su vez significa \$5.000 por cada aplicación (Diario Hoy, 2013).

2.3. El mejoramiento genético en banano.

La mayoría de los bananos cultivados son triploides. Si la triploidía proporciona un cierto vigor a la planta, contribuye también a la esterilidad que frena considerablemente el mejoramiento de los bananos mediante cruzamiento y representa un reto para el mejoramiento convencional. A pesar de estas dificultades inherentes al banano, se han efectuado notables adelantos estos veinte últimos años y, hoy en día, no es raro encontrar híbridos artificiales en algunas estaciones de investigación y de apoyo al desarrollo rural o, incluso, en fincas particulares (Tomekpe, Jenny, & Escalant, 2004).

Perea y Constabel (1996) afirman que el objetivo de toda hibridación o cruce genético es la de obtener la variación genética para que el fitomejorador pueda seleccionar de la progenie la más deseable combinación de genes.

El procedimiento inicial de mejoramiento está enfocado en cruces de triploides (3x) por diploides (2x) apuntando a producir híbridos tetraploides resistentes a enfermedades. Usando clones diploides resistentes como parentales machos y aprovechando gametos 3x femeninos, producidos por cultivares triploides femeninos parcialmente fértiles, así se han producido, a través del rescate de embriones, producciones de algunos híbridos tetraploides, teniendo los rasgos del parental madre (Tomekpe, Jenny, & Escalant, 2004).

Perea (1988) establece que las alternativas que ofrece la biotecnología presentan especial interés en Musáceas debido a los avances realizados para la obtención de clones de banano y plátano tolerantes o resistentes a Sigatoka negra y otras enfermedades que causan pérdidas en la producción de la fruta. Además, nos

dice que la integración de la biotecnología en el empleo de las mutaciones, embriogénesis somática, células, protoplastos y la ingeniería genética en los programas de mejoramiento puede complementarse solucionando las limitaciones al introducir los genes específicos en corto tiempo.

El mismo autor menciona que los avances logrados en los últimos años se han orientado hacia el mejoramiento genético, con énfasis en aumentar la variabilidad genética la cual constituye una alternativa de gran importancia para la selección de clones que presentan resistencia a las enfermedades.

Rodríguez (2000) dice que en el mejoramiento genético de cualquier cultivo, la variación genética disponible en las poblaciones es la base del éxito y que la variación genética en banano se ha obtenido *in vitro* a través de la generación de variación somaclonal durante el proceso de micro propagación, de la inducción de inducción de mutaciones en el material que se micro propaga o ambas, en las cuales, la generación de multiyemas es una ayuda tanto como para la micropropagación como para, en su caso, aumentar la probabilidad de generar genotipos diferentes al de partida.

2.3.1. La mutagénesis inductiva.

La única fuente de nuevos genes fue, en el pasado, la mutación natural. La demostración de que el proceso se puede reproducir en laboratorio se utilizó de inmediato por los mejoradores, ya bien entrando al siglo XX. Se han utilizado mutágenos físicos (los más importantes han sido los rayos x, gamma y UV) aunque ahora se prefieren mutágenos químicos de baja toxicidad como el EMS (etilmetasulfonato) (Sociedad Española de Biotecnología, 2000).

Según el Grupo de Investigación de Genética y Microbiología (2008) las radiaciones producen los siguientes efectos a nivel celular:

- Efectos genéticos: alteraciones en los genes.
- Efectos citogenéticos: alteraciones en los cromosomas: roturas cromosómicas y translocaciones.
- Efectos fisiológicos: alteraciones en las enzimas y hormonas.

Posteriormente, se demostró que otros agentes físicos y químicos producían mutaciones. La especificidad mutacional significa que muchos agentes mutágenos tienden a producir un determinado tipo de mutación, por ejemplo:

- Etilmetanosulfonato (EMS): produce fundamentalmente transiciones GC-AT.
- Nitrosoguanidina (NG): produce esencialmente transversiones GC-TA.
- Luz ultravioleta (UV): produce transiciones y transversiones.

2.3.2. Mutación inductiva usando material vegetal *in vitro* de banano.

Morpurgo (1997), manifiesta que la combinación de mejoramiento por mutación y cultivo *in vitro* (también llamada mutagénesis *in vitro*) hacen que la inducción y la selección de mutaciones somáticas inducidas sean más eficaces. Este método ofrece varias ventajas: (a) material de la planta se puede propagar rápidamente antes del tratamiento para obtener un gran tamaño de la población; (b) la propagación adicional se asegurará la formación de quimeras periclinales o *homohistont* individuales (tejido derivado no quimérico), y (c) aumento de la recuperación a través de la competencia somática disminuido puede ser obtenido mediante la modificación de las condiciones de cultivo.

De la misma manera el autor destaca que los reguladores del crecimiento de plantas, y en particular un medio enriquecido con citoquinina, puede aumentar la

tasa de recuperación de las células mutadas. Por lo tanto el uso combinado de la inducción de mutaciones y de la tecnología *in vitro* es más eficiente, ya que acelera la producción de mutantes como resultado de un aumento de la velocidad de propagación y un mayor número de generaciones por unidad de tiempo y espacio.

Novak, Afza, Van Duren, & Omar (1990) desarrollaron el sistema de mutación inductiva en *Musa*, sobre la base de técnicas *in vitro* para recuperar plantas mutantes y micropropagar mutantes deseables, en los Laboratorios del Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA). La inducción de mutaciones puede descubrir un fenotipo recesivo mediante la mutación, inhibición o supresión del alelo dominante correspondiente (Jain & Swennen, 2004).

El éxito de cualquier programa de mutagénesis *in vitro* depende del establecimiento de reproducible en los procedimientos *in vitro* de plantas de regeneración, la optimización de los tratamientos mutagénicos y detección eficaces de las poblaciones mutadas de las variaciones deseadas (Van Harten, 1998; Jain, 2000a, 2006b, 2007c).

2.4. Ploidía y tamaño celular.

Contreras (2013) destaca que la ploidía tiene una importancia capital en genética y en el estudio de los cromosomas; y define ploidía como el número de juegos completos de cromosomas que tiene una célula o un individuo. La mayoría de vertebrados son diploides tienen dos juegos de cromosomas. Es decir de cada uno de sus cromosomas tienen dos copias. Todos los seres vivos que posean dos juegos completos de cromosomas son diploides y se representa su número cromosoma como $2n$ o $2x=$ al número de cromosomas total que tenga. El Gráfico 1 demuestra lo dicho por el autor.

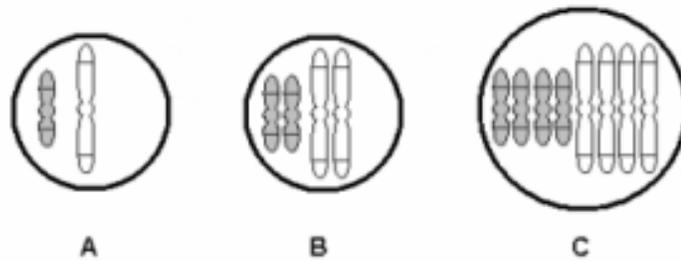


Gráfico 1. a) Haploide b) diploide c) tetraploide (Contreras, 2013).

La ploidía es un término que describe el número de grupos o juegos de cromosomas dentro de una célula. Una célula haploide contiene la mitad (n) del número normal de cromosomas ($2n$). Un diploide ($2n$) posee dos series de cromosomas y un poliploide contiene un incremento del número de cromosomas característico. La ploidía juega un papel importante en la evolución de las plantas permitiendo su adaptación a una amplia variedad de ambientes geográficos y climas a lo largo del tiempo. De ahí la importancia de realizar estudios para determinar la evolución de la ploidía, estudiar sus categorías, modos de formación, atributos ecológicos y moleculares, mecanismos de especiación, comportamiento citogenético y consecuencias genéticas. La citometría de flujo aporta información valiosa para los estudios de ploidía en plantas tales como: 1) cambios en el contenido de ADN y caracterización del genoma; 2) determinación de la prevalencia y el tiempo en que ocurren estos cambios; 3) relación de la genética al comportamiento de la planta en su ambiente; 4) La identificación de plantas híbridas (Laguado, 2007).

Para explicar el tamaño de las células, existen varias teorías, entre las muchas hipótesis planteadas surge la de Arendt (2007), explicando que el tamaño celular está relacionado con el balance entre división y crecimiento de las células. En cada ciclo de división las células pasan por distintas fases. La fase G1 es la de

crecimiento. En general, las células tienen que crecer el doble de su tamaño para dividirse y una vez conseguido comienzan la fase S, síntesis del ADN, y ya no pueden parar hasta dividirse. Se propone que el balance entre crecimiento y división es lo que determina el tamaño de la célula. De alguna manera la célula sabe que tiene que dividirse cuando ha alcanzado un tamaño determinado. Por tanto, existe un sensor que detecta un umbral de tamaño celular a partir del cual la célula entra irremisiblemente en división.

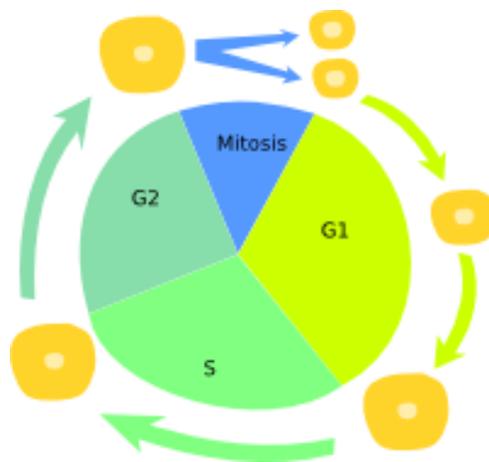


Gráfico 2. Ciclo celular (Arendt, 2007).

Baserga (2007), señala que como sensores del tamaño celular se ha propuesto la cantidad de ribosomas, puesto que la mayoría de la energía celular se emplea en producir ribosomas. En levaduras se ha encontrado que la cantidad de ribosomas depende de la cantidad de nutrientes, con lo que se adapta la capacidad de traducción, producción de proteínas, a los recursos existentes en el medio. Curiosamente la transcripción de otras proteínas no se ve afectada. En metazoos parece que la cantidad de ribosomas también es un indicador del tamaño celular, pero las vías moleculares que afectan a su síntesis es multifactorial y difícil de desentrañar. También hay resultados que indican que el sistema del factor de crecimiento similar a la insulina (*insulin-like growth factor*, IGF) parece controlar el tamaño celular. Cuando está mutado en ratones el

tamaño celular disminuye pero también el número de células. Así, se tienen individuos que pueden ser un 50 % más pequeños que sus controles.

Este mismo autor destaca que la ploidía (número de copias de un genoma) es otro factor que afecta al tamaño celular. Cuanta más ploidía (mayor número de copias del genoma) tiene una célula mayor es. En salamandras se pueden conseguir individuos pentaploides. Estos animales son igual de grandes que los diploides, pero sus células son más grandes, luego el cuerpo tiene menos células. Curiosamente existe proporcionalidad. Por ejemplo, un tetraploide tiene la mitad de células que un diploide y por tanto el doble de grandes. Podríamos pensar que es la cantidad de ADN lo que condiciona el tamaño celular. En las plantas se ha demostrado que las poliploidías producen células más grandes, pero tampoco se afecta al tamaño final de la estructura, simplemente se disminuye la tasa de mitosis.

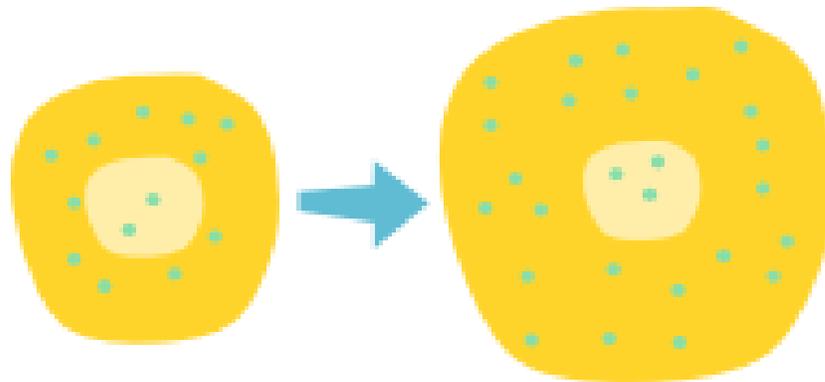


Gráfico 3. Al aumentar la proporción de citoplasma respecto a la del núcleo aumenta la cantidad de ciertas moléculas en el núcleo (Baserga, 2007).

Finalmente Baserga concluye, que la relación núcleo-citoplasma (N: C) es otro factor propuesto, relacionado con la ploidía. El núcleo no es mayor en las células más grandes por lo que puede detectar mayor cantidad de una molécula determinada en el citoplasma, aunque en el citoplasma la molécula siempre esté a la misma concentración. De hecho las células poliploides tienen núcleos más

grandes, así que podría ser que no fuera la cantidad de ADN sino el volumen nuclear lo que determinara en los organismos poliploides un mayor tamaño celular. De nuevo, esta no puede ser la causa única puesto que en un organismo existen diversos tipos celulares con tamaños diferentes y tienen la misma dotación genética.

2.4.1. Variaciones cromosómicas numéricas: Euploidía y Aneuploidía.

Herráez & Herráez Sánchez (2012) explican que las variaciones cromosómicas numéricas, implican un cambio en el número de cromosomas, bien pérdida o ganancia, pero sin la alteración de la organización de los cromosomas. Son las anomalías más frecuentes y se originan en gran parte durante la división meiótica, con lo que se transmiten tras la fecundación a todas las células del hijo o hija.

Rodríguez (2007) señala que las variaciones cromosómicas se presentan en dos grupos:

- Cambios en dotaciones completas (Euploidía).

Los Euploides tienen un número de cromosomas igual o múltiplo del número haploide (n) de cromosomas de la especie. En el caso de las aberraciones por euploidía se afecta el genoma completo. Entre ellas se encuentran dos tipos de mutaciones:

a) Monoploidía o Haploidía: en los mutantes monoploides o haploides (n), cada clase de cromosoma se encuentra una sola vez, esto es, no tiene homólogo. Los mutantes haploides son generalmente más débiles y de menor tamaño y talla que los diploides. Son típicamente estériles.

b) Poliploidía: los mutantes poliploides tienen multiplicado el número haploide de cromosomas ($2n$, $4n$, $8n$). Se deben a la formación de Gametos no reducidos,

en los cuales no se reduce el número $2n$ de cromosomas. Estos gametos $2n$ al unirse con otro normal n dan lugar a individuos $3n$ (triploides). Al unirse dos gametos $2n$ originan un individuo tetraploide ($4n$), etc. La poliploidía es común en el reino vegetal. Casi la mitad de todos los géneros de plantas conocidas presentan poliploides (ejemplo: el género *Saccharum* donde se encuentra la Caña de Azúcar).

- Cambios en una dotación cromosómica (Aneuploidía o Heteroploidía).

En ocasiones ocurren alteraciones durante la división celular que traen aparejadas la presencia o ausencia de uno o de dos cromosomas en la dotación normal de los organismos. Los cambios en el número de los cromosomas pueden reflejarse en las variaciones fenotípicas que permiten identificarlos. Entre las aberraciones aneuploides se encuentran:

a) Monosomía: los monosómicos son individuos que tienen un cromosoma de menos ($2n - 1$). Se obtienen cuando un gameto irregular ($n - 1$) se une a un gameto normal (n) para formar un cigoto $2n - 1$, que portará en sus células somáticas un cromosoma menos que los demás de su especie. Por lo general no son muy vigorosos ni muy fértiles. Producen gametos n y $n - 1$.

b) Nulisomía: los nulisómicos carecen de un par de cromosomas homólogos ($2n - 2$). Pueden originarse por la autofecundación de un organismo monosómico.

c) Trisomía: los trisómicos poseen un cromosoma más de lo normal. Pueden originarse cuando dos cromosomas homólogos pasan juntos a un mismo gameto y con ello éste será $n + 1$. Al unirse este gameto con otra normal n , darán lugar a un cigoto $2n + 1$.

d) Tetrasomía: los tetrasómicos poseen un par de cromosomas de más. Proceden de la unión de dos gametos $n + 1$.

2.4.2. Poliploidía en la especiación vegetal.

El Grupo de Investigación de Genética y Microbiología (2004) explica que un individuo se dice diploide cuando en sus células somáticas están presentes 2 juegos idénticos de x cromosomas cada uno, de forma que cada uno de dichos x cromosomas son todos diferentes entre sí. Al conjunto de los x cromosomas, se les denomina genomio y número básico, al de cromosomas que lo forman o sea x . Por tanto, una célula, tejido u órgano es diploide cuando sus núcleos poseen los $2x$ cromosomas (autosomas) típicos del individuo a que pertenecen.

