

Posgrado en Ciencias y Biotecnología de Plantas

**Establecimiento de un protocolo de transformación
mediado por *Agrobacterium tumefaciens* para *Musa
acuminata* var. "Enano Gigante" por infiltración al vacío.**

Tesis que presenta para obtener el grado de
Maestro en ciencias

Pablo Oscar Martín Acereto Escoffié

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN

Mérida, Yucatán, México.
2003



AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Centro de Investigación Científica de Yucatán la oportunidad de realizar los estudios de Maestría en Ciencias y Biotecnología de Plantas en sus instalaciones y bajo la dirección y respaldo del Dr. Luis Carlos Rodríguez Zapata y del Dr. Tomás González Estrada quienes mostraron interés y disposición para la realización de este trabajo.

Se agradece el apoyo económico otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través del proyecto de investigación No. Z-047 y de la beca crédito (número de registro 172193) para la realización de éste trabajo de tesis.

Me es grato expresar agradecimiento a la Universidad Autónoma de Yucatán por el permiso y el apoyo económico concedido para la realización de mis estudios de Maestría.

De manera especial agradezco el apoyo del Dr. Andrew James Kay y a todos los miembros del grupo de banano quienes mostraron un respaldo técnico y moral para lograr la culminación de mi Maestría. Reconocimiento especial para: el Dr. Dieter Kaemmer por las asesorías y comentarios desinteresados otorgados en su momento, a la Q.F.B Rosa Grijalva por el suministro y apoyo técnico para la obtención y multiplicación de tejidos así como al M.C. Bartolomé H. Chi Manzanero por el apoyo técnico y fraternal brindado.

Gracias a los compañeros de Posgrado: Leticia Pereza Echeverría, María Teresa Pérez Nuñez y Elizabeth Ortiz Vázquez por el apoyo en diversas etapas de mi trabajo.

Gracias a mis padres Gloria y Raúl por el amor y apoyo que me brindaron siempre. Por ultimo, especial agradecimiento le doy a mi esposa Mirna Patricia Cordero Abella e hijos Marisol, Maribel y Pablo por el respaldo, paciencia y amor mostrado. Muchas gracias a todos.

Este trabajo se efectuó en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

CONTENIDO

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Capítulo I Antecedentes	
<i>Musa acuminata</i>	6
Origen y distribución	6
Importancia	6
Clasificación taxonómica	7
Características morfológicas	8
La transformación mediada por <i>A. tumefaciens</i> : Nuevos alcances y Perspectivas	10
Generalidades	10
Proceso de infección por <i>Agrobacterium</i>	11
<i>A. tumefaciens</i> como herramienta biotecnológica	14
Los nuevos horizontes	15
Conclusiones	16
Transformación genética de banano	17
Mejoramiento tradicional del banano	17
Cultivo de tejidos y transformación genética del banano	17
Transformación genética de banano por infiltración al vacío	17
Justificación	18
Objetivos	18
Objetivos particulares	19
Referencias	19
Capítulo II Evaluación de kanamicina como agente de selección para la transformación de <i>Musa</i> cv. "Enano Gigante"	
Resumen	23
Introducción	23
Materiales y métodos	24
Material vegetal	24
Cultivo de tejidos	25
Método experimental	25
Resultados y discusión	25
Referencias	29
Capítulo III Establecimiento de un protocolo de transformación mediado por <i>A. tumefaciens</i> para <i>Musa</i> acuminata var. "Enano Gigante" por infiltración al vacío	
Materiales y métodos	31
Material vegetal	31
<i>Escherichia coli</i> y <i>A. tumefaciens</i>	31
Vectores	31

Métodos	31
Cultivo de tejidos	34
Transformación de <i>A. tumefaciens</i> , <i>E. coli</i> y <i>N. tabacum</i>	35
Transformación de meristemos de banano por infiltración al vacío	35
Eliminación de <i>A. tumefaciens</i> de tejidos infectados	35
Prueba histoquímica de GUS	36
Actividad específica de β -glucuronidasa	36
Aislamiento y limpieza de DNA genómico	37
Amplificación por PCR de fragmentos de los genes NPTII y GUS	37
Resultados y discusión	38
Transformación de <i>N. tabacum</i>	38
Transformación de tejido meristemático de banano por infiltración al vacío	38
Eliminación de <i>A. tumefaciens</i> de tejidos infectados	39
Prueba histoquímica y actividad de β -glucuronidasa	40
Aislamiento de DNA genómico	43
Amplificación por PCR de fragmentos del gen NPTII y GUS	44
Regeneración de tejidos meristemáticos de banano	45
Referencias	47
Conclusiones	50
Perspectivas	51

Apéndice

I.	Extracción de DNA plasmídico "MINIPREP "	52
II.	Preparación de células competentes de <i>A. tumefaciens</i> con CaCl_2	52
III.	Transformación de células competentes de <i>A. tumefaciens</i> con CaCl_2	53
IV.	Preparación de células electro-competentes	53
V.	Transformación de células electro-competentes por electroporación	54
VI.	Extracción de proteína	54
VII.	Determinación de proteína por el método Bradford	55
VIII.	Digestión de DNA genómico para análisis por PCR	55

Tablas

A.	Medios para el crecimiento de <i>A. tumefaciens</i> y <i>E. Coli</i>	56
B.	Antibiótico utilizado para el cultivo de microorganismos	56
C.	Concentración de antibiótico recomendada para <i>A. tumefaciens</i>	56

LISTA DE FIGURAS

1.1	Ubicación taxonómica del cultivar "Enano Gigante"	7
1.2	Esquema de una planta de banano	9
1.3	Estructura química de algunas opinas	11
1.4	Esquema general de la estructura celular de <i>A. tumefaciens</i> ilustrando el cromosoma bacteriano y el plásmido Ti.	12
1.5	Modelo del proceso de infección de células vegetales por <i>A. tumefaciens</i>	13
2.1	Evaluación del efecto de kanamicina en el crecimiento relativo de tejidos meristemáticos de <i>Musa</i> cv "Enano Gigante"	26
2.2	Efecto de kanamicina en el desarrollo de tejidos meristemáticos de <i>Musa</i> cv "Enano Gigante"	27
3.1	Vector binario pCambia 2301	32
3.2	Plásmido Auxiliar pCH32	32
3.3	Vector binario BIBAC2	33
3.4	Propagación de tejidos meristemáticos de banano "Enano Gigante"	34
3.5	Muestras de tejidos foliares de tabaco GUS positivas	38
3.6	Prueba histoquímica de GUS de tejidos de banano "Enano Gigante" infiltrados con EHA105 a 400 mm de mercurio por 4 minutos.	40
3.7	Actividades específicas de GUS en tejidos tratados por infiltración al vacío	42
3.8	Verificación de la integridad de DNA genómico de regenerantes de banano	43
3.9	Amplificación de los genes GUS y NPTII	44
3.10	Amplificación positiva del gen NPTII por PCR en tejidos meristemáticos de banano	45
3.11	Regenerantes de banano "Enano Gigante" a partir de meristemas	46
3.12	Porcentajes de regeneración de brotes de tejidos meristemáticos de banano sometidos a infiltración	46

