

ÍNDICE

Página

Resumen

1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1 Descripción taxonómica	3
2.2 Origen del cocotero	3
2.3 Variedades de cocotero	4
2.4 Embrión cigótico de cocotero	5
2.5 La Germinación en condiciones naturales e <i>in vitro</i>	6
2.6 Condiciones de cultivo	7
2.7 Problemática actual	7
2.8 Amarillamiento Letal del cocotero	8
2.9 Estrategias para el control del AL	9
2.10 Transporte seguro de germoplasma	9
2.11 Cultivo <i>in vitro</i> de embriones cigóticos	10
2.12 Efecto del ácido giberélico en la germinación de embriones cigóticos de cocotero	11
2.13 Reguladores del crecimiento vegetal o fitorreguladores	12
2.13.1 Las Giberelinas y el Ácido Giberélico	12
2.13.1.1 Las Giberelinas y su relación con la Germinación	14
2.14 Ciclo celular	15
2.15 Genes involucrados en el control del ciclo celular	17
2.15.1 Cinasas dependientes de ciclinas (CDKs)	17
2.15.2 Factores de transcripción E2F	18
2.16 Regulación del ciclo celular y su relación con el AG ₃	19
2.17 Genes del desarrollo	20
2.17.1 Sin Meristemo Apical (Shoot Meristemless. STM)	20
2.18 Métodos moleculares para el estudio de la expresión de genes	21

	Página
2.18.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional y en tiempo real	22
2.18.2 Retrotranscripción-Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) convencional y en tiempo real	24
2.18.3 Ventajas del método de PCR en tiempo real sobre la PCR convencional	25
2.18.4 Análisis de los datos de la PCR en tiempo real	25
2.18.4.1 Cuantificación Absoluta	25
2.18.4.2 Cuantificación Relativa	26
2.18.4.2.1 Normalizadores de la expresión de un gen	28
3. Objetivos	29
3.1 Objetivo general	29
3.2 Objetivos específicos	29
4. Hipótesis	30
5. Materiales y Métodos	31
5.1 Colecta y esterilización del material vegetal	31
5.2 Cultivo <i>in vitro</i> y adición de AG ₃	31
5.3 Análisis del porcentaje de germinación	32
5.4 Colecta de muestras para el análisis del crecimiento en peso fresco y posterior análisis de la expresión de los genes de interés	32
5.5 Análisis del crecimiento en peso fresco	32
5.5.1 Análisis estadístico de los resultados obtenidos	33
5.6 Ensayos de expresión de los genes de ciclo celular (<i>CDK-A</i> y <i>E2F</i>) y del desarrollo (<i>STM</i>) por PCR en tiempo real	33
5.6.1 Extracción de ARN de embriones cigóticos y tratamiento con la enzima ADNasa	33
5.6.2 Determinación de la cantidad y la calidad del ARN	34
5.6.3 Síntesis de Ácido Desoxirribonucleico complementario (ADNc)	34
5.6.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real	35
5.6.5 Análisis de resultados: cuantificación relativa de la expresión de un gen	36

	Página
5.6.6 Análisis estadístico de los resultados obtenidos	37
5.7 Detección del gen <i>STM</i> en embriones cigóticos de cocotero	38
5.7.1 Fijación e Inclusión en parafina	38
5.7.2 Seccionado de tejidos	38
5.7.3 Desparafinación e Hidratación del tejido	39
5.7.4 Permeabilización del tejido	39
5.7.5 Deshidratación del tejido	39
5.7.6 Tratamiento con ADNasa I	40
5.7.7 Reacción de RT-PCR <i>in situ</i>	40
5.7.8 Lavados	41
5.7.9 Bloqueo	41
5.7.10 Incubación de los tejidos con el anticuerpo	41
5.7.11 Detección de la actividad de fosfatasa (Revelado)	41
5.7.12 Lavados	42
6. Resultados	43
6.1 Efecto del AG ₃ en el crecimiento en peso fresco durante la germinación de embriones cigóticos de cocotero cultivados <i>in vitro</i>	43
6.2 Efecto del AG ₃ en la Cinética de germinación de embriones cigóticos de cocotero	46
6.3 Desarrollo morfológico del embrión cigótico de cocotero durante la germinación	48
6.4 Efecto del AG ₃ en la expresión del gen <i>CDK-A</i> durante la germinación <i>in vitro</i> de embriones cigóticos de cocotero	50
6.5 Efecto del AG ₃ en la expresión del gen <i>E2F</i> durante la germinación <i>in vitro</i> de embriones cigóticos de cocotero	52
6.6 Comparación del perfil de expresión de los genes <i>CDK-A</i> y <i>E2F</i>	54
6.6.1 Comparación del perfil de expresión de los genes <i>CDK-A</i> y <i>E2F</i> para el tratamiento control	54
6.6.2 Comparación del perfil de expresión de los genes <i>CDK-A</i> y <i>E2F</i> para el tratamiento con AG ₃	54
6.7 Efecto del AG ₃ en el perfil de expresión del gen <i>STM</i>	57

	Página
6.8 Detección <i>in situ</i> de la expresión del gen <i>STM</i> durante la germinación <i>in vitro</i> de embriones cigóticos de cocotero	59
7. Discusión	60
8. Conclusiones	66
9. Apéndices	67
9.1 Abreviaturas	67
9.2 Protocolo utilizado en la mezcla de reacción de la PCR en tiempo real	69
9.3 Protocolos usados en las técnicas empleadas para la detección <i>in situ</i> del gen <i>STM</i>	70
10. Referencias Bibliográficas	72

RESUMEN

En el presente trabajo se determinó el efecto del ácido giberélico (AG_3) en el proceso de germinación de embriones cigóticos de cocotero cultivados *in vitro* en la expresión de genes involucrados en el control del ciclo celular y del desarrollo.

Se evaluó el porcentaje de germinación de los embriones cigóticos de cocotero germinados *in vitro* con y sin AG_3 cada semana durante un período de 4 semanas; también el crecimiento en peso fresco durante 20 días. Así mismo se evaluó el patrón de expresión de los genes involucrados en el control del ciclo celular tales como una cinasa dependiente de ciclina tipo A (*CDK-A*), un factor de transcripción (*E2F*) y del gen del desarrollo SIN MERISTEMO APICAL (*SHOOT MERISTEMLESS*, *STM*), cada dos días durante un período de 20 días en embriones cigóticos de cocotero germinados *in vitro* con y sin AG_3 .

Los resultados obtenidos muestran que la adición del AG_3 estimuló el porcentaje de embriones en germinación y la velocidad con que se llevó a cabo este proceso, reproduciendo los datos reportados por Pech (2004). La adición del AG_3 al medio de cultivo de los embriones cigóticos de cocotero estimuló la expresión de los genes estudiados de manera importante ya que se registraron dos picos de expresión a los días 2 y 8 en el caso del gen *CDK-A* y un pico en el día 2 en el caso del gen *E2F*. Además esta estimulación de la expresión se presentó al día dos del cultivo en los embriones germinados con AG_3 y al día cuatro en los embriones controles. Por otra parte se pudo detectar la expresión del gen *STM* por retrotranscripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) convencional durante el proceso de germinación de los embriones cigóticos de cocotero. Además se observó un efecto del AG_3 sobre la expresión de este gen como se observó para los genes del ciclo celular antes mencionados, ya que la detección del transcrito de este gen se observó dos días antes en los embriones tratados con el AG_3 respecto al tratamiento control.