El mismo autor declara que cuando la dotación cromosómica normal de un individuo está compuesta por varios genomios o juegos completos de cromosomas se dice que es un poliploide. Si los genomios son iguales, el poliploide es un auto poliploide y se lo denomina autotriploide, autotetraploide, autopentaploide, n -ploide según que sus células somáticas tengan 3, 4, 5 o n juegos idénticos de cromosomas. Sus números cromosómicos serán, por tanto $3x$, $4x$, $5x$, nx , siendo x el número básico antes definido.

También nos dice, que si los genomios que componen la dotación cromosómica del poliploide no son iguales, entonces se llama aloploide. El aloploide reúne en su complemento cromosómico los de dos o más especies diploides. Si una especie aloploide está formada por dos genomios distintos, se llama alotetraploide ($G1 G1 G2 G2$), si son tres los genomios, se trata de un alohexaploide ($G1 G1 G2 G2 G3 G3$).

Finalmente, el Grupo de Investigación de Genética y Microbiología (2004) concluye que la poliploidía es muy común en plantas, especialmente en

angiospermas, Actualmente, se piensa que entre el 30 y el 70 % de las Angiospermas son poliploides. Se sabe que las herbáceas perennes muestran mayor porcentaje de formas poliploides que las anuales y éstas menos que las leñosas aunque las herbáceas perennes y las leñosas se comportan de diferente manera en las regiones tropicales (Tabla 1).

Tabla 1. Poliploidía de cultivos importantes (Grupo de Investigación de Genética y Microbiología, 2004).

Planta	Nº cromosómico básico	Número cromosómico	Nivel de ploidía.
Avena	7	42	6x
Cacahuete	10	40	4x
Caña de azúcar	10	80	8x
Banana	11	22,33	2x,3x
Patata	12	48	4x
Tabaco	12	48	4x
Algodón	13	52	4x
Manzana	17	34,51	2x,3

Los cambios en el número de cromosomas provocan el aislamiento reproductivo inmediato de una población, ya que en ciertos casos surgen nuevas especies de forma casi instantánea debido a cambios en el número de cromosomas. Un mecanismo de especiación común en las plantas es la poliploidía, esto es, la adquisición de varias copias de cada cromosoma. Casi todas las plantas y animales tienen cromosomas apareados y se les describe como diploides. Ocasionalmente, y especialmente en las plantas, un óvulo fecundado duplica sus cromosomas pero no se divide en dos células hijas. De esta forma, la célula resultante se torna tetraploide, con cuatro copias de cada cromosoma. Si todas las divisiones celulares subsiguientes son normales, éste cigoto tetraploide se transformará en una planta constituida por células tetraploides. La mayoría de las plantas tetraploides son vigorosas y sanas, y muchas completan con éxito la

meiosis para formar gametos viables. Los gametos, sin embargo, son diploides (en cambio, la meiosis produce normalmente gametos haploides a partir de células diploides). Estos gametos diploides se fusionan con otros gametos diploides para engendrar nuevos descendientes tetraploides, de modo que los tetraploides no tienen dificultad para cruzarse con otros tetraploides de esa especie ni para autofecundarse (Audesirk, Audesirk, & Byers, 2003).

De la misma manera, los autores anteriores declaran que si un tetraploide se cruza con un individuo diploide de la especie progenitora, el resultado no es tan satisfactorio. Por ejemplo, si un espermatozoide diploide de una planta tetraploide fecunda un óvulo haploide de la especie progenitora, los descendientes serán triploides, con tres copias de cada cromosoma. Incluso si el descendiente triploide se desarrolla con normalidad, será estéril: cuando una célula triploide intenta sufrir una meiosis, el número impar de cromosomas imposibilita el apareamiento de cromosomas. La meiosis fracasa y no se forman gametos viables. Por tanto, los productos de los apareamientos diploides- tetraploides son inevitablemente estériles, de tal manera que las plantas tetraploides y sus progenitoras diploides forman comunidades reproductivas distintas que no se cruzan con éxito. Así se forma una nueva especie en una sola generación (Audesirk, Audesirk, & Byers, 2003).

2.4.3. El contenido de ADN y la ploidía.

Laguado (2007), indica que la cantidad de ADN presente en cada planta o célula dependerá de su nivel de ploidía. Por ejemplo, las plantas tetraploides ($4n$) tienen el doble de contenido de ADN y cromosomas que sus pares diploides y es en este mismo sentido que se plantea la estrategia para realizar el análisis de los histogramas y del ciclo celular. La identificación de híbridos es necesaria cuando se quiere realizar cruces entre plantas ya que diferentes niveles de ploidía

pueden resultar en inestabilidad genómica o número impar de cromosomas lo que acarrea la infertilidad y bajos niveles de productividad de estos cultivos.

2.5. Fundamentos de la citometría de flujo.

Durante los últimos años, la citometría de flujo se ha establecido como un método novedoso muy útil, rápido, para determinar de forma eficaz, reproducible y a un costo reducido por muestra, el contenido relativo de ADN nuclear y el nivel de ploidía de un gran número de especies (plantas y animales), que también se ha utilizado para clasificar las células con diferentes rasgos de una población de células mixtas (por ejemplo, como cuando se separa heterocariones a partir de protoplastos parentales en experimentos de fusión de protoplastos para la producción de híbrido somático) y, más recientemente, para el análisis de la composición en diversos componentes químicos de diferentes tejidos, tales como marcadores apoptóticos unidos a los compartimentos celulares (Ochatt, 2006).

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular multiparamétrico cuyo fundamento se basa en hacer pasar una suspensión de partículas (generalmente células) alineadas y de una en una por delante de un haz de láser focalizado. Ésta técnica permite la medición simultánea de múltiples características físicas de una sola célula y son realizadas mientras las células o partículas pasan en fila, a una velocidad de 500 a 4000 células por segundo, a través del aparato de medida en una corriente de fluido (Consejo Superior de Investigaciones Científicas & Universidad Autónoma de Madrid, 2001).

Robinson (2006), expresa que un citómetro de flujo consiste en fluídica, óptica y electrónica, ya que mide las células en suspensión en el flujo en un solo archivo a través de un volumen iluminado debido a la dispersión de luz. Luego, emiten

una fluorescencia que se recoge, se filtra y se convierte en valores digitales para su almacenamiento en un ordenador (Gráfico 4).

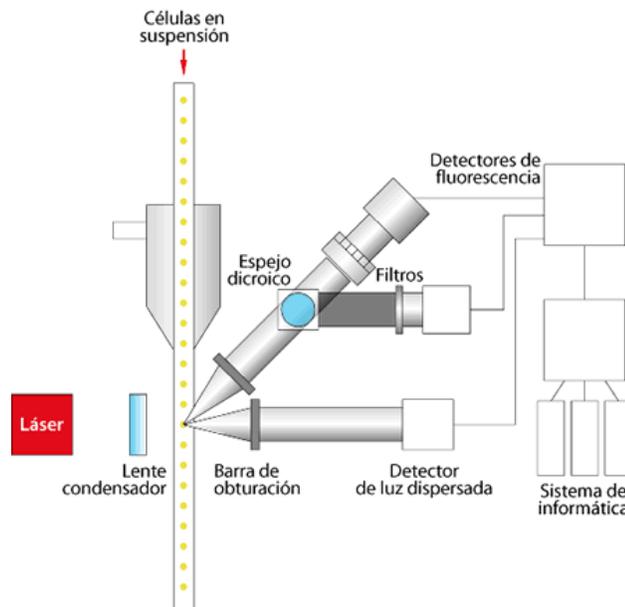


Gráfico 4. Principales componentes de un citómetro de flujo (Bioacademia S. A. de C. V., 2010).

Según Álvarez (2000) existen diferentes fluorocromos capaces de unirse al ADN celular, de ellos el yoduro de propidio y el bromuro de etidio son los más utilizados en citometría de flujo. Ambos se excitan a una longitud de onda de 488 nm y se unen de forma estequiométrica a la doble cadena de ADN. También expresa, que la cuantificación de ADN nos informa sobre la existencia o no de anomalías clonales de ADN (aneuploidías de ADN) y, por otra parte nos permite conocer la distribución de una población celular determinada a lo largo de las distintas fases del ciclo celular.

Uno de los resultados del análisis del contenido de ADN que da el citómetro de flujo es un histograma de frecuencias que describe gráficamente cuántos núcleos o partículas fueron medidos con la intensidad de fluorescencia de cada canal (del 0 al 255 o del 0 al 1.023). Se recalca que la posición del histograma sobre los

canales es una medida relativa de la fluorescencia, ya que el citometrista puede modificar su posición simplemente manipulando el detector de voltaje del dispositivo. Después de que se fija el nivel de detección de voltaje, el equipo resume toda la información de la fluorescencia registrada por cada núcleo, en el histograma de frecuencias y guarda estos datos en un archivo digital, un ejemplo del histograma de frecuencias originado por el citómetro de flujo (Gráfico 5) (Ramírez Ramírez, 2000).

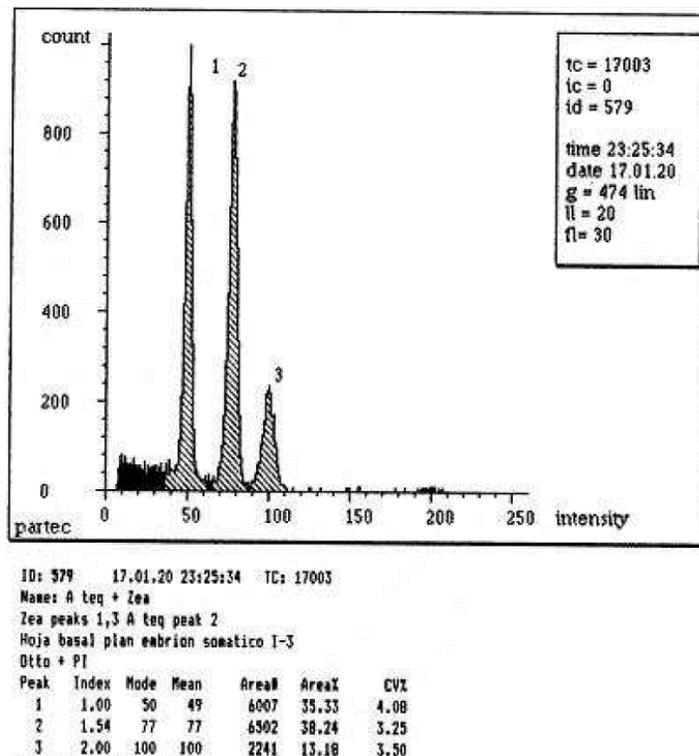


Gráfico 5. Histograma de frecuencias originado por el citómetro de flujo. (Ramírez Ramírez, 2000).

2.5.1. El Citómetro de flujo.

Ramírez Ramírez (2000) explica que el citómetro de flujo (CF) se desarrolló originalmente, hace más de dos décadas, como un método mucho más rápido que el estándar para analizar las células sanguíneas. Desde entonces sus

aplicaciones, no sólo se han incrementado día con día, en investigaciones científicas, tales como botánica, microbiología, ecología, embriología, inmunología, biología molecular y genética, sino que también en aquellas relacionadas con la industria. Su número creciente de aplicaciones se debe a que permite evaluar, fácilmente, las características individuales de miles de células y sus orgánulos, tales como núcleo y cromosomas, en cuestión de minutos. Esto último hace a la citometría de flujo, una metodología muy eficiente en comparación con otras que en el pasado requerían meses o años para obtener en parte, la información que el CF es capaz de brindar.

La misma autora señala que una de las principales aplicaciones médicas y biológicas del CF se relaciona directamente con el análisis del contenido de ADN, pues con citometría de flujo se puede determinar el nivel de ploidía de las células, pronosticar casos de pacientes con cáncer y, más recientemente, determinar la tasa de producción de células cancerosas. El CF (Gráfico 6) tiene un mecanismo que consta de un lector óptico (o fotodetector), una fuente de luz intensa y un punto de observación o de enfoque, de ambos. Estos tres componentes conforman la llamada cámara del CF, que se considera como la parte principal del aparato.

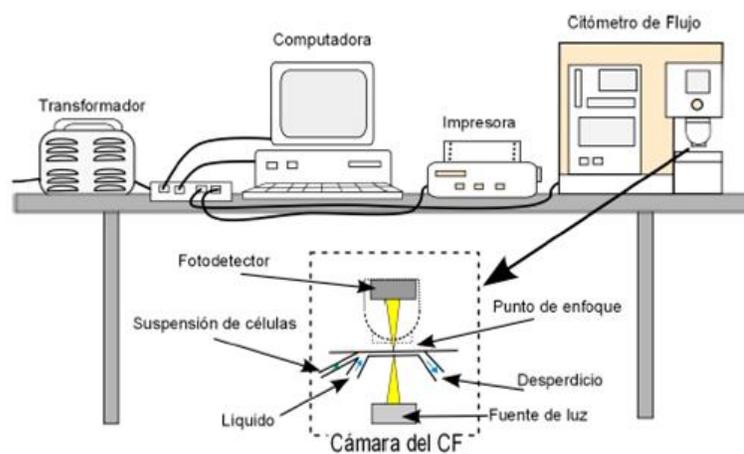


Gráfico 6. Cámara del citómetro de flujo y sus periféricos (Ramírez Ramírez, 2000).

Ramírez Ramírez (2000), detalla en su investigación que las células o partículas que serán analizadas se preparan con una tinta fluorescente que se fija sobre o dentro de cada sub partícula de interés, para luego ser inyectadas en una suspensión, hacia el centro de la cámara del CF, para que pase justamente por el punto de observación. La suspensión se inyecta en forma de un delgado chorro para exponer rápidamente a cada una de las células o partículas a la luz y al lector óptico.

Luego, bajo la excitación producida por la luz del CF, la tinta comienza a emitir señales de luz fluorescente y estas son registradas por el fotodetector. Posteriormente, las señales provenientes del fotodetector, se transforman en un impulso eléctrico cuya intensidad es proporcional a la de la luz registrada.

Existen varios métodos para preparar las muestras de tejido que serán analizadas por el CF para cuantificar su ADN (algunos han sido propuestos por Otto, 1990 y Dolezel y Gohede, 1995) y en todos ellos hay que teñir con tinta fluorescente y preparar en suspensiones los núcleos celulares.

Este proceso consiste en liberar los núcleos de la muestra de tejido cortando esta en pequeños pedazos con un bisturí y después teñirlos con fluorocromos, del tipo de los que se intercalan en la cadena de ADN, para que la intensidad de la fluorescencia originada en el proceso de citometría de flujo sea proporcional a la cantidad de ADN nuclear. La intensidad de fluorescencia registrada se transforma después en un impulso eléctrico de intensidad proporcional. La señal eléctrica obtenida, a continuación se incrementa a través de una función lineal o logarítmica (y sólo una) para después convertirse a un entero mediante el llamado convertidor analógico-digital (ADC por sus siglas en ingles) (Ramírez Ramírez, 2000).

Entonces el ADC tiene por entrada una variable continua (el impulso eléctrico) y por salida o resultado una variable discreta llamada canal. La resolución del ADC en el CF determina si existen 256 (del 0 al 255) o 1,024 canales (del 0 al 1,023), y en consecuencia, define la exactitud de los resultados posteriores (Eudey, 1996).

Al final, Ramírez Ramírez (2000) concluye que el citometrista puede manipular el detector de voltaje que registra el impulso eléctrico para hacerlo más o menos sensible a ésta señal. Este hecho ocasiona que el conjunto de datos, incrementados y discretizados, cambie de posición con respecto a los canales y que la varianza de las señales eléctricas (incrementadas con una función lineal), no sean constantes con respecto a su localización sobre el eje de los canales. Es decir, la señal eléctrica debe incrementarse 10 % para registrarse en el canal 11, en lugar del 10, pero necesita sólo un incremento del 1% para saltar del canal 100 al 101. Es por esto que en un CF que incrementa su señal por medio de una función lineal, entre más grande sea el número de canal (o más sensible sea el detector de voltaje), más grande será la resolución de los datos, en termino de canales.

2.5.2. Prestaciones de los citómetros de flujo.

Gómez (2012) manifiesta que las prestaciones de un citómetro de flujo pueden estar influenciadas por los siguientes parámetros:

- a. La sensibilidad del equipo, por la cantidad mínima de moléculas de un fluorocromo determinado que pueden ser medidas con cierta precisión (resolución), para la luz dispersada, es el tamaño menor o índice de refracción que puede ser medido con cierta precisión.

Depende de muchos factores, incluso del fluorocromo. Se puede decir que la sensibilidad aumenta si se disminuye la velocidad de flujo (paso) manteniendo constante el diámetro del flujo interno (muestra).