LISTA DE TABLAS

1.1	Ejemplos prácticos del uso de <i>A. tumefaciens</i> como herramienta biotecnológica	14
2.1	Análisis de varianza de una vía (ANOVA) para el crecimiento relativo obtenido por tratamientos	28
2.2	Prueba de rango múltiple para el crecimiento relativo al día 30	28
3.1	Efecto del tiempo y presión de infiltración en meristemas de banano	39
3.2	Análisis de varianza de una vía (ANOVA) para el número de regenerantes obtenidas por tratamiento	47
3.3	Medias de regeneración por tratamiento y prueba de rango múltiple de regenerantes por tratamiento	47

RESUMEN

El rendimiento de los cultivos de *Musa* se ve afectado por factores bióticos como el ataque de nematodos, virus, hongos y bacterias así como por factores abióticos como sequías, inundaciones, ventarrones etc. Los cultivares de banano Cavendish son altamente estériles y por lo tanto difíciles de mejorar por métodos convencionales. La Transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* es una alternativa para la integración de nuevas características génicas que permitan el mejoramiento de los cultivares de banano. La transformación mediada por *A. tumefaciens* puede incrementarse por infiltración al vacío.

Se efectuó un experimento con tejidos meristemáticos de banano no transformados, para determinar la concentración de kanamicina adecuada para ser empleada como agente de selección. La concentración determinada de kanamicina de 300 mg L^{-1} , fue posteriormente redefinida a 150 mg L^{-1} por resultar la primera demasiado fuerte para los tejidos sometidos al estrés de transformación al vacío. Simultáneamente se verificó la capacidad de regeneración de los tejidos meristemáticos de banano a plántula.

Posteriormente la cepa de *A. tumefaciens* EHA015 fue transformada introduciéndose en esta las siguientes combinaciones de vector-bacteria: a) pCambia 2301, b) el vector pCambia 2301 y el plásmido auxiliar pCH32 y c) el vector BIBAC2, el cual contiene un fragmento de ADN de 50 kb de la variedad de Calcuta IV. La transformación de *A. tumefaciens* se verificó por crecimiento en medio de selección con antibióticos y por ensayos de transformación en tabaco.

Se realizaron ensayos preliminares de transformación con *A. tumefaciens* por infiltración al vacío, los cuales permitieron establecer las siguientes condiciones de transformación: 18 horas de inducción con acetosiringona $100 \mu\text{M}$, 400 mm de mercurio de presión de infiltración, 4 minutos de tiempo de infiltración y 24 horas de tiempo de recuperación en medio MS.

Se eliminó *A. tumefaciens* de tejidos meristemáticos de banano infectados mediante tratamiento con 200 mg L^{-1} de timentina (3 g de ticarcilina, 0.1 g de ácido clavulónico) y claforan (cefalosporina cefotaxima) por 40 días.

Se evaluó la transformación de tejido meristemático por la prueba histoquímica y actividad de β -glucuronidasa así como por ensayos de PCR. Los ensayos de la prueba histoquímica de GUS permitieron observar actividad de β -glucuronidasa en los tres sistemas de vector-bacteria ensayados. Se logró la máxima expresión de la prueba histoquímica en tejidos transformados con el vector pCambia 2301 y el plásmido auxiliar pCH32. La transformación positiva de los tejidos fue confirmada por ensayos de actividad específica de la β -glucuronidasa.

El establecimiento de un protocolo de extracción y limpieza de DNA, permitió confirmar la transformación positiva de tejidos de banano transformados con el vector pCambia 2301 y el plásmido auxiliar pCH32.

ABSTRACT

The yield of *Musa* cultivars is affected by different biotic factors such as the attack of nematodes, virus, bacteria and fungi as well as by abiotic factors such as droughts, floods, gales etc. The Cavendish banana cultivars are highly sterile therefore difficult to improve by conventional improvement. Transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, is an alternative choice for the integration of new genetic traits, which can allow the improvement of banana cultivars. *Agrobacterium tumefaciens* transformation by vacuum infiltration may further increase the transformation process.

An experiment was carried out using banana meristematic tissues to determine the kanamycin concentration to be used as selective agent. The kanamycin concentration of 300 mg L⁻¹ was later on redefined to 150 mg L⁻¹ as the first was too high for the tissues that had underwent the stress of transformation by vacuum infiltration. Simultaneously the regeneration capacity of the meristematic tissues to plantlets was verified.

Later, the *A. tumefaciens* EHA015 strain was transformed with the following combinations of vectors: a) pCambia 2301 vector, b) pCambia 2301 vector and the pCH32 auxiliary plasmid and c) the BIBAC2 vector bearing a fragment of 50 kb of Calcuta IV. The *A. tumefaciens* transformation was checked by allowing the bacteria to grow in selection medium with antibiotics and by tobacco transformations experiments.

Preliminary transformation assays allowed establishing the following transformation conditions: 18 hours of 100 µM acetosyringone induction, 400 mm of mercury of vacuum pressure, 4 minutes of infiltration time and 24 hours of recuperation time on liquid MS medium.

A. tumefaciens was eliminated from infected meristematic banana tissues using 200 mg L⁻¹ of timentin and Claforan (cephalosporine) for 40 days.

The transformation of meristematic tissue was assessed by the GUS histochemical test, the β-glucuronidase activity test and PCR analysis. The histochemical test allowed observation positives staining results in the three bacteria–vector systems assayed. The highest expression of the histochemical test was found in tissues transformed with pCambia 2301 vector and pCH32 auxiliary plasmid. The positive transformation of banana tissues was corroborated by the β-glucuronidase specific activity test. The establishment of an extraction and cleaning protocol, allowed the confirmation the positive transformation of banana tissues transformed with the pCambia 2301 vector and pCH32 auxiliary plasmid.

INTRODUCCIÓN

Los bananos y plátanos comestibles provienen de híbridos intra e inter-específicos de dos especies diploides silvestres con semillas, *Musa acuminata* Colla y *Musa balbisiana* Colla nativas del sureste de Asia (Robinson, 1999).

Los bananos y plátanos pertenecen al género *Musa*; familia Musaceae, orden Zingiberales. Los bananos poseen un número básico haploide de 11 y pertenecen a la sección *Emusa* (de 22, 33 o 44 cromosomas) dando origen a diversos grupos que se clasifican de acuerdo a su ploidía en: diploides, triploides o tetraploides. El cultivar "Enano Gigante", pertenece al género *Musa*, especie acuminata, grupo triploide AAA, subgrupo Cavendish (Robinson *et al.*, 1999).