- b. La resolución (expresado como coeficiente de variación): es la reproductibilidad de la señal producida por idénticas células o partículas.
- c. La velocidad de medida dada por la media máxima a la que las células pueden ser medidas sin exceder una frecuencia determinada de coincidencias (dos células detectadas como una sola). En los citómetros láser oscila alrededor de 5.000 células/segundo.

2.5.3. Niveles de análisis por citometría de flujo.

Connor (2012), declara que mediante la citometría de flujo se puede analizar cuatro parámetros estos son: nucleares, citoplasmáticos, de superficie y extracelulares, como se muestra a continuación:

Tabla 2. Parámetros que se pueden analizar por citometría de flujo (Connor, 2012).

PARÁMETROS NUCLEARES	PARÁMETROS CITOPASMATICOS	PARÁMETROS DE SUPERFICIE	PARÁMETROS EXTRACELULARES
<p>1. Basados en ADN: Contenido de ADN, contenido en pares GC/AT, súper enrollamiento de ADN, Estructura de la cromatina, roturas de hebras de ADN.</p>	<p>1. Componentes intracelulares: Contenido en proteínas totales, proteínas estructurales, proteínas funcionales, glicoconjugados intracelulares, lípidos intracelulares, glutatión (GSH) y tioles libre.</p>	<p>1. Estructuras de la superficie celular: Antígenos, glicoconjugados, carga de superficie, pared celular.</p>	<p>Dinámica de la secreción celular: Captura de proteínas secretadas, ensayos multiplexados en suero.</p>
<p>2. ADN + otros parámetros: ADN/ARN, ADN/Proteínas totales, ADN/Proteínas</p>	<p>2. Funciones intracelulares: Las actividades enzimáticas, la síntesis de proteínas, los potenciales de membrana.</p>	<p>2. Dinámica de la superficie celular: Unión de ligandos, transporte/internalización de ligandos, eflujo de solutos, exposición de receptores, potencial de membrana.</p>	

totales, ADN/Antígenos Nucleares, ADN/Antígenos celulares.			
3. Parámetros no basados en ADN: Receptores nucleares, expresión de genes indicadores ("Reporters"), Morfología nuclear, Componentes nucleares	3. Entorno intracelular: Concentración de iones, movimientos iónicos, generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), lípidos y proteínas oxidados.		

Continuación de la Tabla 2.

2.6. Aplicación de la citometría de flujo en el estudio del genoma vegetal.

Según Loureiro (2009) el análisis del contenido de ADN nuclear (en sus valores relativos o absolutos) continúa siendo el principal objetivo de la citometría de flujo en plantas. Una vez que las medidas de fluorescencia de los núcleos son expresadas en una escala arbitraria, la obtención de estimaciones del contenido en ADN nuclear de un determinado tejido/individuo requiere la comparación con la fluorescencia de núcleos aislados de un estándar de referencia con tamaño de genoma conocido. Este tipo de análisis está teniendo un impacto elevado en diversas áreas de la biología vegetal, especialmente en disciplinas como la biosistemática, la biotecnología y mejora de plantas, la biología de poblaciones y la ecología.

Según Partec (2013), las principales aplicaciones de la citometría de flujo en el fitomejoramiento son:

- El análisis de ploidía, en realidad es la aplicación más frecuente de la citometría de flujo en dicho campo. Sobre todo, desde que las técnicas *in vitro* se emplean en la producción de plantas, como en los siguientes ejemplos:

- Estabilidad del nivel de ploidía por ejemplo, en las semillas de remolacha azucarera ($2n$ y $3n$), raigrás ($2n$ y $4n$) o en cultivos in vitro.
- Detección de las plantas aneuploides, para seleccionar individuos para la reproducción o para monitorizar el efecto de un tratamiento mutagénico como la radiación o sustancias químicas.
- Producción de plantas a partir de anteras, microsporas o cultivos ováricos (haploides) y la posterior producción de líneas de di haploide.

2.6.1. Análisis del Nivel de Ploidía.

El Instituto de Botánica Experimental de la Academia de Ciencias de la República Checa (2014) expone en una de sus publicaciones sobre el análisis de ploidía, en la que se explica que debido a que el contenido de ADN nuclear del núcleo G1 refleja la ploidía de una célula, la estimación del contenido de ADN se utiliza con frecuencia para la determinación de la ploidía (Tabla 3).

Tabla 3. Relación entre el contenido y la ploidía del ADN de los núcleos de la fase G1 (Instituto de Botánica Experimental de la Academia de Ciencias de la República Checa (IEB), 2014).

Ploidía	Contenido de ADN (Fase G1)
n	1C
2n	2C
4n	4C

Del mismo modo, el Instituto deja en claro que el análisis de citometría de flujo implica la estimación de contenido de ADN y no la evaluación microscópica del número de cromosoma. Por lo tanto, los términos ploidía y la ploidía del ADN

deben ser utilizados para distinguir entre cariotipo y análisis de contenido de ADN, respectivamente.

Loureiro (2009) expone que los protocolos desarrollados para el aislamiento de núcleos de tejidos vegetales son relativamente simples y rápidos donde una muestra es preparada en aproximadamente 5 minutos (Gráfico 7), permitiendo el procesado de un gran número de muestras por día. Sin embargo, el análisis de ciertas especies puede implicar un gran número de problemas esencialmente relacionados con la presencia de metabolitos secundarios en el citosol que son liberados durante la preparación de las muestras.

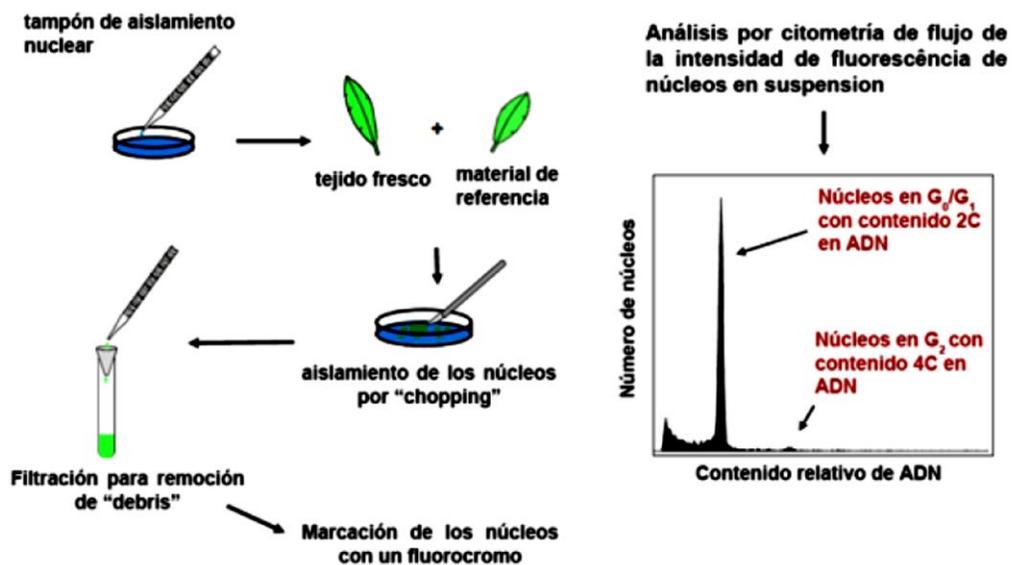


Gráfico 7. Diagrama de la metodología utilizada para la preparación de muestras para la determinación del contenido en ADN por citometría de flujo (Loureiro, Revista Ecosistemas, 2009).

El conocimiento del tamaño del genoma es un dato importante en muchas áreas de la investigación vegetal. Esta información tiene aplicaciones directas en estudios moleculares, particularmente para un correcto planteamiento de bibliotecas genómicas y en experiencias basadas en marcadores moleculares,

como AFLPs y microsatélites (Fay *et al.* 2005). Adicionalmente, este conocimiento permite la realización de estudios comparativos a gran escala, como por ejemplo, estudios de la variación del contenido en ADN a lo largo de la evolución de las plantas superiores (Leitch *et al.* 2005). Finalmente, diversos estudios han evidenciado el carácter predictivo del tamaño del genoma en diversos caracteres fenotípicos, fenología, comportamiento ecológico, entre otros (Bennett *et al.* 1998; Bennett y Leitch 2005).

2.6.2. Determinación del tamaño del genoma nuclear y el análisis del contenido del ADN nuclear.

Galbraith, Lambert, Macas, & Dolezel (2013) aclaran que la citometría de flujo se emplea cada vez más como el método de elección para la determinación del contenido de ADN nuclear y el nivel de ploidía en las plantas. Es por ello que suplanta métodos anteriores que implicaban ya sea fluorescencia y absorción por micro espectrofotometría o conteo de cromosomas, principalmente porque la citometría de flujo proporciona excepcional rapidez, comodidad y precisión. Los métodos para la medición de citometría de flujo del contenido de ADN se han desarrollado para las células individuales de plantas, protoplastos, y tejidos vegetales intactos.

Cadavid (2009) explica que el Valor C (*C-value*) es el concepto que cuantifica el tamaño del genoma nuclear. *C-value* o Valor C se refiere al contenido de ADN nuclear en células haploides, éste término surgió referente al contenido de ADN en cuanto al contenido de la masa de ADN en picogramos (10^{12} g) que no es lo mismo que el tamaño en pares de bases (Gráfico 8).

$$1 \text{ pg} = 978 \text{ Mb} \quad (1 \text{ pg} \approx 1 \text{ billón de bp})$$
$$\text{Tamaño de genoma (bp)} = \text{Masa pg (contenido de DNA)} \times 0,978 \times 10^9$$
$$\text{Contenido de DNA (pg)} = \text{Número de bp} / 0,978 \times 10^9$$

Gráfico 8. Tamaño del genoma (Cadavid, 2009).

Quintero (2011) destaca que el genoma nuclear es el más abundante y se ubica dentro del núcleo, posee aproximadamente el 60-70 % de las secuencias de ADN que son únicas o con un bajo número de copias y el 30-40 % restante son altamente repetitivas que no se transcriben y corresponden en general a ADN satélite.

Los debates en el Taller sobre el Tamaño del genoma de las plantas del 2003, celebrado en el Real Jardín Botánico de Kew, incluyen una revisión del uso moderno de varios términos utilizados para describir el contenido de ADN nuclear. La expresión tamaño del genoma se utiliza a menudo para el contenido de ADN del genoma monoploide o conjunto de cromosomas, mientras que valor C del ADN representa el contenido de ADN de todo el complemento cromosómico o cariotipo con independencia del grado de poliploidía generativa del organismo. Por el contenido (en promedio) de ADN del genoma monoploide (s) en poliploides y no poliploides se sugieren el término monoploide, tamaño del genoma y el término abreviar Cx-valor. En los organismos no poliploides generativamente C-valor y Cx-valor son congruentes. En relación con los datos cuantitativos estos términos se debe dar siempre con el prefijo-número que indica el nivel de ADN: 1C, 2C, 4C, 1cx, 2Cx. (Greilhuber, Dolezel, Lysak, & Bennett, 2005).

El Instituto de Botánica Experimental de la Academia de Ciencias de la República Checa (2014) señala que en la determinación del tamaño nuclear la comparación de las posiciones relativas de los picos G1 correspondientes a los núcleos de muestra y los núcleos aislados a partir de una planta con contenido de ADN

conocida, respectivamente, permite la determinación precisa del contenido de ADN desconocido.

Los valores absolutos en pg de ADN se pueden convertir en el número de pares de bases. El factor de conversión es de 1 pg = 965 millones de pares de bases (MPB) como se muestra en el Tabla 4.

Tabla 4. Tamaño del genoma nuclear de genotipos de Musa estimado por citometría de flujo*, Instituto de Botánica Experimental de la Academia de Ciencias de la República Checa (2014).

Genotipo	Genoma	2C DNA Content (pg)		1C DNA (Mpb)
		Mean	CV [%]	
<i>M. balbisiana</i>	BB	1,14	2,57	552
<i>M. acuminata</i>	AA	1,23	1,48	593
<i>Pisang Mas (Austria)</i>	AA	1,25	1,62	605
<i>M. acuminata errans</i>	AA	1,26	1,72	606
<i>Pisang Mas (Malaysia)</i>	AA	1,26	1,14	607

* *Glycine max* cv. "Polanka" (contenido de ADN 2C = 2,50 pg) fue utilizado como un estándar de referencia interna.

2.6.3. Tipos de fluorocromos usados en citometría de flujo.

McCarthy (2007), explica que el fluorocromo empleado para estimar el contenido de ADN nuclear de las muestras de estudio debe unirse estequiométricamente con los ácidos nucleicos, por lo que la emisión de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de ADN nuclear. Existe una amplia gama de fluorocromos que se unen específicamente al ADN, pero solamente unos pocos son adecuados para la cuantificación de su contenido en plantas (Tabla 5).

Tabla 5. Características básicas de los principales fluorocromos de ADN utilizados en el análisis de citometría de flujo de plantas (McCarthy, 2007).

Fluorocromos	Modo de unión	Concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Nivel óptimo de excitación (nm)	Nivel óptimo de emisión (nm)
Bromuro de etidio	Intercalante	50-150	523	603
Yoduro de propidio	Intercalante	50-150	538	617
DAPI 4',6-diamidino-2-fenilindol	AT-selectivo	2-4	359	461
Hoechst 33258	AT-selectivo	2-4	352	455
Mitramicina	GC-selectivo	50-100	445	575

Se encontró que el fluorocromo DAPI era bueno para la tinción, ya que se une específicamente al ADN bicatenario (dsDNA) independiente de la estructura de la cromatina, resultando en picos con un bajo coeficiente de variación (CV) pero se une preferentemente a las porciones ricas en AT del ADN de doble cadena (Zhu et al. 2012). En general se acepta que fluorocromos que muestran de preferencia base (DAPI) no se deben utilizar para la estimación del contenido de ADN nuclear en los casos en que el contenido de la base de un control y una muestra difieren (Dolezel, Sgorbati, & Lucretti, 1992).

De la misma manera, Partec (2013), indica que análoga a la tinción de las células de mamíferos, el ADN nuclear de una planta es estequiométricamente teñido por fluorocromos de ADN como DAPI, Hoechst, yoduro de propidio y muchos otros. Es así que el fluorocromo DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol) resultó ser superior para la tinción del ADN nuclear con respecto a la mayor parte de las aplicaciones y que la mayoría de los kits de reactivos de Partec se basan en este tinte. Según Partec, DAPI combina la rapidez y la facilidad en la tinción de muestras con resultados de alta resolución a un coste razonable. Además, debido al riesgo de salud bajo, el manejo de este fluorocromo es más fácil y más conveniente que el manejo de otros colorantes de ADN.

2.6.4. Referencia interna y externa para el análisis de ploidía.

Galbraith, Lambert, Macas, & Dolezel (2013) en sus múltiples experimentos nos detallan que el uso de microesferas fluorescentes como referencia para la calibración y la alineación de los citómetros de flujo es crítico y debe ser empleada de forma rutinaria. Por otra parte, los autores consideran esencial la utilización de referencias internas para las aplicaciones que implican el análisis comparativo de contenido de ADN nuclear de la planta.

Para el cribado a gran escala de niveles de ploidía, las referencias internas pueden ser menos importantes. El análisis secuencial de muestras incógnitas seguido de plantas de estatus de ploidía conocida es por lo general suficiente para afirmar la estabilidad del citómetro. Para las mediciones que requieren una mayor precisión por ejemplo, la detección de aneuploidía, la referencia interna es esencial.

Galbraith *et al.* (2013), también remarcan el uso de referencias internas también es importante en el análisis del tamaño del genoma. Para mayor consistencia, se recomienda que el contenido de ADN de estos patrones esté determinado usando algún método que sea independiente de la fluorescencia.

Finalmente, los mismos autores concluyen que la variación intraespecífica en el contenido de ADN se ha observado en algunas especies de plantas por lo que el análisis de citometría de flujo se caracteriza generalmente por un alto grado de resolución, con Coeficiente de variación que va desde el 1 % al 3 %. Cabe señalar que esta precisión está relacionado con la precisión de las mediciones individuales y no informa directamente la reproducibilidad de la estimación de ADN contenido. Por ello es importante llevar a cabo suficientes experimentos independientes tanto para proporcionar la significación estadística y para descubrir cualquier variación inesperada.

El Instituto de Botánica Experimental de la Academia de Ciencias de la República Checa (2014) expone que cuando el instrumento se calibra usando núcleos aislados a partir de una planta con la ploidía conocida, por ejemplo, $2n$ (la posición del pico G1 se registra), todas las demás muestras se caracterizan por la posición relativa de sus picos G1 y las unidades son por lo tanto C-valores.

El Instituto también señala que cuando se utiliza una referencia interna en el análisis de citometría, los núcleos de la referencia con la ploidía conocida y los núcleos de la muestra son aislados, teñidos y analizados simultáneamente. La ploidía del ADN de la muestra se calcula entonces usando la relación de los picos de G1 (las unidades son "C-valores"). Las referencia interna elimina el riesgo de error debido a variaciones en la preparación de muestras y la inestabilidad del instrumento. Ésta se recomienda para la estimación precisa de la ploidía del ADN sobre todo cuando se sospecha de aneuploidía (Gráfico 9).

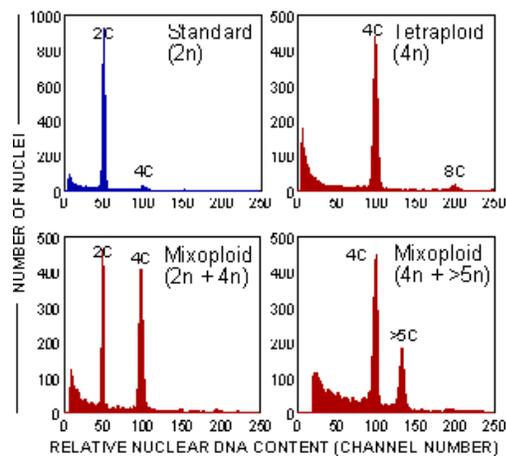


Gráfico 9. Análisis por citometría de flujo: Referencia externa (superior) y referencia interna (inferior).

2.6.5. Análisis y procesamiento de los datos en citometría de flujo.

Gómez (2012) explica que los citómetros producen una gran cantidad de información que puede ser guardada en forma de histogramas (histogramas

monoparamétricos de 256 o 1024 canales, histogramas biparamétricos de 64 x 64 = 4096 puntos) o en modo LISTA (*list mode*) que consiste en guardar toda la información obtenida para cada evento de modo que se pueden modificar las regiones de análisis y reconstruir los histogramas en función de nuevos parámetros de selección. Para evitar interpretaciones subjetivas y aprovechar al máximo la información obtenida es necesario la ayuda de la informática y pruebas matemáticas estadísticas.

El mismo autor señala que la citometría de flujo permite el estudio de múltiples características celulares combinando las lecturas sobre señales de dispersión de luz y señales fluorescentes. Así mismo, el empleo de fluorocromos con longitudes de onda de excitación compatibles con la fuente de luz del citómetro (generalmente 488 nm, pero pueden ser otras) y con distintos espectros de emisión posibilita el estudio simultáneo de varias propiedades o características sobre células incluso en muestras heterogéneas.

Es así que el autor propone tres tipos de datos para su análisis y procesamiento:

- Datos univariantes (histogramas monoparamétricos): Suelen ser representados como un histograma. Un método rápido y sencillo de interpretación es la observación del histograma y la ayuda del soporte informático del citómetro para calcular el porcentaje de eventos en regiones seleccionadas. Hay que tener en cuenta la resolución del histograma para la discriminación de la señal y el CV (en un histograma de 100 canales con un CV del 2 % no se podrían discriminar 32 picos de cromosomas).
- Métodos no paramétricos: se basan en la observación del histograma y posición de los cursores (células positivas, etc.). Un problema especial son las muestras con baja fluorescencia que se diferencian poco del negativo (generalmente una subpoblación puede ser claramente identificada si

tiene un elevado número de células o alta señal fluorescente), se emplean métodos de normalización y sustracción de la señal con comparaciones de curvas. En ocasiones puede ser útil la suavización (*smooth*) del contorno del histograma (también en análisis del ADN con pocos eventos). La transformación o uso de escalas logarítmicas es útil en caso de que la señal sea muy amplia o se halle muy dispersa puesto que agrupa los canales de señal alta y permite diferenciar igualmente el control negativo.

- Métodos paramétricos: en algunos casos por la dificultad de interpretación de los datos y la elevada información que contiene es necesario aplicar modelos matemáticos. En ellos se emplean conversiones matemáticas de los histogramas y sus datos a curvas o ecuaciones. Se usan en el análisis de las distribuciones de ADN y modelos de cinética celular.
- Datos bivariantes (histogramas biparamétricos): En los métodos no paramétricos se emplean porcentajes, canales y CV de ventanas o regiones amorfas de análisis. Se presentan como histogramas biparamétricos con dos ejes y el número de eventos se representa como densidad de puntos, colores, o líneas isométricas.
- En el análisis multiparamétrico la principal dificultad es la limitación humana de poder manejar cómodamente y de forma comprensible información relativa a más de tres variables simultáneamente.

3. MARCO OPERACIONAL.

3.1. Ubicación del ensayo.

La presente investigación se realizó en el Departamento de Biotecnología de la Estación Experimental del Litoral Sur, “Dr. Enrique Ampuero Pareja”, del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). Está ubicada entre las coordenadas geográficas 2°15'15" latitud Sur y 79°30'40" de longitud occidental, en el km. 26 al este de Guayaquil en la vía Durán – Tambo, parroquia Virgen de Fátima, cantón Yaguachi, provincia del Guayas, La temperatura promedio es de 24,6 °C con una altitud de 17 msnm, precipitación promedio anual de 1398 mm y 83 % de humedad relativa media¹.

3.2. Materiales.

Los materiales y los reactivos que se utilizaron en el presente trabajo de investigación, así como los equipos se detallan a continuación:

Materiales de laboratorio.

- Filtros desechables *celltrics*®, Partec, para aislamiento de núcleos celulares de 50 µm.
- Tubos para muestra de 3.5 ml (no. 04-2000).
- Guantes de nitrilo
- Hojas de *Gillette*
- Bisturí no. 22
- Cajas Petri
- Papel secante

¹ <http://www.municipiodeyaguachi.gob.ec/Datos.html>

- Marcadores y bolígrafos
- Tijera

Reactivos

- Agua destilada estéril.
- Para extracción y tinción de núcleos:
 - Kit de tinción *cystain UV precise P*, Partec, incluye: búfer de extracción de núcleos y búfer de tinción DAPI.
 - *Control de calidad y calibración inicial:*
 - Calibración *beads UV* (núm. 05-4019), Partec.
 - Control de ADN UV, Partec.
- Para conservación de muestra y como antioxidante:
 - Polivinilpirrolidona o povidona abreviado pvp al 1 %.
 - Mercaptoetanol 0.1 %.
- Para limpieza y descontaminación del citómetro:
 - Solución de limpieza (orden-no. 04-4009)
 - Solución de descontaminación (orden-no. 04-4010)
 - Solución de hipoclorito (orden-no. 04-4012).
- Solución envolvente (*sheat fluid*)
 - Azida de sodio, 0.04 %.
 - *Tween 20*, 0.01 %

Equipo

- Citómetro de flujo: analizador de ploidía (DAPI + PI), marca Partec. Modelo: 11-01-1004
- Micropipetas.
- Temporizador digital.

3.3. Material vegetal.

Para el presente estudio se utilizaron, plantas de banano del clon “Williams” del subgrupo Cavendish que corresponden al Proyecto de Mutagénesis Inductiva en Banano, que se ha conducido en el INIAP.

3.4. Tratamientos estudiados.

Los tratamientos estudiados fueron dos, los explantes de banano cv. *Williams*, que fueron irradiados con rayos Gamma y los tratados con el agente químico mutagénico Etilmetanosulfonato (EMS), dentro de cada tratamiento se empleó seis dosis distintas. El listado de los tratamientos estudiados se indica a continuación:

Tratamiento 1		Tratamiento 2	
<u>Rayos Gamma (Gy):</u>		<u>Etilmetanosulfonato:</u>	
Dosis 1	20 Gy	Dosis 1	0,5 % - 1 hora
Dosis 2	40 Gy	Dosis 2	0,5 % - 3 horas
Dosis 3	50 Gy	Dosis 3	0,5 % - 9 horas
Dosis 4	60 Gy	Dosis 4	1 % - 1 hora
Dosis 5	80 Gy	Dosis 5	1 % - 3 horas
Dosis 6	100 Gy	Dosis 6	2 % - 3 horas.

3.5. Características de los rayos Gamma.

En el caso de los bananos, el proceso de mutación consiste en irradiar miles de plántulas con dosis de rayos gamma o rayos X que provocan mutaciones aleatorias. A continuación se procede a filtrar los resultados para ver si las mutaciones han afectado a los genes en una dirección que apunte hacia el rasgo al que se aspira: en este caso, la resistencia a la Sigatoka negra. Fundamentalmente, cuanto mejor sea la técnica de filtrado, mayor será la probabilidad de detectar con rapidez una variante única de banano mejorado (Revista El Agro, 2014).

3.6. Características del mutagénico EMS.

El metasulfonato de etilo o etilmetanosulfonato (EMS) es un compuesto orgánico mutagénico, teratogénico, y posiblemente carcinogénico con fórmula $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{C}_2\text{H}_5$, mutagénico en las plantas y los animales y cancerígeno en los mamíferos. Se ha utilizado como un agente alquilante en estudios de los procesos de reparación del ADN (Sigma-Aldrich, 2014).

Produce mutaciones al azar en el material genético por medio de la sustitución de nucleótidos; particularmente por alquilación de guanina. Esto suele producir mutaciones puntuales solamente. El grupo etilo del EMS reacciona con la guanina en el ADN, formando la base anormal O-6-ethylguanine. Durante la replicación del ADN, el ADN polimerasa que catalizan el proceso con frecuencia, coloca timina en lugar de citosina, oponiéndose a O-6-etilguanina. Siguiendo las siguientes rondas de replicación, la pareja base original GC puede llegar a convertirse en la pareja AT (una mutación de transición). Esto cambia la información genética, es a menudo perjudicial para las células, y puede resultar en enfermedades (Sigma-Aldrich, 2014).

El EMS es de uso frecuente en la genética como un mutágeno. Las mutaciones inducidas por EMS a continuación, se pueden estudiar en exámenes genéticos u otros ensayos (Real Sociedad de Química, 2013).

3.7. Manejo del ensayo.

3.7.1. Colecta de muestras vegetales para el análisis de citometría.

Para el caso se procedió a realizar un pequeño corte de la hoja más tierna de la planta, o de la hoja cigarro de aproximadamente unos 5 cm^2 , la muestra debe estar intacta, libre de parásitos o enfermedades que afecten la calidad de la muestra.

También se colectó una muestra control para la comparación de los mutantes y que fue utilizada como estándar interno, Banano Orito (*Pisang mas*, AA) puesto que los mutantes tratados son triploides (Var. Williams).

Al momento de tomar la muestra, se limpió la misma rociándole PVP al 1 %, se la introdujo en el sobre identificado previamente, humedecido con la misma sustancia; de la misma manera se procedió a coleccionar las muestras que serían procesadas para cada análisis (Gráfico 10).

Finalmente, se colocaron todas las muestras en una caja húmeda para luego ser llevadas al laboratorio.

Ya en el laboratorio, las muestras fueron lavadas y enjuagadas, después, se sumergieron en un recipiente con PVP al 1 % para la buena conservación de las muestras.



Gráfico 10. A) Disposición de las plantas de banano por dosis. B) Sobres identificados y botellas con PVP 1 %. C) Selección de la hoja. D) Corte de un segmento de la hoja de la planta de banano a ser colectada.

3.7.2. Determinación de ploidía mediante citometría de flujo.

Para realizar el análisis de ploidía y contenido relativo de ADN nuclear, se utilizó el equipo de citometría de flujo de marca Partec Modelo: 11-01-1004, para realizar las mediciones dicho equipo cuenta como fuente de luz con un LED UV (365 nm) y un láser Nd-YAG verde a 532 nm (30 mW). Para el análisis en este ensayo se utilizó la LED UV puesto que se trabajó con el fluorocromo DAPI que solamente es excitado con luz UV.

3.7.2.1. Protocolo inicial del citómetro de flujo.

Para descartar cualquier anomalía por contaminación de las muestras procesadas en el citómetro de flujo, se realizó la limpieza exhaustiva del citómetro, actividad que se describe a continuación:

- a. Se cargó en un tubo de muestras con 1 mL de solución de hipoclorito al 0.5 % y se presionó *Start*, se dejó correr hasta que el equipo terminó de hacer la medición.
- b. Se repitió el procedimiento con la solución para descontaminación y con el *sheat fluid* (solución envolvente).

3.7.2.2. Control de calidad en el citómetro de flujo.

Posteriormente, se realizó la primera medición y calibración a modo de control de calidad con el control de ADN UV de *Partec*; para esto se colocó con una micropipeta 1 mL de éste control en un tubo de muestra, se cargó en el citómetro y se presionó *Start*, se controló y ajustó el valor del *Lower level* y el *Gain* en el software del citómetro, hasta ajustar el pico del histograma en el eje de las abscisas en el canal 50.

3.7.2.3. Calibración del control estándar de referencia interno.

Para la realización de las mediciones de la ploidía de los mutantes de banano cv. *Williams* del ensayo, se procedió a calibrar en el canal 100 la especie que se utilizó como control de referencia interno, banano Orito (*Pisang mas*, AA), para esto, se tomó aproximadamente 0.5 cm² de la muestra del control (diploide), y se colocó en una caja Petri, se añadió 400 µL de *buffer* de extracción de núcleos del Kit *Cystain UV Precise P*, se troceó con un *Gillette* rápidamente y se dejó incubar por 30 segundos.

Transcurrido el tiempo en el *buffer* de extracción, se tomó el preparado y se lo filtró a un tubo de muestra a través de un filtro de 50 µm. Previamente en el tubo se agregó 150 µL de mercaptoetanol al 0.1 %. Luego, se agregó 700 µL de *buffer* de tinción y se dejó incubar a temperatura ambiente en oscuridad por 1 minuto.

Finalmente, cumplido el tiempo, se colocó el tubo con la muestra preparada en el citómetro y se corrió la muestra, el pico que fue formando en el histograma fue ajustado para que sea procesado en el canal antes señalado del eje de las abscisas, para esto se debió ajustar los valores del *gain* y del *lower level*, estos valores oscilan entre 560 voltios y 0.50 respectivamente. La velocidad predeterminada para el flujo de la muestra fue de 0.4 µL/s.

3.7.2.4. Ploidía de los mutantes de banano cv. Williams mediante citometría de flujo.

Una vez que se calibró el citómetro con el control de referencia interno diploide, se guardó el *script* con los valores ajustados del *Lower level* (0.50) y del *Gain* 560 voltios y la velocidad de 0.4 µL/s, se procedió a realizar la medición de la ploidía de las muestras colectadas, igual que en el procedimiento anterior, se tomó aproximadamente 0.5 cm² de la muestra del mutante colectada (triploide)

y del control (diploide), y se las colocó juntas en una caja Petri, se añadió 400 μL de buffer de extracción de núcleos y a continuación se troceó con el *Gillette* rápidamente, para después incubar la muestra por 30 segundos.

Transcurrido el tiempo en el buffer de extracción, se tomó el preparado y se lo filtró a un tubo de muestra a través del filtro de 50 μm . De la misma manera se agregó 150 μL de mercaptoetanol al 0.1 %.

Después, se adicionó 700 μL de buffer de tinción, dejándolo incubar a temperatura ambiente en oscuridad por 1 minuto.

Finalizado el tiempo se coloca el tubo con la muestra preparada en el citómetro y se corre la muestra, como previamente se configuró el *script* con el control de referencia interno (diploide) en el canal 100 del eje horizontal, al analizar la muestra los núcleos de la planta mutante (triploide) procesada aparecieron por el canal 150, puesto que éstos núcleos son más grandes que los analizados en el canal 100, debiendo realizar pequeños balances en el *gain* no pasando los 565 voltios y haciendo un corte con el botón *clear* para reducir la presencia de *debris* en el histograma, éste *debris* aparece debido a la presencia de sustancias en el citosol (fenoles) o por núcleos fragmentados.

Todas las muestras fueron analizadas utilizando los mismos parámetros de medición.

Para dar por terminada la medición en el citómetro, se puede considerar fijar el límite de conteo de núcleos en 1000, o esperar que el citómetro termine de analizar 120 μL que es el límite contado en el citómetro, luego se guarda con el nombre correspondiente el histograma obtenido, obteniéndose archivos de extensión *fcs*, que fueron analizados por el software especializado. El Gráfico 11 explica los pasos realizados para éste experimento.