El género *Musa*, es de gran importancia en el ámbito mundial debido a su valor comercial y nutricional. Los bananos y plátanos se producen mundialmente en las regiones tropicales y subtropicales, principalmente entre las latitudes 30°N y 30°S. Los principales países exportadores de banano son Ecuador, Costa Rica, Colombia y Filipinas, quienes en conjunto, contribuyen con más del 70 % del mercado de exportación mundial. La FAO en el año de 1999 estimó que la producción mundial anual fue de 86 millones de toneladas, lo que representó aproximadamente un 25% de la producción mundial de las frutas. Aproximadamente el 87 % de las bananas y plátanos son producidos en los trópicos por pequeños agricultores, ya sea para consumo del hogar o para su comercialización en mercados locales (Pérez-Hernández 2000).

Las plantas de banano y plátano son susceptibles a daño por diferentes factores climáticos y agentes patógenos. Entre los agentes patógenos causantes de enfermedades se enlistan: nemátodos, bacterias, virus y hongos. Entre los principales agentes patógenos se encuentra: el gusano barrenador *Radopholus similis* (Cobb) Torne, la raza 2 de la bacteria *Pseudomonas solanacearum*, agente infeccioso del moko o de enfermedad del marchitamiento; el nanavírus transmitido por el áfido *Pentalonia nigronervosa*, causante del bunchy top; el hongo *Fusarium oxysporum* Schlecht f.sp *cubense* agente patológico del Mal de Panamá; los hongos *Mycosphaerella musicola* y *M. fijiensis*, responsables de las enfermedades Sigatoca amarilla y Sigatoca negra respectivamente.

A la fecha los programas de mejoramiento del banano buscan obtener plantas con resistencias a enfermedades y pestes que les permitan incrementar la producción de los frutos. Estos programas buscan uniformidad en la forma y tamaño de los manojos y frutos, así como de las propiedades de maduración conservando al mismo tiempo el sabor. Algunas de las características agronómicas que se desean mejorar son: la resistencia de los pseudo-tallos al quiebre, ciclos de cultivos cortos, formación regular de hijuelos e incremento de la fortaleza de racimo y pedúnculo.

Una amplia gama de técnicas moleculares y celulares están siendo utilizadas crecientemente a escala mundial para facilitar e incrementar el manejo y mejoramiento del germoplasma de bananos y plátanos (Crouch *et al.*, 1998).

La generación exitosa de plantas transgénicas requiere de la disponibilidad de protocolos de transformación eficientes y de sistemas de regeneración. En el caso de banano y plátano, la regeneración de plantas *in vitro* ha sido posible a partir de tejidos meristemáticos localizados en o adyacentes al domo apical de las yemas (tejido meristemático apical y adventicio respectivamente) así como a través de embriogénesis somática, a partir de cultivos de suspensiones de células embriogénicas. Ambos métodos ya se han aplicado a la transformación genética de *Musa*. Un problema para la transformación genética de tejidos meristemáticos es que solo una pequeña cantidad de las células son totipotentes. Además, el origen multicelular de las plantas generadas de los meristemas hace difícil la selección de tejido transgénico no quimérico. A pesar de estas imitaciones, se han obtenido plantas transgénicas del cultivar "Enano Gigante" después de transformar tejidos meristemáticos por cocultivo con *Agrobacterium tumefaciens*. No obstante, debido al alto riesgo de regenerar plantas transgénicas quiméricas, se recomienda ciclos posteriores de propagación en presencia de agentes selectivos. Lo anterior da como resultado una disminución en el número de tejidos que muestra capacidad para regenerar plántulas (May *et al.*, 1995).

Una alternativa sería el uso de suspensiones de células embriogénicas las cuales son un mejor blanco para la transformación genética puesto que la mayoría de las células son totipotentes y la regeneración ocurre a través de embriogénesis somática que se origina de células individuales. Por lo tanto, estos cultivos garantizan altas frecuencias de regeneración y bajo riesgo de quimerismo durante la selección de plantas transgénicas.

A la fecha no se ha reportado la transformación de tejido meristemático de banano utilizando un protocolo de transformación por infiltración al vacío. Esto lo hace un tema susceptible de evaluación tanto para la generación de conocimiento básico como aplicado. Por consiguiente, en este trabajo se evaluó un protocolo de transformación mediado por *A. tumefaciens* por infiltración al vacío de tejidos meristemáticos de banano "Enano Gigante".

REFERENCIAS

- Crouch J.H., Vuylsteke D., Ortiz R.** (1998). Perspectives on the application of biotechnology to assist the genetic enhancement of plantain and banana (*Musa ssp*). Electronic Journal of Biotechnology. <http://www.ejb.org>. 1: 1-12
- May G.D., Afza R., Mason H.S., Wiecko A., Novak F.J. and Arntzen C.J.** (1995). Generation of Transgenic Banana (*Musa acuminata*) Plants via *Agrobacterium*- mediated transformation. Biotechnology, 13, 486-492.
- Novak F.J., Afza R., Van Duren M., Pereas Dallos M., Conger B.V. and Xiaolang T.** (1989) Somatic embriogénesis and plant regeneration in suspensión cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB) bananas (*Musa spp*) Biotechnology Genet Eng REV 15:313-327

Pérez-Hernández J.B. (2000). Development and application of *Agrobacterium*-mediated Genetic Transformation to increase Fungus-Resistance in Banana (*Musa* spp). Ph.D Tesis. Katholieke Universiteit Leuven. Belgium.

Robinson J.C. (1996). Bananas and Plantains. UK. University Press Cambridge. UK

CAPÍTULO I

Antecedentes

MUSA ACUMINATA

Origen y distribución

Los bananos y plátanos son originarios del sureste de Asia y regiones Occidentales del Pacífico. Durante muchos años subespecies diploides no comestibles de *Musa acuminata* Colla se cruzaron dando híbridos intra-específicos. Algunos de estos híbridos fueron partenocápicos, triploides con esterilidad femenina y frutos comestibles con capacidad de propagación a través de hijuelos. El traslado de *M. acuminata* a áreas monzónicas donde crecían plantas silvestres diploides y con semilla de *Musa balbisiana* produjo híbridos inter-específicos diploides y triploides de *M. acuminata* con *M. balbisiana*. Los primeros registros de estos cultivos datan de hace 2,500 años en la India (Océano 2000). La introducción de genes de *M. balbisiana* de regiones monzónicas más secas en clones de *M. acuminata* de trópicos más húmedos, produjo híbridos con mayor turgencia, tolerancia a sequías y enfermedades, al igual que frutos con mayor porcentaje de almidón y valor nutricional. El banano fue llevado de Indonesia a Madagascar alrededor del año 500 AD y de allí llevado a África Oriental, el Zaire y África Occidental. Los portugueses llevaron los bananos del África Occidental a las Islas Canarias y en el siglo XVI los bananos llegaron a Haití desde donde se diversificó a diferentes partes de América (Robinson., 1996).