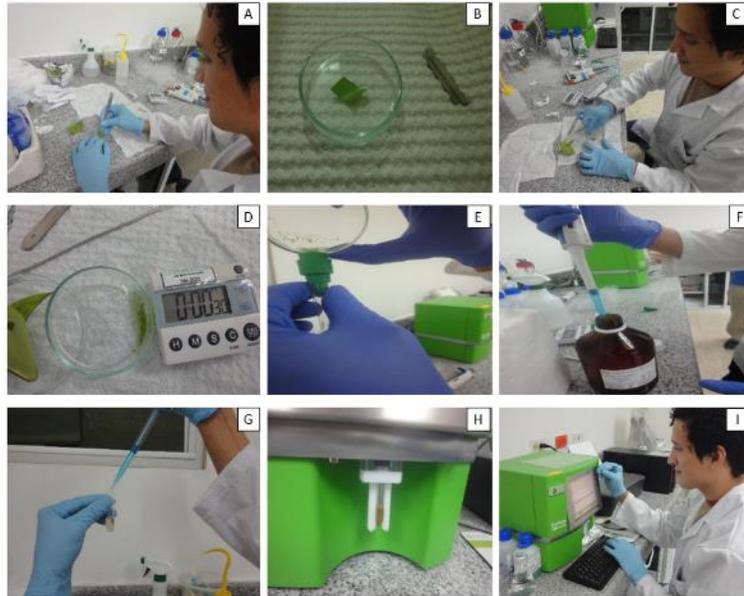


Gráfico 11. A: Corte de 0.5 cm² de ambas muestras di y triploide. Colocación de las muestras en la caja Petri. C: *Chopping* de la muestra en el buffer de extracción de núcleos. D: Incubación por 30 segundos en el buffer de extracción. E: Filtrado de la muestra en el tubo con mercaptoetanol al 0.1 %. F y G: Adición del fluorocromo DAPI. H: Colocación de la muestra en el citómetro para el análisis. I: Corrida de la muestra en el citómetro de flujo.

3.7.2.5. Determinación del contenido del ADN nuclear.

Para la determinación del contenido relativo de ADN nuclear que permitió valorar la influencia de los diferentes tratamientos, se realizó comparando las posiciones relativas de los picos G1 correspondientes a los núcleos de muestra y los núcleos aislados a partir de una planta con contenido de ADN conocida, respectivamente, lo que permitió la determinación precisa del contenido de ADN "desconocido", el cálculo estuvo dado por la siguiente fórmula (Doležel, 1995):

$$\text{Contenido de ADN de la planta de interés} = \frac{\text{Media del pico de la fase G1 de la planta de interés}}{\text{Media del pico de la fase G1 de la planta de referencia}} \times \text{Contenido de ADN de la planta de referencia}$$

Las unidades del ADN se expresaron en picogramos y se empleó el término *kC* para resaltar la ploidía de las células. En éste caso se trabajó con el clon Williams cuya ploidía es AAA (3C). Los valores absolutos en pg de ADN se convirtieron a número de pares de bases. El factor de conversión es de 1 pg = 965 millones de pares de bases (MPB) (Doležel, Bartos, Voglmayr, & Greilhuber, 2003).

El tamaño de genoma nuclear o contenido de ADN 2C (pg) de la planta de referencia Orito (*Pisang mas*, AA) es: 1.26 picogramos; CV % (1.14); 607 Mpb (Doležel, Doleželová, & Novák, 1994).

3.8. Variables evaluadas.

Las variables evaluadas en el presente trabajo de investigación fueron:

3.8.1. Ploidía de los mutantes de banano.

En las irradiaciones efectuadas con Rayos Gamma y en el mutagénico químico Etilmetanosulfonato, la ploidía fue determinada por la distribución de los picos formados y analizados en los respectivos canales del histograma en el eje de las abscisas, mostrándose el pico del control interno diploide (AA) en el canal 100 y el mutante cuya ploidía fue analizada en el canal 150. Para determinar la resolución de los histogramas y comparar la variación respecto del control interno, se relacionó los coeficientes de variación obtenidos de los núcleos procesados en el histograma.

3.8.2. Contenido relativo de ADN nuclear.

El contenido relativo de ADN determinado en las plantas de banano mutantes con Rayos Gamma y Etilmetanosulfonato se obtuvo mediante la relación que

existe en el radio de los picos de la fase G1 y G2 de los materiales analizados tanto del control como del mutante comparando con el ADN del control conocido. Los valores son expresados en picogramos (pg) y en millones de pares de bases MPB.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1. Ploidía de mutantes de banano irradiado con rayos Gamma.

Los análisis realizados a todas las plantas mutantes de banano irradiadas, reflejaron en los histogramas la presencia del pico correspondiente en el canal 150, presentando ligeras variaciones en cuanto a la ubicación respecto del canal ± 10 , mientras que el pico del control de referencia interna Orito (*Pisang mas*, AA), se apreció en el canal 100, presentando similares características de variación al mutante evaluado. Un histograma por cada dosis fue tomado para la representación o *screening*, de la ploidía de los mutantes de banano por cada dosis.

Se realizó el análisis de la ploidía de una planta de banano cv. Williams como testigo para los dos tratamientos, todos los histogramas fueron comparados con el testigo para apreciar la variación generada. Los datos obtenidos mediante citometría de flujo del tratamiento con rayos gamma, fueron analizados con el programa de modelado matemático *Modfit Lt 4.1* (*Verity Software House, USA*), los resultados de los análisis en los histogramas confirmaron que no hubo ningún cambio en la ploidía de los mutantes tratados con rayos Gama, en ninguna de las diferentes dosis expresadas, tal como se muestra en los **Gráficos 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18**, que, en su orden, corresponden a las dosis 20, 40, 50, 60, 80 y 100 Grays.

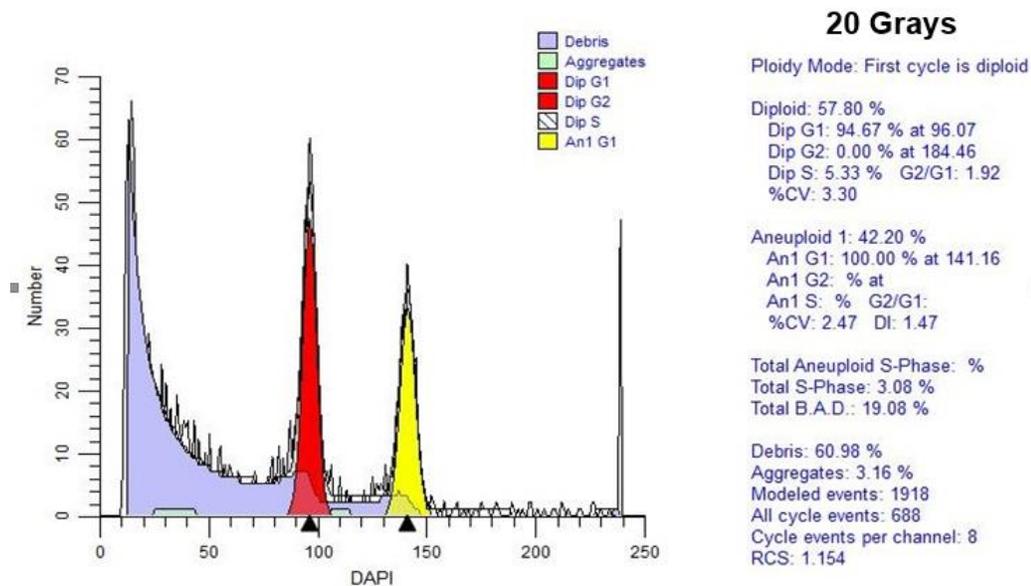


Gráfico 12. Histograma obtenido de la planta 35, mediante citometría de flujo de la dosis de 20 Grays. UCSG, 2015.

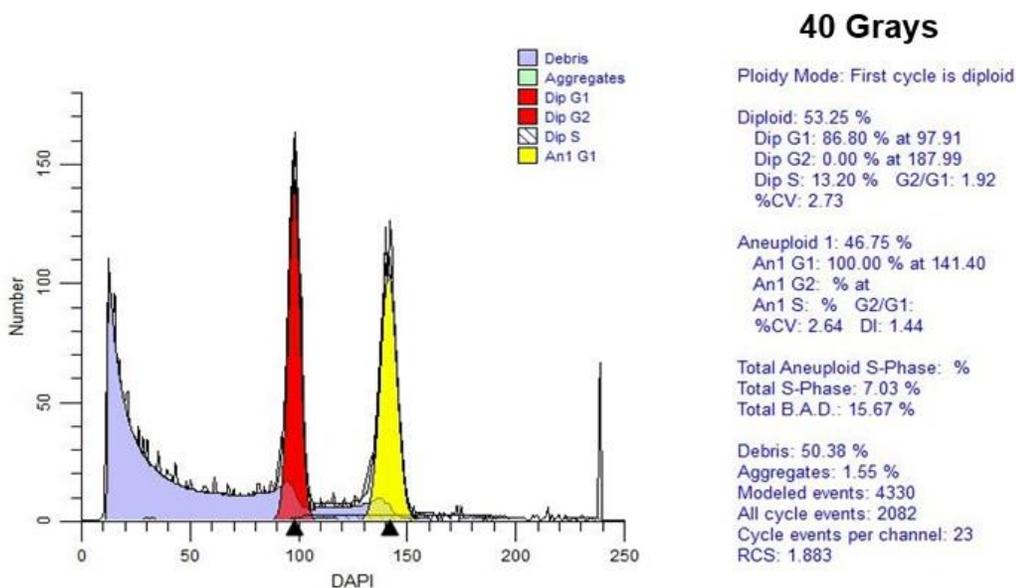


Gráfico 13. Histograma obtenido de la planta 15, mediante citometría de flujo de la dosis de 40 Grays. UCSG, 2015.

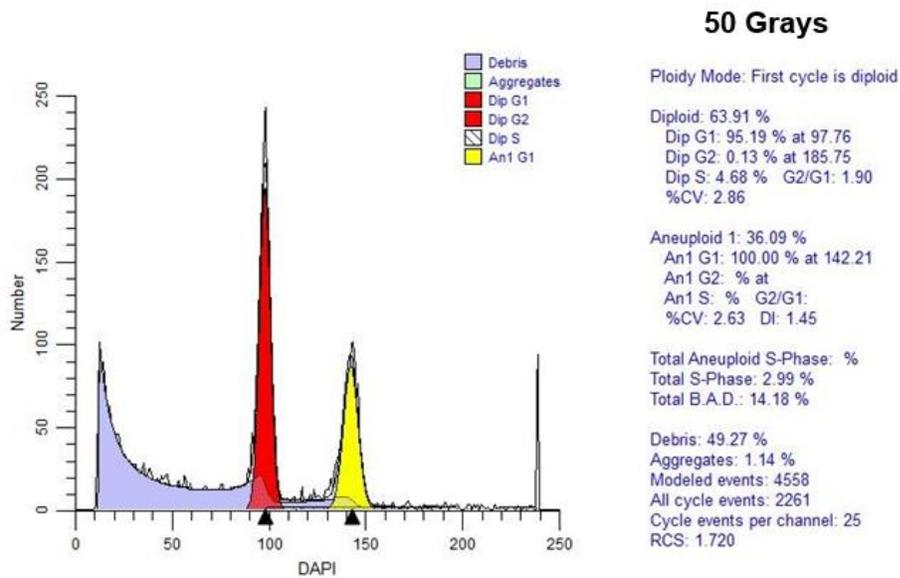


Gráfico 14. Histograma obtenido de la planta 10, mediante citometría de flujo de la dosis de 50 Grays. UCSG, 2015.

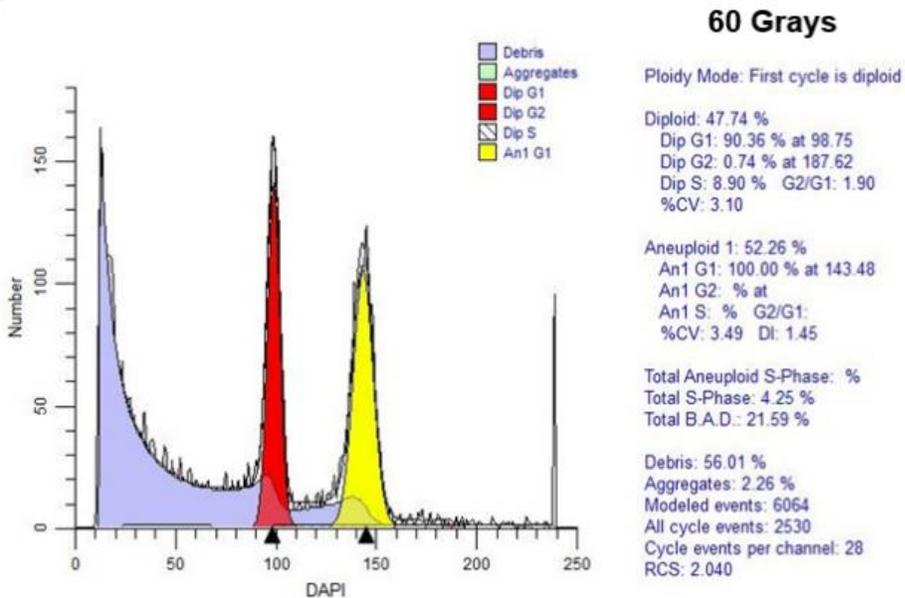


Gráfico 15. Histograma obtenido de la planta 90, mediante citometría de flujo de la dosis de 60 Grays. UCSG, 2015.

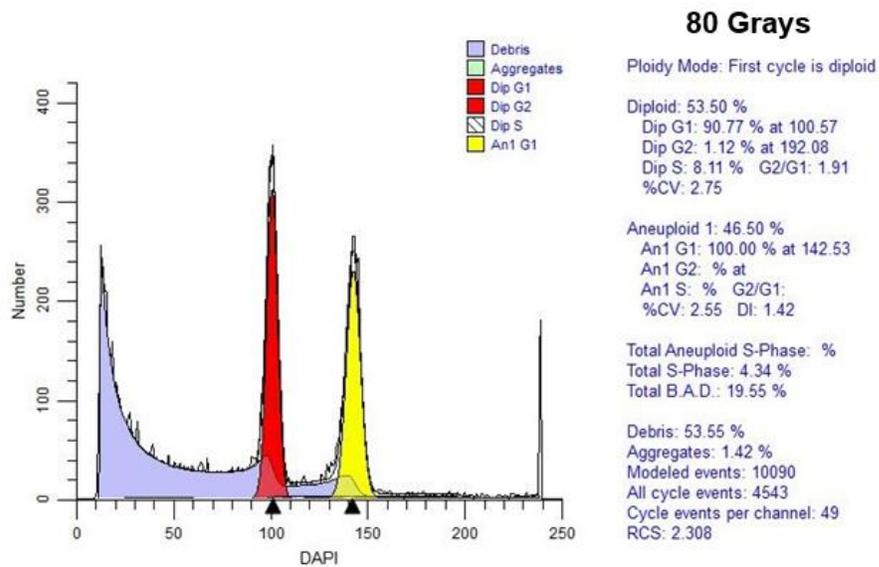


Gráfico 16. Histograma obtenido de la planta 45, mediante citometría de flujo de la dosis de 80 Grays. UCSG, 2015.

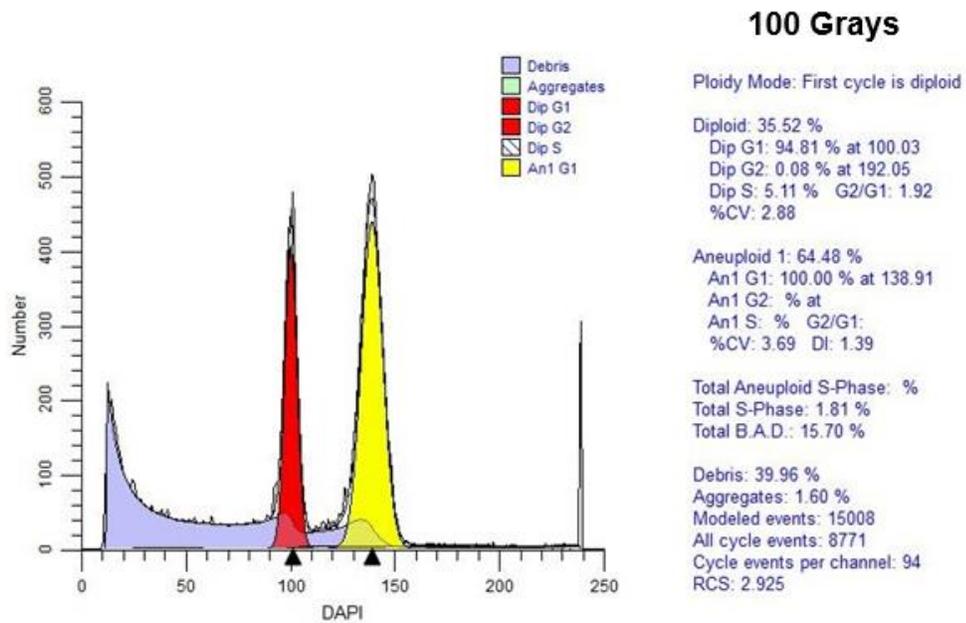


Gráfico 17. Histograma obtenido de la planta 29, mediante citometría de flujo de la dosis de 100 Grays. UCSG, 2015.