Importancia

Los bananos derivados de *M. acuminata* son dulces y de fácil digestión. Aunque los bananos son consumidos maduros como postres, en su estado inmaduro pueden consumirse cocido. Los plátanos derivados de *M. balbisiana* contienen más almidón y se consumen generalmente cocinados, fritos o asados. Los bananos y plátanos son alimentos ricos en hidratos de carbono que son fácilmente asimilables. Aunque no pueden usarse como base de una dieta completa, ocupan el primer lugar en el consumo de frutas. En términos de comercio mundial, los bananos y plátanos son de poca trascendencia, pero en cuanto a consumo doméstico, son de vital importancia para países de la franja ecuatorial del África, donde constituyen el alimento principal de unos 70 millones de personas (Swennen *et al.*, 1995). También forman parte importante de la nutrición en el Caribe y en América Latina. Solamente una pequeña parte de la producción se utiliza para productos derivados como rebanadas de banano seco, hojuelas, purés para bebés y harina de banano. En Uganda y Tanzania, se utiliza para la producción de cerveza. Los frutos de *Musa* también se emplean para alimentación animal. Los bananos y plátanos no se prestan al procesamiento por su pH poco ácido, lo cual los hace difíciles de conservar, y a que la disponibilidad del fruto, todo el año, lo hace innecesario. Como aprovechamiento secundario se obtienen fibras de uso textil y hojas para envolver alimentos (Rosales *et al.*, 1998). En 1992, la producción mundial de *Musa* fue de 76.4

millones de toneladas de la cual el 65 % correspondió al banano y el 35 % a plátano de cocina. De los 49.6 millones de toneladas producidas 10.8 millones de toneladas o el 21.7 % se exportó. Los principales países productores de bananos de postre, en orden de importancia son: Ecuador, Costa Rica, Colombia, Las Filipinas, Honduras y Panamá. En los trópicos húmedos se cultivan una amplia variedad de plátanos de cocina generalmente para consumo local (Robinson., 1996). El INEGI reporta que en México la superficie sembrada de banano en el año 2002 fue de 77,385 hectáreas con una producción de 1,027,154 toneladas.

Clasificación taxonómica

El término *M. acuminata* se emplea para las formas puras triploide (AAA) y diploide (AA) sin semillas de bananos de postre como "Pisang Mas" y "Enano Gigante" respectivamente. En forma similar el término *M. Balbisiana* se aplica a formas puras triploides (BBB) y diploides (BB) de plátanos de cocina sin semillas como Abuhon y Saba respectivamente (Crouch *et al.*, 1998). Los muchos híbridos intermedios no poseen un nombre científico específico debido a su composición intermedia y a diferencias en ploidía. La clasificación actual se basa precisamente en la contribución relativa de éstas dos especies a los nuevos cultivares así como en su ploidía o número cromosómico (ver figura 1.1). Internacionalmente se acepta que los cultivares de banano sean referidos por el género *Musa*, seguidas por un código que denote el grupo genómico y nivel de ploidía, seguido por el nombre de subgrupo (si lo tiene) y el nombre popular del cultivar. El cultivar "Enano Gigante" se designa correctamente como: *Musa* AAA (subgrupo Cavendish) "Enano Gigante" (Robinson, 1996).

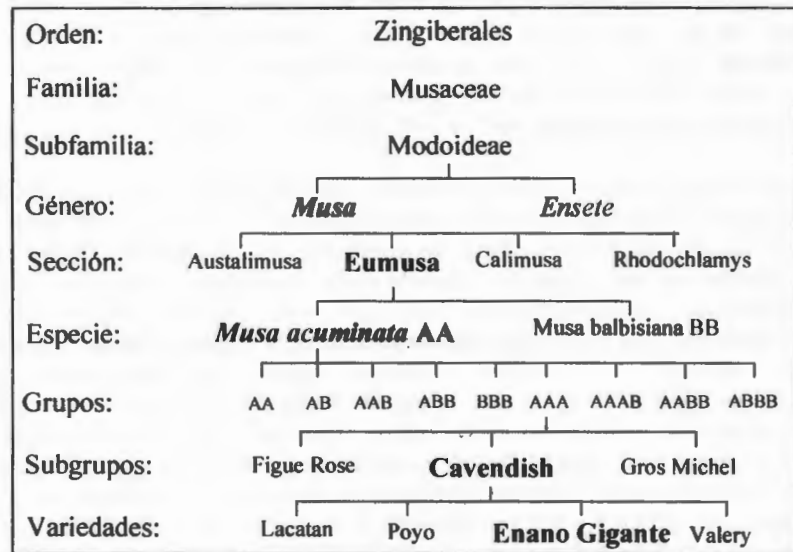


Figura 1.1 Ubicación taxonómica del cultivar "Enano Gigante"

Características morfológicas

Rizoma o pseudotallo. Los rizomas de hijuelos muestran un ligero crecimiento subterráneo horizontal antes de crecer hacia arriba. A este crecimiento no se le considera un bulbo verdadero sino un rizoma tuberoso corto. El rizoma es un importante órgano de almacenamiento para el crecimiento de la planta. El pseudotallo puede alcanzar unos 5 m de altura y 40 cm de diámetro según el clon y condiciones de desarrollo. El pseudotallo soporta el peso de hojas e inflorescencia. El rizoma posee nodos cortos cubiertos por paquetes de hojas e internamente se diferencia en un cilindro central y la corteza. El meristemo del rizoma es un domo aplanado del cual las hojas se forman en una sucesión en espiral. Solo de 3 a 5 de los brotes vegetativos que se desarrollan en la superficie externa de la corteza se desarrollan en hijuelos. Eventualmente el centro del meristemo origina una inflorescencia. Las raíces nuevas se desarrollan en grupos del cilindro central y se extienden a través de la corteza para emerger a través de la epidermis del rizoma (Soto-Ballesteros.,1985).

Raíces. El sistema de raíces es carnoso y adventicio. Las raíces primarias se originan en grupos de 3 a 4 del cilindro central del rizoma y miden de 5 a 8 mm de grosor. Las raíces son blancas en estadios juveniles y grises o café al envejecer. Los rizomas sanos producen entre 200 a 500 raíces principales. De las raíces primarias se desarrollan raíces secundarias y de estas las terciarias. Las raíces secundarias se originan cerca de la punta de la raíz primaria y se continúan produciendo a medida que aquella se extiende. Los pelos de las raíces o raíces de alimentación se producen a cierta distancia de la punta de las raíces. Estas son responsables de la mayor parte de la captación de minerales y agua. La vida funcional de las raíces primarias es de 4 a 6 meses, el de las raíces secundarias y terciarias es de 8 y 5 semanas respectivamente. Hacia la floración, se detiene el crecimiento de las raíces primarias del rizoma madre y las raíces de los hijuelos se vuelven predominantes. Las raíces primarias alcanzan comúnmente de 1 a 2 m (Robinson., 1996).

Hojas. Las plantas triploides tienen hojas más grandes y gruesas que las plantas diploides. Las hojas alcanzan dimensiones de 1.5 a 2.8 m de largo por 0.4 a 0.9 m de ancho con pseudo pecíolos de entre 30 a 90 cm según el clon (Ver figura 1.2). La densidad de las estomas sobre la cara abaxial es 3 veces la adaxial. Las hojas se distribuyen en forma espiral. Las hojas más grandes son las que emergen antes de la floración. La hoja tarda en abrirse de 6 a 8 días y tiene inicialmente una orientación vertical. Al emerger nuevas hojas, se desplazan quedando horizontalmente. En los trópicos las primeras hojas viven unos 50 días. Las hojas producidas antes de la floración viven hasta 150 días. En los subtrópicos fríos, las últimas hojas pueden vivir hasta 280 días. Hacia la floración se incrementa el número de hojas de 10 a 15 con un área de aproximadamente 25 m². Después de la floración, no hay surgimiento de hojas nuevas. Durante la cosecha, las hojas se reducen entre 5 a 10. El número de hojas que emergen antes de la floración varía de 25 a 50.

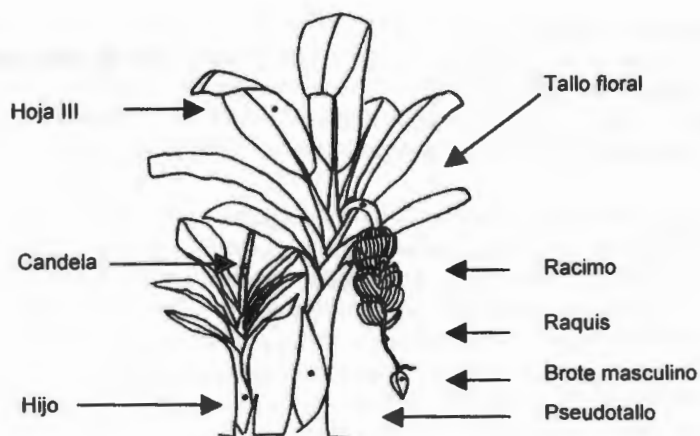


Figura 1.2 Esquema de una planta de banano.

Inflorescencias. Estas se desarrollan del meristemo apical del pseudotallo. La inflorescencia se desarrolla rápidamente 4 a 6 semanas antes de emerger. El inicio de su crecimiento no es visible y se desconoce la naturaleza del estímulo que lo origina. Se requiere de una etapa crítica del desarrollo del rizoma, de cierta área foliar y posiblemente de un estímulo hormonal (Stover and Simmonds., 1987). La inflorescencia se inicia cuando el meristemo apical muestra actividad mitótica intensa y da lugar a un domo. Brácteas florales aparecen en lugar de hojas. Primero aparecen brácteas femeninas y después masculinas. Todas las brácteas portan almohadillas meristemáticas axilares del cual las flores se diferencian. La inflorescencia es una espiga compleja y consiste de un pedúnculo robusto en el cual las flores se arreglan en un cúmulo nodal. Los nodos con filas dobles de flores femeninas son llamados manos.

Racimos. El tamaño del racimo se establece por el tamaño del meristemo en el momento de la fecundación. Las frutas individuales que se desarrollan de las flores femeninas son llamadas dedos. El número de manos por racimo y dedos por mano se determina al inicio de la floración por el número de flores femeninas. El número de frutos individuales por mano varía de 10 a 30. El tamaño final de los dedos es función del grupo genómico, número de hojas y área foliar, fertilidad del suelo, irrigación y temperatura. Los plátanos AAA Cavendish, en los subtrópicos, producen de 5 a 6 manos, mientras que en el verano, en los trópicos, pueden producirse hasta 16 manos. El peso de los racimos Cavendish puede variar de 15 a 70 kg (Robinson., 1996).

Frutos. Los frutos son bayas con pericarpio. En las plantas con semilla la polinización es esencial para el desarrollo del fruto. En estas, las frutas maduras contienen una masa de semillas negras y duras rodeadas por una pulpa dulce. La ausencia de semillas se debe a genes de esterilidad femenina específica y a la carencia de polen debido a triploidía. Los frutos de plátanos comestibles son

parternocarpicos (Crouch *et al.*, 1998). El fruto se desarrolla en dos fases. En la preemergencia crece la cáscara. La pulpa crece hasta que la fruta se reorienta hacia abajo. El crecimiento de los dedos es acelerado los primeros 30 días y este se completa entre el día 40 al 80 dependiendo del clima. El incremento en el diámetro de los frutos es lento pero continuo hasta la cosecha (Robinson., 1996).

Hijuelos. Hay dos tipos de hijuelos: hijuelos “espada” e hijuelos acuosos. Los primeros se originan de brotes axilares de la parte inferior del rizoma madre, poseen una fuerte conexión materna y desarrollan bases anchas y hojas angostas. Los hijuelos acuosos se originan de brotes cercanos a la superficie del suelo o de rizomas viejos. Usualmente tienen una conexión débil con el rizoma madre y poseen bases angostas y hojas gruesas; no se desarrollan en plantas fuertes y vigorosas. El crecimiento de hijuelos alrededor del rizoma no es aleatorio. Los primeros cinco brotes crecen en un orden pentagonal específico. Usualmente se selecciona un hijuelo espada para propagar la planta (Soto-Ballesteros., 1985).

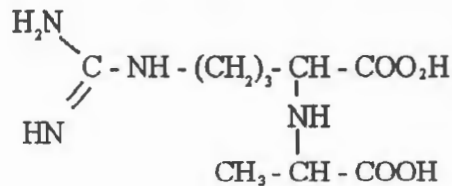
LA TRANSFORMACIÓN MEDIADA POR AGROBACTERIUM TUMEFACIENS: NUEVOS ALCANCES Y PERSPECTIVAS.

Generalidades

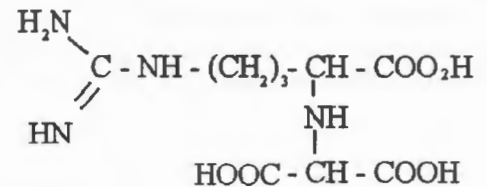
El proceso de transformación genética de células es un evento que se presenta en forma natural en algunos seres vivos, originando así cambios en las características de tales organismos. Los procesos de infección viral y la resistencia adquirida de las bacterias a antibióticos son ejemplos bastante contundentes. Sin embargo, un proceso también común, pero más visible por su efecto en las plantas y aún no totalmente elucidado, es la transferencia y transformación genética llevada a cabo por las bacterias del género *Agrobacterium*, (*A. rhizogenes*, *A. tumefaciens* y *A. vitis*) sobre organismos eucariotas, específicamente plantas y algunos hongos. Este grupo de bacterias pertenece a la familia Rhizobiaceae, donde también se incluyen a *Rhizobium* y *Phyllobacterium*. *Agrobacterium* sp. abarca bacterias patógenas, Gram-negativas, no esporulantes, móviles, que crecen en el suelo. Inicialmente estas bacterias fueron conocidas por su capacidad de causar tumores. Posteriormente, estudios específicos demostraron que esta alteración del crecimiento es consecuencia de un desequilibrio de fitorreguladores, (compuestos orgánicos distintos de los nutrientes que en pequeñas cantidades estimulan, inhiben o modifican de cualquier otro modo cualquier proceso fisiológico de las plantas). Los estudios moleculares, por su parte, demostraron que estas bacterias son únicas, por su habilidad de llevar a cabo una transferencia de material genético entre especies de diferentes reinos, en este caso entre procariotas y plantas, lo que permitió explicar la aparición de crecimiento neoplásico. A la fecha, esta característica es utilizada como herramienta para estudios biotecnológicos de transformación. En los últimos años se ha demostrado la posibilidad de transformación genética de células de hongos y animales (Kunik y cols., 2001). En este trabajo, se analiza brevemente el proceso mediado por *Agrobacterium tumefaciens*, se presentan ejemplos de su empleo como herramienta biotecnológica, se plantean algunos de los hallazgos más recientes y se comentan las nuevas perspectivas que derivan de estos hechos.