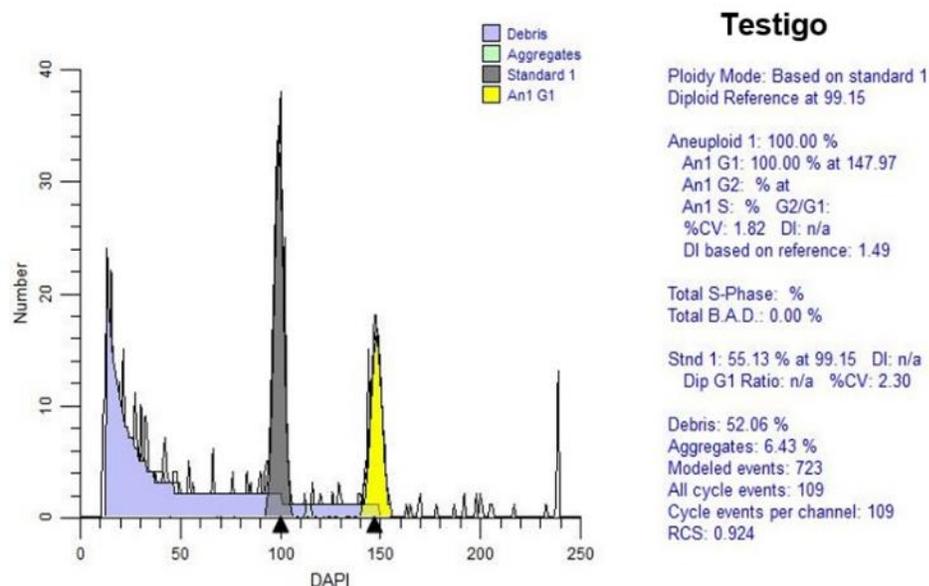


Gráfico 18. Histograma obtenido mediante citometría de flujo del testigo. UCSG, 2015

Según Salameh (2014) ésta técnica, se recomienda para la estimación precisa del contenido de ADN nuclear.

Los resultados de estudios anteriores con agentes mutantes en especies vegetales (Reyes, 2007), nos dice que los tratamientos mutagénicos, provocan trastornos histogénicos a nivel de tejidos y a nivel molecular, causando cambios aleatorios en el ADN nuclear o en los orgánulos citoplasmáticos, dando como resultado mutaciones genómicas, cromosómicas o en un gen, creando un índice de variabilidad genética, pero muchas veces la ploidía no se ve afectada.

En el ensayo realizado se pudo apreciar en los histogramas la variación de la ubicación de los picos en el eje de las abscisas, demostrando que a mayor intensidad de irradiación, se presentaron varios eventos mutacionales por célula gracias a dicha inducción, confirmando lo establecido por Shadia, Othman & Chai (2002), esto aumenta las posibilidades de que una mutación favorable está acompañada por uno o más desfavorables cambios genéticos. Basándose en los

resultados de los histogramas obtenidos, los niveles de ploidía no fueron afectados por ninguna dosis de irradiación con rayos Gamma, concluyendo los mismo resultados del experimento llevado por Shadia *et al.*, 2002.

En cuanto a la comparación de las medias de los coeficientes de variación individuales de cada pico del histograma (**Tabla 6 y Gráfico 19**), se observó que hubo variación para todas las dosis analizadas por citometría, a excepción de la dosis de 20 Grays. Mientras que en la dosis de 100 y 40 Grays se aprecia la mayor variación en el contenido de ADN producto de la mutagénesis. Estos resultados, no difieren de los sugeridos por el Instituto de Botánica Experimental de la Academia de Ciencias de la República Checa (2014), que señala la presencia de ésta variación.

Tabla 6. Comparación de las medias de los coeficientes de variación individuales de cada pico en el histograma, de los mutantes irradiados. UCSG, 2015.

CV %	DOSIS					
	20gy	40gy	50gy	60gy	80gy	100gy
Control Interno	4.44	3.00	3.34	3.01	3.23	3.54
Mutante	3.00	3.50	3.38	3.35	3.34	3.54



Gráfico 19. Comparación de los Coeficientes de variación de los mutantes analizados para las dosis con rayos gamma. UCSG, 2015.

Lo observado en los coeficientes de variación, concuerdan con los estudios realizados por la Federación Europea de biotecnología (2014) y Shadia, Othman & Chai (2002) quienes determinaron que producto de los tratamientos mutagénicos se inducen aberraciones cromosómicas estructurales en células que se dividen y que conducen a la distribución desigual de ADN en las células hijas. Esto se reflejó en el aumento en la variación del contenido de ADN nuclear (aumento del coeficiente de variación de G1 y G2 picos). Los valores estimados de relación de pico de estas muestras podrían ser utilizados para discriminar entre las variantes gamma irradiados, químico tratado y las plantas no irradiadas.

4.2. Ploidía de mutantes de banano tratados con el mutagénico Etilmetanosulfonato.

En los **Gráficos 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 26**, que corresponden a las dosis 0.5 % 1 hora, 0.5 % 3 horas, 0.5 % 9 horas, 1 % 3 horas, 1 % 6 horas y 2 % 3 horas, tratadas con el mutagénico EMS, respectivamente, se observaron dos subpoblaciones de células más grandes que el control y la misma planta analizada, apareciendo dicha población en el canal 200, determinándose de ésta manera, la presencia de una planta con mixoploidía (3n y 4n), correspondientes a las dosis 0.5 % 3 horas y 2% 3 horas, refiriéndose como mixoploidía la presencia de células de diferente ploidía en una misma planta (Bioversity, 2005).

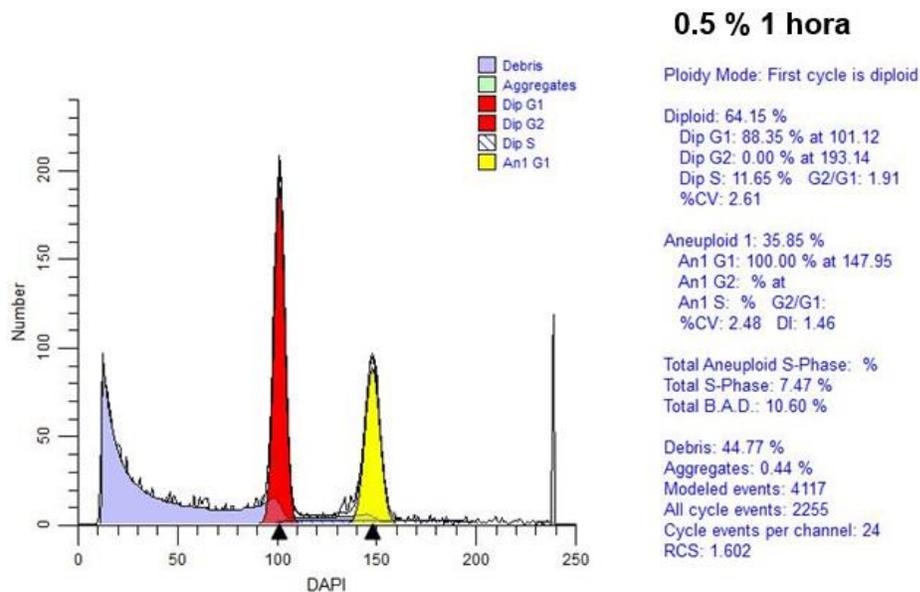


Gráfico 20. Histograma obtenido mediante citometría de flujo de la dosis de EMS 0.5 % 1 hora, planta 24. UCSG, 2015.

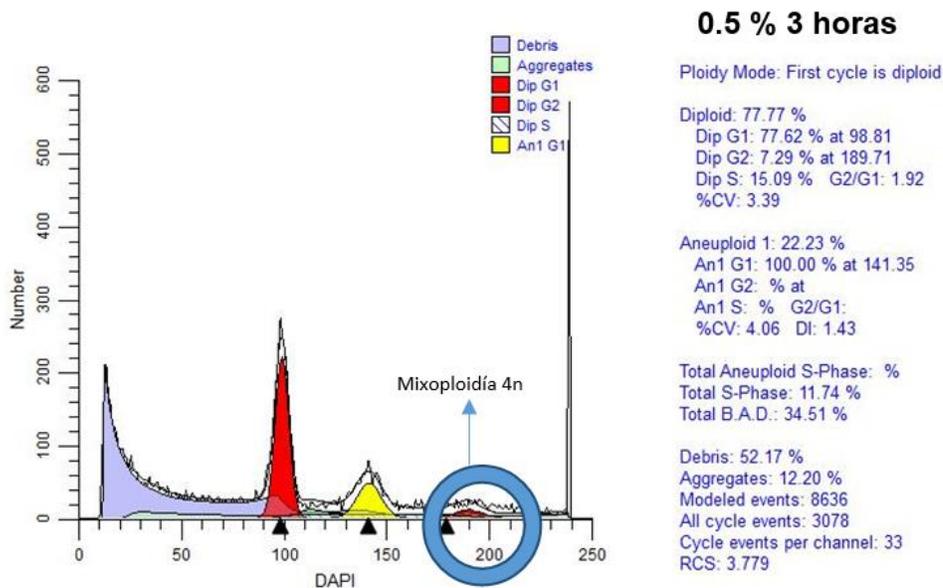


Gráfico 21. Histograma obtenido mediante citometría de flujo de la dosis de EMS 0.5 % 3 horas, planta 11 con mixoploidía (4n). UCSG, 2015.

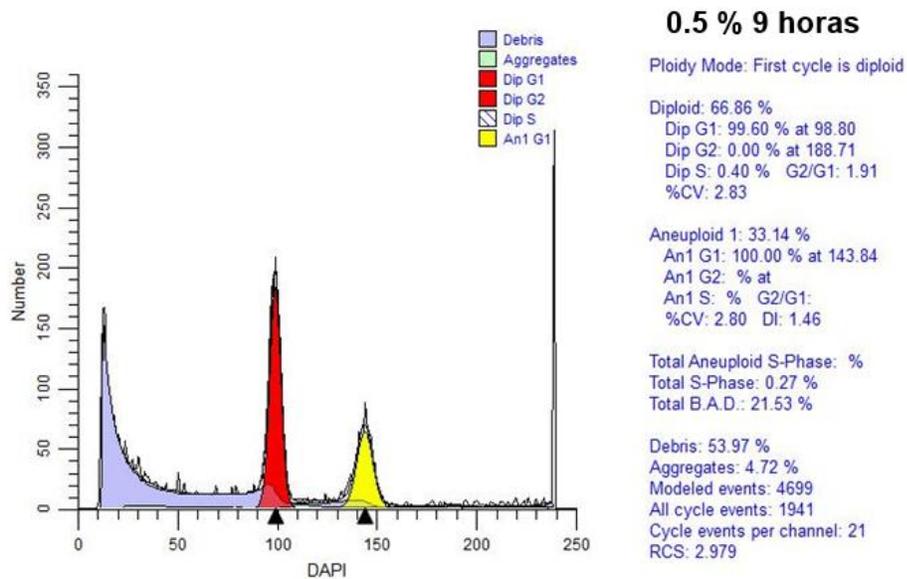


Gráfico 22. Histograma obtenido de la planta 5, mediante citometría de flujo de la dosis de EMS 0.5 % 9 horas. UCSG, 2015.

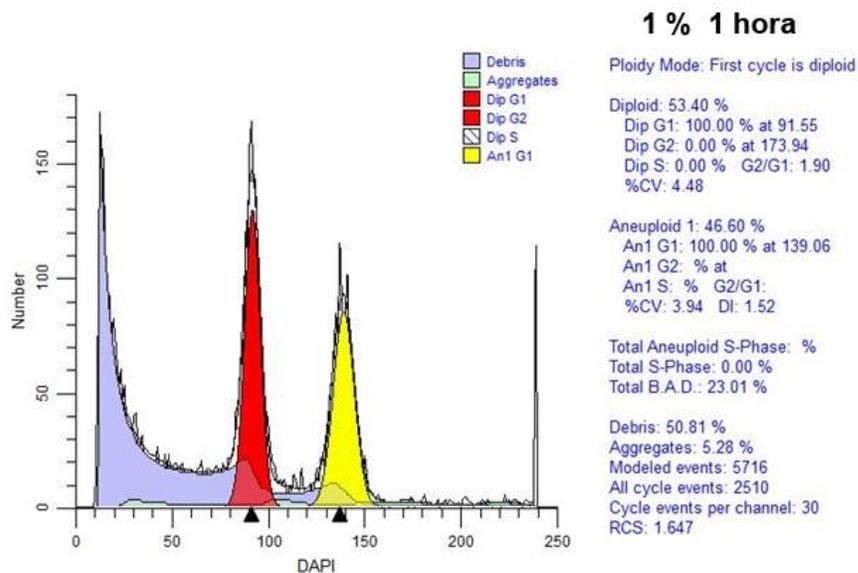


Gráfico 23. Histograma obtenido de la planta 105, mediante citometría de flujo de la dosis de EMS 1 % 1 hora. UCSG, 2015.

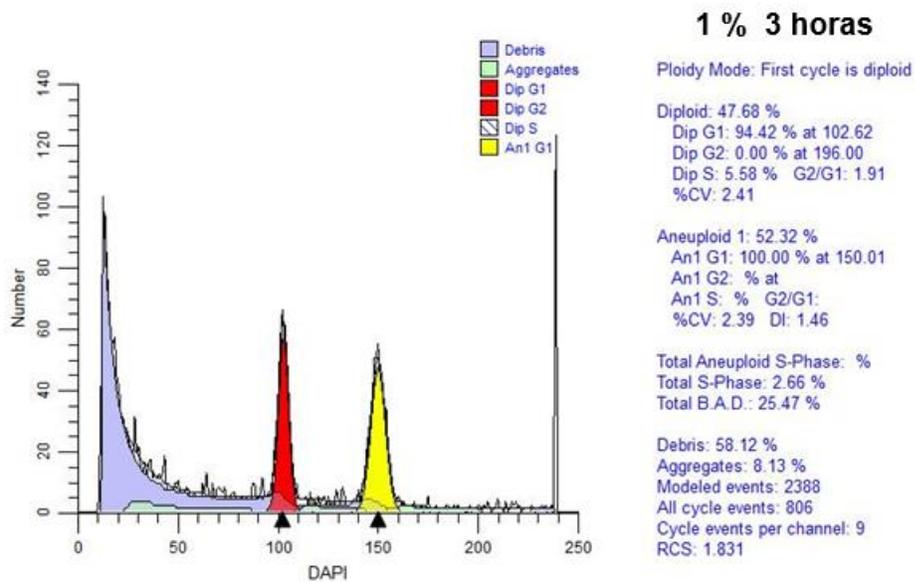


Gráfico 24. Histograma obtenido de la planta 7, mediante citometría de flujo de la dosis de EMS 1 % 3 horas. UCSG, 2015.

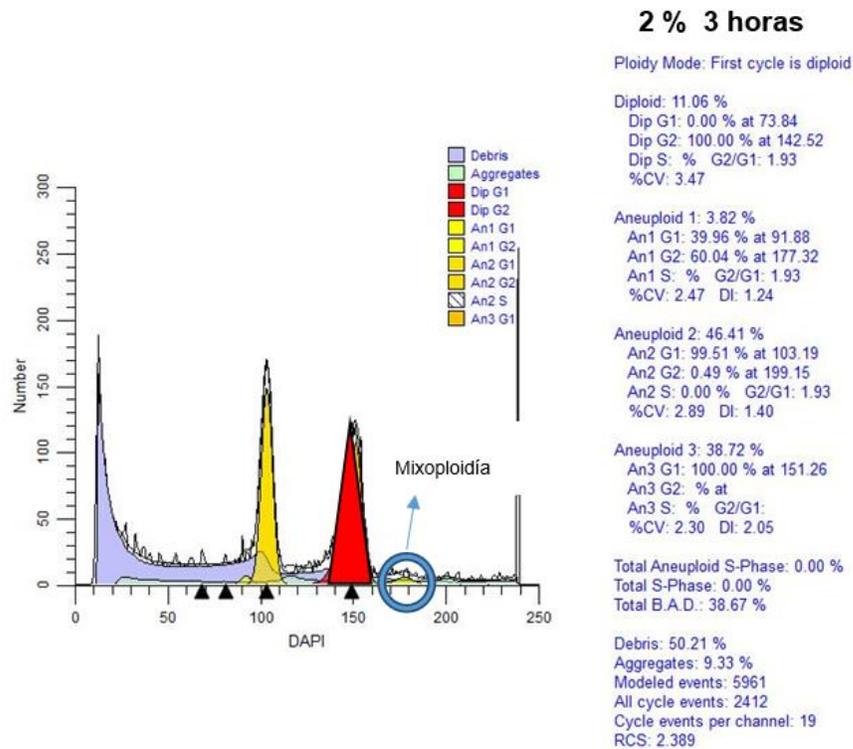


Gráfico 25. Histograma obtenido mediante citometría de flujo de la dosis de EMS 0.5 % 3 horas, planta 121 con mixoploidía (4n). UCSG, 2015.