Proceso de infección por *Agrobacterium*

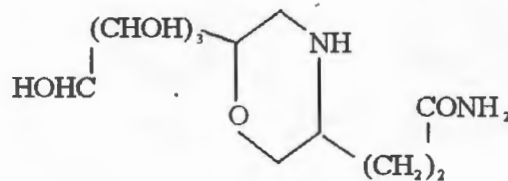
Históricamente, *Agrobacterium* ha sido conocida como una bacteria fitopatógena capaz de ocasionar la aparición de agallas, tumores e inclusive la muerte de las plantas infectadas, principalmente en dicotiledóneas y algunas gimnospermas. Los estudios iniciales indicaron que los tumores presentaban alteraciones en el metabolismo de sus fitoreguladores y sintetizaban unas sustancias llamadas opinas, compuestos que las bacterias utilizaban como fuente de carbono y nitrógeno (Figura 1.3).



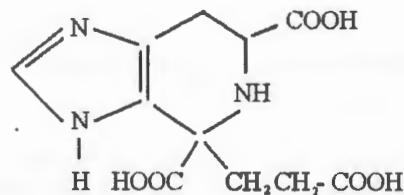
OCTOPINA



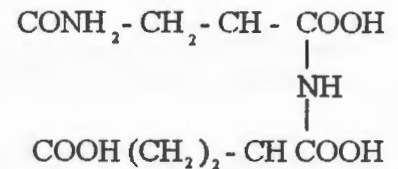
NOPALINA



AGROPINA



CUCUMOPINA



SUCCINAMOPINA

Figura 1.3. Estructura química de algunas opinas. Las opinas son moléculas que funcionan como fuente nutricional para *Agrobacterium tumefaciens*.

Estas bacterias, además de su cromosoma circular, poseen material genético extracromosomal de forma circular de aproximadamente 200 Kb el cual, por ser el responsable de los efectos oncogénicos, ha sido llamado plásmido Ti (Tumor inducing, inductor de tumores) o Ri (Root inducing, inductor de raíces) según pertenezca a *A. tumefaciens* o *A. rhizogenes* respectivamente. Análisis más finos demostraron la existencia de un proceso de transferencia de material genético de la bacteria hacia las células vegetales: una secuencia de ADN llamada T-ADN (Transferred DNA) presente en el plásmido que poseen. Esta secuencia, delimitada hacia ambos extremos por una franja repetida de 25 pares de bases, tiene un tamaño de aproximadamente 35 Kb.

La información genética transferida incluye genes para la síntesis de metabolitos para la bacteria y genes para la síntesis de fitorreguladores. En otra parte del plásmido, fuera de la región del T-ADN, se halla la información para la producción de proteínas de virulencia, los genes *virA* y *virG*, cuyos productos funcionan para la transducción de señales en la bacteria (ver figura 1.4).

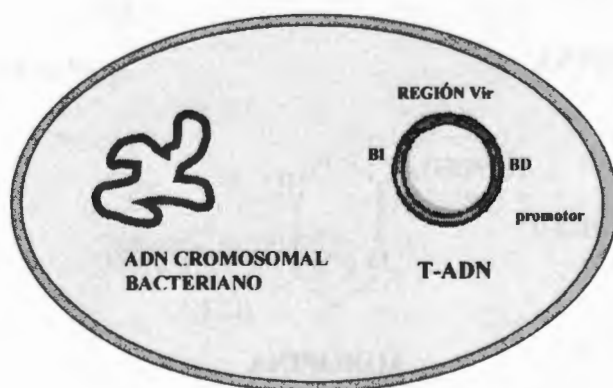
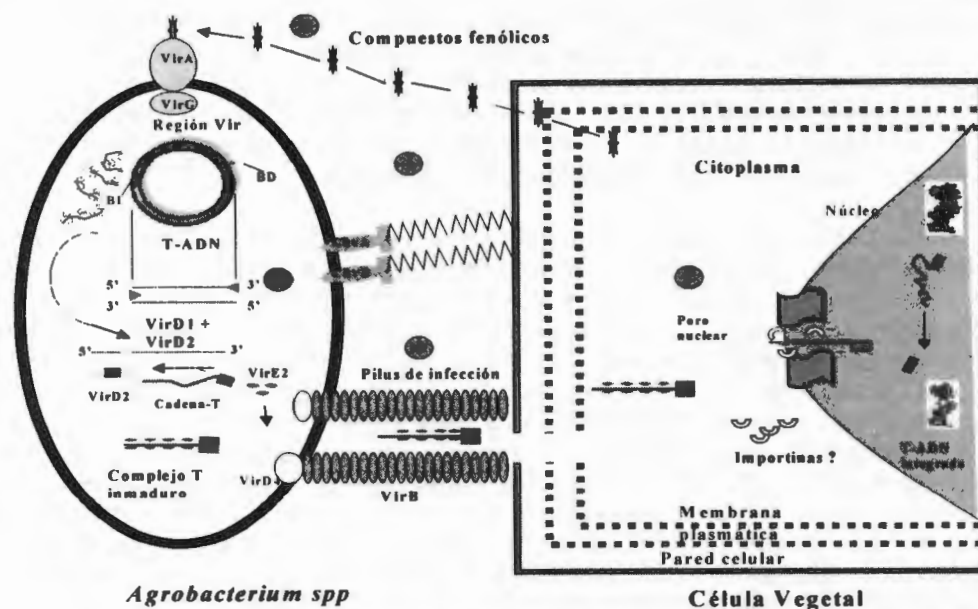


Figura 1.4. Esquema general de la estructura celular de *Agrobacterium tumefaciens* ilustrando el cromosoma bacteriano y el plásmido Ti.

Estudios bioquímicos y moleculares han permitido modelar el proceso de infección y transformación de la siguiente manera. En el momento en que una planta sufre daño mecánico, las células del área dañada liberan una serie de sustancias conocidas como compuestos fenólicos, los cuales son percibidos y sentidos por *A. tumefaciens*, actuando como mensajeros que les indican el lugar para una posible invasión y posterior infección como se ilustra en la figura 1.5



Agrobacterium spp **Célula Vegetal**

Figura 1.5 Modelo del proceso de Infección de las células vegetales por *Agrobacterium tumefaciens*. Etapa I, percepción de los compuestos fenólicos y adhesión de la bacteria a la pared celular vegetal. Etapa II, modulación de la expresión de los genes de virulencia de la bacteria, (El operon *vir*, se encuentra ubicado en el plásmido Ti). Etapa III, formación del complejo de transferencia de T-ADN. Etapa IV, formación de un canal de transporte en la membrana celular bacteriana. Etapa V, integración del T-ADN al genoma de la célula vegetal, proceso que supone una participación activa de las proteínas vegetales (Tomado y modificado de Tzfira y Citovsky, 2002).