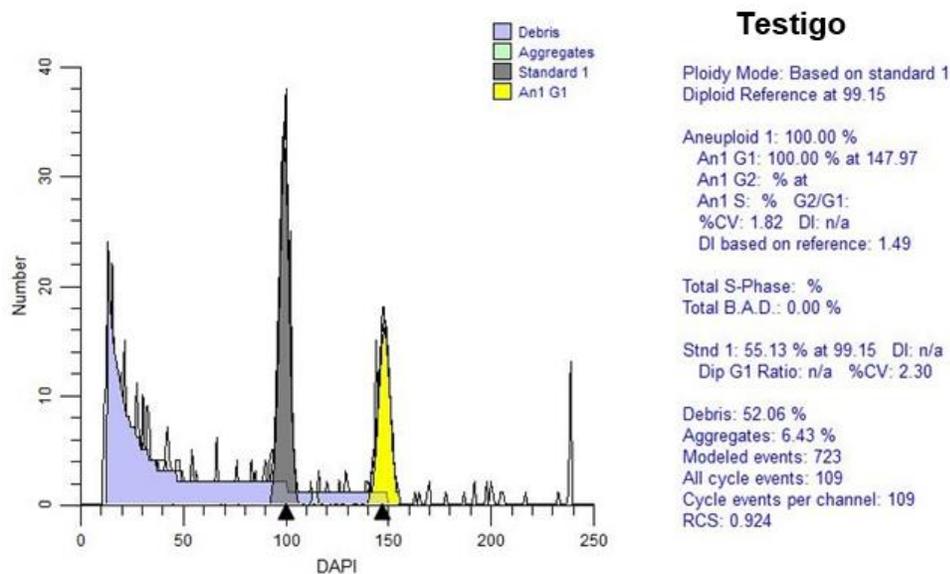


Gráfico 26. Histograma obtenido mediante citometría de flujo del testigo, para las dosis de EMS. UCSG, 2015.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede considerar que el agente mutagénico Etilmetanosulfonato, probó ser más efectivo al momento de inducir cambios en la ploidía de cv. Williams, puesto dicho agente logra acceder a las bases nitrogenadas del ADN alterando y formando una nueva base que altera el orden normal de las uniones génicas, según Salles Pio (2007) la probabilidad de inducir mayor variabilidad aumenta si se utiliza éste agente mutagénico, comprobando los resultados en este ensayo.

En cuanto a la comparación de las medias de los coeficientes de variación individuales de cada pico del histograma tratadas con el mutagénico EMS, se presentan en la **Tabla 7 y en el Gráfico 27**, en donde se observó valores similares a los mutantes irradiados, destacando, la presencia de coeficientes de variación para las subpoblaciones de núcleos en la ploidía de la misma planta

(mixoploidía) en las dosis de 0.5 % 3 horas y 2 % 3 horas, que fueron comparados con el CV de los controles internos.

Tabla 7. Comparación de las medias de los coeficientes de variación individuales de cada pico en el histograma, de los mutantes tratados con EMS. UCSG, 2015.

CV %	DOSIS					
	0.5 % 1 hora	0.5 % 3 horas	0.5 % 9 horas	1 % 1 hora	1 % 3 horas	2 % 3 horas
Control Interno	3.15	3.27	2.80	3.25	2.82	3.07
Mutante	3.21	3.44 (m)	2.87	3.27	2.51	3.40 (m)

*m= mixoploidía

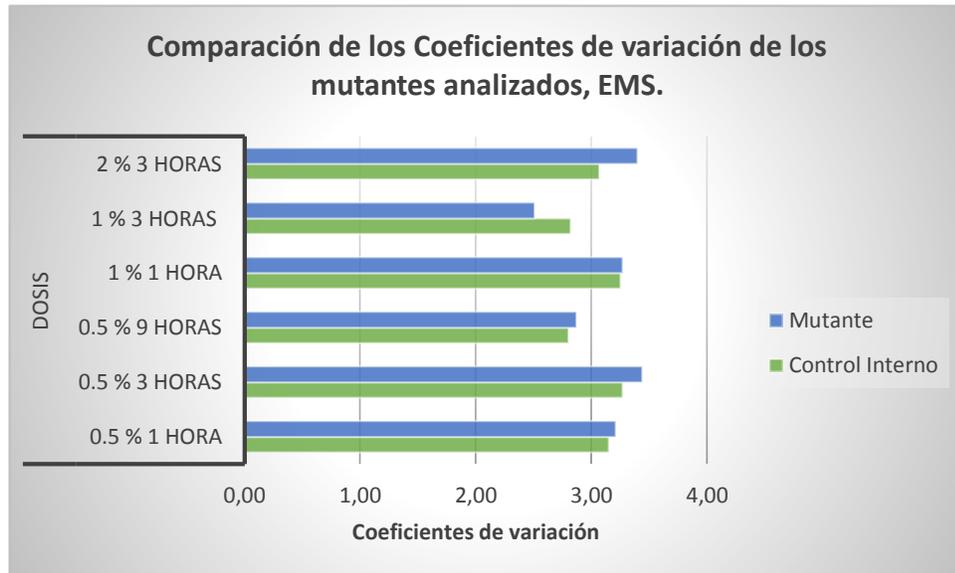


Gráfico 27. Comparación de los Coeficientes de variación de los mutantes analizados para las dosis con Etilmetanosulfonato. UCSG, 2015.

En el **Gráfico 27** se aprecia las dosis con el tratamiento EMS viéndose que alcanzaron la mayor variación en la medición de núcleos mutagenizados en relación con el control interno, demostrando que éstas dosis difiere con los rayos gamma obteniendo más variación, lo cual concuerda con los resultados

obtenidos por Jain (2010) quien utilizó éste agente en el mejoramiento por inducción en banano.

4.3. Contenido relativo de ADN nuclear de las plantas mutantes de banano irradiadas con Rayos Gamma.

En la **Tabla 8** se presenta los estadísticos: medias, valor máximo, valor mínimo, varianza, desviación estándar, error estándar y el CV, determinados en cada dosis de rayos gamma de 20, 40, 50, 60, 80 y 100 Grays.

En relación a las medias de los valores de contenido de ADN nuclear se observó un rango de 0.047 picogramos, comparado entre la dosis 20 y 100 Grays, mientras que los mayores coeficientes de variación se dieron en estas mismas dosis con 2.90 % y 2.88 %, en su orden, para 100 y 20 dosis. Los resultados obtenidos probablemente se deban a alguna alteración intrínseca dada en los procesos de irradiaciones. La representación del **Gráfico 28** de las relaciones entre el Contenido relativo de ADN y los coeficientes de variación medidos señalan que entre las dosis de 20 a 60 Grays, se mantiene el contenido relativo de ADN nuclear con valores cercanos al testigo (1.89 picogramos).

De esta manera, los resultados obtenidos en el presente estudio concuerdan parcialmente con los trabajos realizados por Jankowicz-Cieslak (2012), quien determinó que las variaciones en el contenido nuclear se llega a determinar mediante citometría y en muchos casos al tratarlos con rayos gamma se debe utilizar dosis bajas de entre 20 y 60 Grays.

Tabla 8. Cantidades de ADN relativo nuclear determinado en picogramos (pg) en las plantas sometidas a irradiación con varias dosis de rayos gamma del INIAP. UCSG, 2015.

DOSIS DE RAYOS GAMMA						
ESTADISTICOS	20 Gy	40 Gy	50 Gy	60 Gy	80 Gy	100 Gy
Medias	1.843	1.802	1.807	1.818	1.802	1.796
V. Max	2.583	1.920	1.853	1.892	1.861	1.861
V. min	1.537	1.720	1.767	1.713	1.564	1.442
S2	0.003	0.010	0.001	0.010	0.010	0.030
S	0.053	0.025	0.030	0.029	0.037	0.052
EE	0.003	0.020	0.009	0.020	0.030	0.060
CV	2.88%	1.39%	1.66%	1.60%	2.05%	2.90%
N	275	188	10	140	118	71

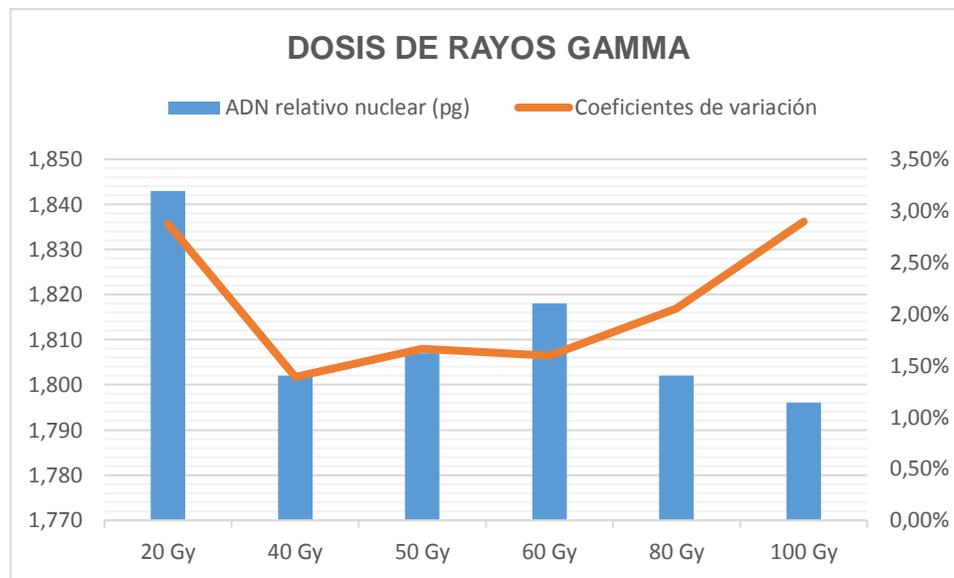


Gráfico 28. Relación entre el contenido relativo de ADN nuclear y los coeficientes de variación en las dosis de rayos gamma. UCSG, 2015.

4.4. Contenido relativo de ADN nuclear de las plantas mutantes de banano tratadas con EMS.

En la **Tabla 9** se presentan los estadísticos determinados en las dosis tratadas con EMS: medias, valor máximo, valor mínimo, varianza, desviación estándar, error estándar y el CV, para las dosis, en su orden, de 0.5 % 1 hora, 0.5 % 3 horas, 0.5 % 9 horas, 1 % 3 horas, 1 % 6 horas y 2 % 3 horas.

En relación a los promedios se observó los valores más altos en la dosis 2 % 3 horas (1.835 pg) y, el más bajo se determinó en la dosis 0.5 % 9 horas (1.814 pg). En cuanto a los coeficientes de variación se observó una mayor variabilidad con el 4.71 % en la dosis de 0.5 % 1 hora y el menor valor con 0.49 % en la dosis 1 % 3 horas.

La **Gráfica 29** demuestra la relación existente entre la dosis empleada y la variabilidad hallada con el contenido relativo de ADN nuclear en las dosis de 0.5 % 1 hora, 1 % hora y 2 % 3 horas.

Los resultados obtenidos concuerdan parcialmente con los resultados obtenidos por Bidabadi, Meon, Wahab, Subramaniam, & Mahmood, (2012), quienes manifiestan en este tipo de tratamiento en el cual se emplea un mutagénico químico, la concentración del mutagénico no debe sobrepasar el 2 %, todo esto para generar una mayor supervivencia en las vitroplantas, y poder manejar un número alto de incidencias en la variación genotípica para buscar luego fenotipos deseables de acuerdo a los objetivos planteados en el proyecto de mejoramiento vegetal.

Tabla 9. Cantidades de ADN relativo nuclear determinado en picogramos (pg) en las plantas tratadas con EMS del INIAP. UCSG, 2015.

Estadísticos	DOSIS DE ETILMETANOSULFONATO					
	0.5 % 1 hora	0.5 % 3 horas	0.5 % 9 horas	1 % 1 hora	1 % 3 horas	2 % 3 horas
Medias	1.827	1.825	1.814	1.820	1.834	1.835
V. Max	1.890	1.874	1.834	1.936	1.851	1.954
V. min	1.381	1.780	1.786	1.751	1.823	1.741
S2	0.007	0.000	0.000	0.001	0.000	0.010
S	0.086	0.022	0.019	0.032	0.009	0.024
EE	0.015	0.003	0.008	0.003	0.003	0.020
CV	4.71%	1.21%	1.05%	1.76%	0.49%	1.31%
N	31	43	6	123	10	221

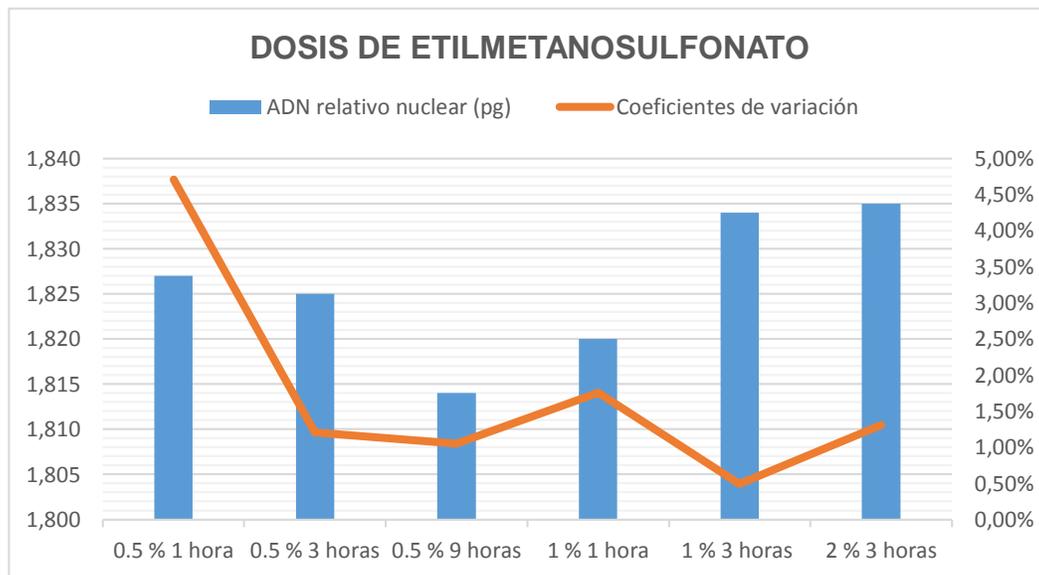


Gráfico 29. Relación entre el contenido relativo de ADN nuclear y los coeficientes de variación en las dosis tratadas con EMS. UCSG, 2015.

5. CONCLUSIONES.

De acuerdo a los resultados obtenidos, bajo las condiciones en que se llevó el presente estudio, se llega a las siguientes conclusiones:

1. Los Rayos Gamma no afectan los niveles de ploidía de las plantas de banano mutante cv. *Williams*, puesto que todos los histogramas obtenidos mediante citometría de flujo, muestran que el pico de todos los mutantes en las diferentes dosis de irradiación fueron observadas por el canal 150 del eje de las abscisas mostrando ligeras variaciones ± 10 , en cuanto a su ubicación en dicho eje.
2. En relación a los coeficientes de variación observados para las irradiaciones con Rayos Gamma, se observa que los valores son prácticamente similares con un rango de apenas de 0.02 %.
3. En el contenido relativo de ADN nuclear con Rayos Gamma se observa una pequeña variabilidad de 0.047 a favor de la radiación con 20 Grays.
4. En Etilmetanosulfonato, se puede concluir que solamente en las dosis a la concentración del 0.5 % y del 2 % durante una exposición de incubación de entre 1 a 3 horas en el agente mutagénico, se genera una pequeña variación en la ploidía, mostrando la presencia de mixoploidía en sus respectivos histogramas, alterando su contenido cromosómico.
5. En relación a los Coeficientes de variación tratados con EMS, se observa que la mayor variabilidad se presenta con la dosis de 0.5 % 1 hora y la menor variación se da en la dosis de 1 % 3 horas.
6. Referente al contenido relativo de ADN nuclear con el tratamiento EMS, se observa que la variación determinada entre las diferentes dosis es insignificante pues apenas llega a un valor de 0.021.

7. Todas las conclusiones anteriores están estrechamente relacionadas con el contenido relativo de ADN nuclear, pues ya que si bien no hubo variación en la ploidía de todas las plantas mutantes del ensayo, si se puede apreciar mediante la determinación del contenido relativo de ADN en picogramos y millones de pares de bases, que las diferentes dosis en cada tratamiento generaron variaciones respecto del control interno de referencia.