Se sabe que el compuesto fenólico acetosiringona es un poderoso atrayente de las bacterias, mas no el único. Existe evidencia de la participación de proteínas (codificadas en el cromosoma bacteriano) durante el proceso de reconocimiento, específicamente los productos de los loci *Chv*, esenciales para la adhesión de la bacteria a la pared celular vegetal (figura 1.5 etapa I.)

Posteriormente, los compuestos fenólicos interactúan con una proteína transmembranal de la bacteria, VirA, la cual se autofosforila y actúa sobre la proteína citoplásmica VirG, fosforilándola; a su vez, esta modula la expresión de los genes de virulencia de la bacteria, el operon *Vir* ubicado en el plásmido Ti. Ver figura 1.5, etapa II. Posteriormente, se genera una cadena sencilla del T-ADN mediante la acción de dos proteínas, VirD2 y VirD1, las cuales actúan como endonucleasas, cortando y relajando la doble cadena, generando una hebra antisentido. La proteína VirD2 se une a la hebra T en su extremo 5'. Adicionalmente, otras proteínas, VirE2, forman una estructura semejante a un cordón telefónico con la hebra de ADN. Estos tres elementos forman el complejo de transferencia de T-ADN, figura 1.5, etapa III (Tinland y Cols., 1994).

Para explicar la entrada de este complejo de transferencia de ADN a la célula vegetal, se ha propuesto un mecanismo similar al pilus de otras bacterias, (sistema de secreción tipo IV). En el caso específico de *A. tumefaciens*, el pilus esta formado por las proteínas VirB2 y VirB5, y otras proteínas, principalmente VirB4 y VirB11 con actividad de ATPasa, acoplado la producción de energía con el transporte del complejo de transferencia de ADN. Otras proteínas involucradas son VirB6, VirB7 y VirB9 las cuales funcionan en la configuración de un canal de transporte en la membrana celular bacteriana (Véase figura 1.5, etapa IV.)

La entrada del complejo de transferencia del T-ADN, se ha explicado en base a la secuencia de aminoácidos encontrado en las proteínas VirD2 y VirE2 (proteínas que se unen a la cadena simple de ADN). Estas proteínas poseen señales de localización nuclear que permiten su dirección y transporte al núcleo, y por lo tanto interactuar con proteínas similares a las chaperonas. Por último, la integración del T-ADN al genoma de la célula vegetal, no se ha elucidado del todo. Algunos descubrimientos aislados permiten dar una explicación general. Por ejemplo, se ha encontrado que la proteína VirD2 posee adicionalmente actividad de ligasa y de integrasa, mientras que VirE2 parece estar involucrada en el proceso de integración. Con respecto a otros factores, se desconoce cuantos, cuales o cual es la actividad de estos, aunque los últimos reportes indican una participación activa de las proteínas vegetales en estos procesos, sea como proteínas chaperonas o como componentes de la maquinaria celular de reparación de ADN. (Figura 1.5, etapa V.)

A. *tumefaciens* como herramienta biotecnológica

Por años, y de acuerdo al desarrollo de las metodologías, *A. tumefaciens* se ha empleado como un instrumento biotecnológico rutinario para el desarrollo de plantas transgénicas, especialmente en plantas dicotiledóneas y en menor proporción en plantas monocotiledóneas. En la tabla 1 se presentan algunos ejemplos de plantas transgénicas y sus características generadas mediante el empleo de *Agrobacterium* como herramienta biotecnológica.

Tabla 1.1 Ejemplos prácticos del uso de *A. tumefaciens* como herramienta biotecnológica.

Ejemplo	Protocolo empleado	Referencia
Tabaco resistentes a insectos por producción de la toxina de <i>Bacillus thuringiensis</i> en sus tejidos.	Infección de tejidos mediante <i>A. tumefaciens</i> . Cepa A208.	Perlak y cols., 1990.
Sobreprducción de α y β -caroteno en semillas de canola (<i>Brassica napus</i>).	Transformación de hipocótilos mediante infección con <i>A. tumefaciens</i> .	Shewmaker y cols., 1999.
Producción y acumulación de astaxantina, un carotenoide de origen bacteriano en tabaco.	Infección de discos foliares con <i>A. tumefaciens</i> cepa EHA105.	Mann y cols., 2000.
Desarrollo del arroz dorado, una variedad que produce y acumula en los granos β -caroteno, un precursor de la vitamina A	Cocultivo de embriones con <i>A. tumefaciens</i> , cepa LBA4404.	Ye y cols., 2000.

Las plantas transformadas mediante *Agrobacterium* fueron diseñadas para que expresen una característica particular, por ejemplo: resistencia a herbicidas,

producción de un nuevo compuesto, mejoramiento de la productividad, etc. Los ejemplos son bastantes, por lo que solo mencionaremos dos. Lee y cols. (1991) reportaron la transformación genética de *Brassica napus*, con un gen que codifica para una proteína de las llamadas oleosinas (clonada a partir de maíz, una monocotiledónea) lográndose la expresión tejido-específica de dicha secuencia. Dado que las oleosinas son proteínas cuya función es importante en el almacenamiento de lípidos en semillas, el incremento en la expresión de estas proteínas es necesario para el mejoramiento de las características nutricionales de cultivos como es el caso de las oleaginosas. Mas recientemente Jeknic y cols., (1999) reportaron la transformación genética de *Iris germánica*, una monocotiledónea ornamental cuyo valor como fuente de compuestos cetónicos con aroma de violetas es de gran importancia en la industria cosmética y perfumería; esta planta, sin embargo, presenta problemas de incompatibilidad interespecífica por los que los trabajos de transformación abren nuevas posibilidades de mejoramiento genético. Estos estudios demuestran el alcance de la transformación genética mediada por *A. tumefaciens*, además de que plantean la posibilidad de un impacto económico en la productividad de dichos cultivos. Sin embargo, los hallazgos recientes permiten visualizar más allá de la simple producción de plantas transgénicas y el mejoramiento genético, como se discute a continuación.

Los nuevos horizontes

El poder de la transformación genética va mas allá de una simple herramienta. Se vislumbra como una alternativa para la elucidación del papel de los diversos componente celulares en procesos hasta ahora poco comprendidos o estudiados. Por ejemplo, se ha reportado la transformación genética del hongo fitopatígeno *Mycosphaerella graminicola*, generando mutantes debido a la integración del gen ABC que normalmente codifica para una proteína membranal de transporte. Estos transformantes son de gran valor para estudiar y desentrañar los mecanismos moleculares de patogenicidad del hongo.