6. RECOMENDACIONES.

Con base a lo obtenido en la presente investigación, en donde se ha utilizado rayos gamma y etilmetanosulfonato en banano, se recomienda lo siguiente:

1. Que en trabajos de mejoramiento genético en banano utilizando rayos gamma como método de inducción de variabilidad, se utilice concentraciones de 20 a 60 Grays, en poblaciones masivas de plantas.
2. Que en trabajos de mejoramiento genético en banano utilizando mutagénicos químicos se utilice dosis inferiores a 2 % de concentración en tiempos no mayores a 3 horas de exposición, en poblaciones masivas de plantas.
3. Debido a la naturaleza aleatoria de las mutaciones por inducción, que se ha observado en la variación de ADN nuclear, de ambos tratamientos en ésta investigación, es necesario hacer la evaluación de la ploidía y otros análisis de *screening* en poblaciones mutantes muy numerosas, y hacer evaluaciones de las plantas en las dosis que mostraron variaciones en su ploidía y contenido relativo de ADN nuclear, a nivel de invernadero y de campo, para mejorar la eficiencia en la selección.

BIBLIOGRAFÍA.

- Álvarez , B. (2000). *Unidad de citometría*, 50- 62. Madrid, España: ISCIII.
- Arendt, J. (2007). *Ecological correlates of body size in relation to cell size and cell number: patterns in flies, fish, fruits and foliage* (81 ed.). USA: Biological Reviews. Recuperado el 2014
- Audesirk, T., Audesirk, G., & Byers, B. E. (2003). *Biología: la vida en la tierra*. (R. L. Héctor Javier Escalona García, Trad.) Pearson Educación.
- Baserga, R. (2007). *Is cell size important? Cell cycle*. USA: BMC cell biology. Recuperado el 2014
- Bennett, M., & Leitch, I. (2005). Genome size evolution in plants. En: Gregory, T. (Ed) *The Evolution of the Genome*. Elsevier Academic Press, págs. 89-162.
- Bennett, M., Leitch, I., & Hanson, L. (1998). *DNA amounts in two samples of angiosperm weeds*(82), 121- 134.
- Bidabadi, S. S., Meon, S., Wahab, Z., Subramaniam, S., & Mahmood, M. (2012). *Induced mutations for enhancing variability of banana (Musa spp.) shoot tip cultures using ethyl methanesulphonate (EMS)*. Australia: Australian Journal of Crop Science.
- Bioacademia S. A. de C. V. (2010). *Bioacademia*. (Excelgraf) Recuperado el 29 de Agosto de 2013, de Materiales de consulta: <http://www.bioacademia.com.mx/miembros/tecnologia/0002.html>
- Bioversity. (2005). *INIBAP Informe Anual 2004*. Biodiversity International.
- Cadavid Ordóñez, M. (2009). *Evolución del tamaño del genoma de las plantas*. Barcelona, España: Universidad Autónoma de Barcelona.

- Connor, O. (12 de Julio de 2012). *Introducción a la citometría de flujo*. Recuperado el 29 de Agosto de 2013, de <http://www.uv.es/~oconnor/>
- Consejo Superior de Investigaciones Científicas & Universidad Autónoma de Madrid. (2001). *Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols"*. (U. A. Madrid, Ed.) Recuperado el 28 de Agosto de 2013, de <http://www.iib.uam.es/portal/web/citometria/normas/facscan>
- Contreras, R. (23 de Mayo de 2013). *Biología*. Recuperado el 2014, de La guía 2000: <http://biologia.laguia2000.com/genetica/ploidia>
- Diario Hoy. (13 de Noviembre de 2013). *Diario de negocios*. Recuperado el 22 de Enero de 2014, de <http://www.hoy.com.ec/movil-front-noticias.php?id=en-ecuador-se-han-perdido-29-mil-hectareas-de-banano-594910>
- Doležel, J., Doleželová, M., & Novák, F. J. (1994). Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *M. balbisiana*). *Biologia Plantarum*, 36(3), 351- 357.
- Doležel, J. (Mayo de 1997). Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. *Journal of Applied Genetics*(38), págs. 285- 302.
- Doležel, J., Bartos, J., Voglmayr, & Greilhuber, J. (2003). *Nuclear DNA content and genome size of trout and human*. Cytometry Part A.
- Dolezel, J., Sgorbati, S., & Lucretti, S. (1992). *Comparisoi of three DNA flii orcliromes for flow cytometric estimatioe of nuclear DNA conteet in plants*. USA: Physiol Plant.
- Eudey, T. Lynn. Statistical considerations in DNA flow cytometry. *Statist. Sci.* 11 (1996), no. 4, 320--334. doi:10.1214/ss/1032280305. <http://projecteuclid.org/euclid.ss/1032280305>.

- Fay, M., Conwan, R., & Leitch, I. (2005). *The effects of nuclear DNA content (C-value) on the quality and utility of AFLP fingerprints* (Vol. 95). *Annals of Botany*.
- Federación Europea de biotecnología. (2014). *Citometría de flujo*. Haná: Centro de Planta Estructural y Genómica Funcional del Instituto de Botánica Experimental AS CR. Recuperado el 2015
- Fernández, A. (2006). *El cultivo del banano en el Ecuador. Cultivo, Plagas y Enfermedades* (Segunda ed.). Machala, Ecuador: GRAFIRAM.
- Figueroa, M. M., & Lupi, A. M. (s.f.). *fertilizando.com*. Recuperado el 31 de Agosto de 2013, de Biblioteca de fertilidad y fertilizantes en español: <http://www.fertilizando.com/articulos/Caracteristicas%20y%20Fertilizacion%20Cultivo%20Banano.asp>
- Galbraith, D. W., Lambert, G. M., Macas, J., & Dolezel, J. (2013). *Current Protocols in Cytometry. Nucleic Acid Analysis*. USA: University of Illinois.
- Galbraith, D., Harkins, K., Maddox, J., Ayres, N., Sharma, D., & Firoozabady, E. (Junio de 1983). Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science Magazine*, 220(4601), 1049- 1051. doi:10.1126/science.220.4601.1049
- Gómez, X. (2012). *Servicio Departamental de Ayuda a la Investigación (SEDAI)*. (U. d. Lleida, Ed.) Recuperado el 2014, de Servicio de Citometría de flujo: <http://web.udl.es/dept/medicina/sedaicmf/sedai/prest.htm>
- Greilhuber, J., Dolezel, J., Lysak, M. A., & Bennett, M. D. (2005). *The Origin, Evolution and Proposed Stabilization of the Terms 'Genome Size' and 'C-Value' to Describe Nuclear DNA Contents*. República Checa: Oxford Journals.

Grupo de Investigación de Genética y Microbiología. (Diciembre de 2004). *GENMIC*. (D. d. agraria, Ed.) Recuperado el 2014, de <http://www.unavarra.es/genmic/genetica%20y%20mejora/cambios%20cromosomicos/Cambios%20cromosomicos%20numericos%20II.htm>

Grupo de Investigación de Genética y Microbiología. (2008). *Genética y mejora vegetal*. Recuperado el 3 de Septiembre de 2013, de Universidad Pública de Navarra:
<http://www.unavarra.es/genmic/genetica%20y%20mejora/cambios%20cromosomicos/Cambios%20cromosomicos%20numericos%20II.htm>

Guzmán Quesada, M., & Paladines García, R. (Noviembre de 2012). *Croplife Latinoamérica*. Recuperado el 27 de Agosto de 2013, de Corporación Bananera Nacional:
http://www.croplifela.org/index.php?option=com_content&view=article&id=289%3Asigatoka-negra&catid=39%3Aplaga-del-mes&lang=es

Herráez, Á., & Herráez Sánchez, Á. (2012). *Biología molecular e ingeniería genética* (Segunda ed.). España: Elsevier España. Recuperado el 2014

Index Fungorum. (s.f.). *IndexFungorum.org*. Recuperado el 22 de Enero de 2014, de
<http://www.indexfungorum.org/Names/NamesRecord.asp?RecordID=318160#TopOfPage>

INEC. (2009). *Análisis del sistema agroalimentario del banano en Ecuador*. Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, Sistema agroalimentario. Quito: Ecuador en Cifras.

Instituto de Botánica Experimental de la Academia de Ciencias de la República Checa (IEB). (2014). *Centre of Plant Structural and Functional Genomics*.

(C. o. Genomics, Ed.) Recuperado el 2014, de Flow Cytometry:
<http://olomouc.ueb.cas.cz/book/flow-cytometry>

Jain, J. M. (2010). *In Vitro Mutagenesis in Banana (Musa spp.) Improvement*. Helsinki: University of Helsinki.

Jain, S. M. (2000). Mechanisms of spontaneous and induced mutations in plants. *Proc. 11th International Congress of Radiation Research*, (págs. 255- 258). Dublin.

Jain, S. M. (2006). Mutation assisted breeding in ornamental plant improvement. *Acta Hort. 714*, (págs. 85- 98). Dublin.

Jain, S. M. (2007). Recent advances in plant tissue culture and mutagenesis. *Acta Hort. 736*, (págs. 205-211). Dublin.

Jain, S. M., & Swennen, R. (2004). *Banana improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations*. Madison, USA: Science Publishers.

Jiménez, R. E. (2010). *Acceso a los recursos genéticos y su relación con el desarrollo de la biotecnología*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Recursos genéticos y biotecnología. La Molina: UNMSM.

Joanna Jankowicz-Cieslak, O. A. (2012). *Induction, rapid fixation and retention of mutations in vegetatively propagated banana*. *Plant Biotechnol J*.

Laguado, J. (Diciembre de 2007). Aplicaciones de la citometría de flujo en microbiología, veterinaria y agricultura. (B. Biosciences, Ed.) *MVZ Cordoba*, 12(2), 14.

Leitch, I., Soltis, D., Soltis, P., & Bennett, M. (2005). *Evolution of DNA amounts across land plants (embryophyta)*(95), 207- 217.

- Loureiro, J. (2009). Aplicación de la citometría de flujo en el estudio del genoma vegetal. *Ecosistemas*, 18(2), 103- 108.
- Loureiro, J. (2009). Revista Ecosistemas. *Aplicación de la citometría de flujo en el estudio del genoma vegetal*. España: Asociación española de ecología terrestre.
- McCarthy, D. A. (2007). *Fluorochromes and fluorescence*. New Jersey, USA: Humana Press.
- Morpurgo, R. (1997). *Enigma of banana breeding: A challenge for biotechnology*. Agro-Food Industry Hi-Tech.
- Novak, F. J., Afza, R., Van Duren, M., & Omar, M. S. (1990). *Mutation induction by gamma irradiation of in vitro cultured shoot-tips of banana and plantain (Musa cvs)*. (Primera ed.). Trinidad: Trop. Agric.
- Ochatt, S. J. (2006). *Flow cytometry (ploidy determination, cell cycle analysis, DNA content per nucleus)*. Instituto Nacional de Investigación Agronómico de Francia (INRA), Unité de Génétique et Ecophysiologie des Légumineuses. París: BP.
- Ortiz Ortega, R. A. (2001). *El cultivo del banano*. San José, Costa Rica: San José: EUNE.
- Partec. (2013). *Sysmex- Partec*. Recuperado el 2014, de Flow Citometry: <http://www.sysmex-partec.com/fileadmin/media/pdf/plant DNA>
- Perea Dallos, M. (1988). Consideraciones Biotecnológicas para el mejoramiento de Musáceas. *Simposio Internacional sobre el cultivo de plátano* (págs. 62- 70). Bogotá: INIBAP.
- Perea- Dallos, M., & Constabel, C. (1996). Estrategias para el mejoramiento de banano y plátano. *Augura*(1), 40- 47.

- Plant cytometry services. (2012). *Plant cytometry services*. Recuperado el 2015, de Flow cytometry.
- Ploetz, R. C., Kepler, A. K., Daniells, J., & Nelson, S. C. (2007). *Banana and plantain—an overview with emphasis on Pacific island cultivars*. Hawaii: traditionaltree.
- Pro Ecuador. (2013). Instituto de promoción de exportaciones e inversiones. *Análisis del sector bananero*. (D. d. Inversiones, Ed.) Ecuador.
- Quintero, N. (2011). *Genoma Nuclear*. Recuperado el 2014, de <http://es.slideshare.net/nikho9030/genoma-nuclear>
- Ramírez Ramírez, L. (Septiembre de 2000). Inferencia estadística del ADN de plantas mediante citometría de flujo. 6. México: Universidad de Guanajato.
- Real Sociedad de Química. (2013). *Índice Merck*. New York: E. Merck.
- Revista El agro. (2013). *El banano en Ecuador y el mundo*. Quito, Ecuador: UMINASA DEL ECUADOR.
- Revista El Agro. (27 de Marzo de 2014). Inducción de mutaciones identifica variedades de banano resistentes a los hongos. *El Agro*.
- Reyes, W. (2007). *Gamma Rays and Carbon Ion-Beams Irradiation for Mutation Induction to Breed Banana (Musa spp.), Especially on Response to Black Sigatoka Disease*. Tsukuba, Japón: University of Tsukuba.
- Robinson, P. (2006). *Introduction to flow cytometry*. Purdue University, Cytometry Laboratories, West Lafayette.
- Rodríguez, C. (2007). Material complementario 8. *La Variación biológica*. Encarta.

- Rodriguez, J. (2000). *Estimacion de la variacion somaclonal y la inducida por rayos gamma en banano (Musa spp)*. Determinacion de indices para el proceso de selección. (U. A. León, Ed.) México. Recuperado el 2014
- Salameh, N. M. (2014). *Flow cytometric analysis of nuclear dna between okra landraces (Abelmoschus esculentus L.)*, American Journal of Agricultural and Biological Sciences. (C. C. Attribution, Ed.) Jordania: American Journal of Agricultural and Biological Sciences.
- Salles Pio, L. A. (2007). *Inducción e identificación de poliploidía en banano (Musa acuminata, Colla)*. Brasil: Universidad Federal de Lavras.
- Shadia, A. R., Othman , R. Y., & Chai, M. (2002). *Ploidy analisis and DNA content of mutant banana "Pisang berangan" using flow citometry* (Vol. 19). Kuala lampur: Biotropia.
- Sierra, L. E. (1993). *El cultivo de Banano: Producción y Comercio*. Medellín, Colombia.
- Sigma-Aldrich. (2014). Etil metanosulfonato. Recuperado el 2014
- Sociedad Española de Biotecnología. (2000). *La biotecnología aplicada a la agricultura*. (Sebiot, Ed.) Madrid, España: Madrid Eumedia.
- Tomekpe, K., Jenny, C., & Escalant, J.-V. (2004). Análisis de las estrategias de mejoramiento convencional de Musa. (R. I. (INIBAP), Ed.) *Infomusa*, 13(2), 2.
- Van Harten, A. M. (1998). *Mutation Breeding: Theory and Practical Applications*. Cambridge, United Kingdom: Cambridge Univ. Press.
- Zhu, D., Song, W., Yang, K., Cao, X., Gul, Y., & Wang, W. (2012). *Biotechnology Center*. doi:10.1007/s11626-012-9543-7

ANEXOS

Anexo 1. Cronograma del desarrollo del Trabajo Experimental. UCSG, 2015.

Cronograma de actividades					
TÍTULO:					
Ploidía de mutantes de banano (<i>Musa acuminata</i> AAA) tratados con rayos gamma y etilmetanosulfonato, mediante citometría de flujo.					
Actividades	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero
Directrices del proyecto	X				
Definición de la estructura del proyecto	X				
Definición del título del trabajo experimental	X				
Definición de los capítulos y el orden de los temas a investigarse en Marco referencial	X				
Organización de los puntos a tratarse en el Marco Operacional	X				
Desarrollo del experimento	X	X	X	X	
Desarrollo del Marco Operacional			X	X	
Revisión y correcciones de los resultados y las conclusiones					X

Anexo 2. Distribución en Croquis de las plantas de banano mutante cv. Williams del experimento. UCSG, 2015.

Croquis de Campo Platas de Banano Mutante cv Williams					
Tratamiento con Rayos Gamma	Dosis 1	20 Gy	Tratamiento con Etilmetanosulfonato (EMS)	Dosis 1	0,5 % - 1 hora
	Dosis 2	40 Gy		Dosis 2	0,5 % - 3 horas
	Dosis 3	50 Gy		Dosis 3	0,5 % - 9 horas
	Dosis 4	60 Gy		Dosis 4	1 % - 1 hora
	Dosis 5	80 Gy		Dosis 5	1 % - 3 horas
	Dosis 6	100 Gy		Dosis 6	2 % - 3 horas.
			Controles		

Anexo 3. Distribución de las plantas de banano mutante cv. Williams en el Invernadero. UCSG, 2015.