Por otra parte, otros estudios han demostrado que una mutante de *Arabidopsis thaliana* afectada en el gen de la histona H2A, es resistente a la transformación mediada por *A. tumefaciens*. Lo anterior permite establecer la hipótesis de que las histonas desempeñan un papel crucial en la recombinación ilegítima de la cadena sencilla de ADN en el genoma de las plantas durante el proceso de transformación al modificar la conformación de la cromatina. Así mismo, ensayos realizados con la proteína VirE2, y mediante experimentos con bicapas o vesículas lípidas, han demostrado que esa proteína se puede insertar en membranas artificiales y formar canales específicos para cadenas sencillas de ADN. Estos resultados demuestran la función de VirE2 como un transportador transmembranal de ADN de cadena sencilla y por lo tanto su posible empleo como una herramienta en trabajos de direccionamiento e inserción de ADN en genomas de diferentes especies. En relación a este punto, Ziemienowics y cols., (2001) estudiando las proteínas VirD2 y VirE2 en la importación del T-ADN hacia el núcleo celular, encontraron que VirD2 es suficiente para transportar al núcleo oligonucleotidos, mientras que para secuencias más largas se requiere de ambas proteínas, concluyendo que VirE2 participa activamente en la

translocación del complejo por interacciones específicas con el canal del poro. Los resultados obtenidos les permiten proponer un modelo en el cual, el complejo protegido por VirE2 es direccionado hacia el polo nuclear debido a las señales de localización nuclear de VirD2, reconocidas por un receptor llamado importina α . El complejo unido a la importina α se dirige hacia el poro posiblemente a través de otra importina hipotética y el extremo 5' es dirigido hacia el poro donde se inicia la translocación del complejo. Este trabajo permite plantear un posible "aprendizaje" por parte de los patógenos respecto al funcionamiento de la maquinaria celular de sus hospederos y el modo como ocurre la cooperación entre proteínas procarióticas (de *A. tumefaciens*) y eucarióticas (del hospedero), por lo que se puede considerar la factibilidad de transformar genéticamente otros tipos de células incluyendo las células humanas.

Recientemente, Kunik y cols., (2001) lograron obtener células humanas genéticamente transformadas mediante el empleo de *A. tumefaciens*, encontrando además, ciertos elementos similares a los que ocurren en células vegetales. Este estudio abre una amplia gama de posibilidades. Por ejemplo, la posibilidad de la terapia genética, lo cual podría llevar hacia la cura de enfermedades como el cáncer y el reemplazo de genes defectuosos (como es el caso de enfermedades como la hemofilia, fibrosis quística, etc.). Colateralmente surgieron otros resultados y otras interrogantes no menos importantes, como el hecho de que las células humanas se hubieran transformado tanto en presencia como en ausencia de acetosiringona, un inductor del operón *vir* de *A. tumefaciens*, lo anterior lleva a plantear la posibilidad de que las células humanas (y por extensión las animales) tengan ciertos elementos que le permitan integrar el T-ADN independientemente de la acción de los genes *vir*. Finalmente, un aspecto que permanece poco conocido es la integración del T-ADN en el genoma de la célula. A pesar de que VirD2 funciona como ligasa, cabe la posibilidad de que otras enzimas estén involucradas también en el proceso, como las polimerasas (enzimas cuya función es convertir a cadena doble la hebra sencilla del T-ADN integrado). Además, el proceso en si requiere de otras proteínas involucradas en el cambio conformacional de la cromatina, corte de las hebras de ADN durante la integración y transporte intranuclear del complejo T-ADN. Adicionalmente se ha planteado que la integración ocurre en regiones transcripcionalmente activas del genoma, que se consideran temporalmente libres de histonas, lo cual facilitaría dicha integración.

Conclusiones

Al punto actual, podemos manejar toda la información desde la perspectiva tradicional, *A. tumefaciens* como herramienta para transformar tejidos vegetales o, de manera mucho más ambiciosa, como un sistema que puede ser desintegrado en sus componentes moleculares y utilizarlos como herramientas individuales no solo para transformar células vegetales sino también células animales y de hongos, para elucidar procesos moleculares en las células, terapia genética, manipulación para expresar o silenciar genes, etc. Las oportunidades para ampliar los usos de *Agrobacterium* como herramienta biotecnológica son inmensas.

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE BANANO

Mejoramiento tradicional del banano

El primer programa de mejoramiento del banano se inició 1922 en Trinidad y Jamaica y continuó hasta 1980. A partir de 1959, Honduras inicia otro programa de mejoramiento del banano apoyado por la compañía United Fruit Company; el programa se transfiere en 1984 a Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA). Aunque otros programas se han iniciado también en Nigeria, Brasil, India y Australia, poco éxito se ha obtenido en el mejoramiento del banano en los últimos 80 años. En 1989 FHIA libera el tetraploide FHIA-01 o Goldfinger como el banano de postre más prometedor pues combina resistencia al Sigatoka negra y al marchitamiento por *Fusarium* (Pérez-Hernández, 2000)

Cultivo de tejidos y transformación genética del banano

Cox *et al.*, (1960) iniciaron los primeros avances biotecnológicos para el mejoramiento del banano cuando reportaron los primeros cultivos *in vitro* de embriones zigóticos. Ma y Shii (1972), describen la propagación clonal de meristemas cultivados *in vitro*. Cronauer y Krikorian (1984), reportan la regeneración de plantas a partir de embriogénesis somática, lo que abre nuevas posibilidades para el mejoramiento genético de bananos y plátanos. La variación somaclonal y las mutaciones inducidas artificialmente son enfoques alternativos al cultivo tradicional. Los cultivos de tejidos meristemáticos así como la embriogénesis somática son el blanco para la aplicación de la ingeniería genética para el mejoramiento de banano y plátanos (Sági *et al.*, 1998).

Sági *et al.*, en 1984 reportaron la expresión genética transitoria en protoplastos del plátano de cocina Bluggoe transformados por electroporación. Un año después, Sági *et al.*, (1995), confirmó regenerantes transformados por biobalística a partir de suspensiones de células embriogénicas. En el mismo año, se reportó la obtención de regenerantes "no quiméricos" del cultivar "Enano Gigante" transformados por cocultivo con *Agrobacterium* (May *et al.*, 1995). Becker *et al.*, (2000), regeneró plantas transgénicas del cultivar "Enano Gigante" de cultivos embriogénicos transformados por biobalística. Un éxito similar se reportó para la transformación por cocultivo con *Agrobacterium* de suspensiones de células embriogénicas el cultivo Rasthali (AAB) (Ganapathi *et al.*, 2000). Recientemente se reportó la transformación mediada por *A. tumefaciens* de tejidos de banano "Enano Gigante". Utilizando tejidos de hojas, bulbos y raíces se obtuvo una expresión genética transitoria, mientras que para suspensiones de células embriogénicas se consiguió una transformación eficiente (Pérez- Hernández.,2000).

Transformación genética de banano por infiltración al vacío

Por otra parte, también se tienen antecedentes de métodos de transformación mediados por *A. tumefaciens* por infiltración al vacío. Tjokrokusumo *et al.*, (2000)

reportó la infiltración al vacío de polen de petunia con *A. tumefaciens*. Aunque en este trabajo se reportan frecuencias similares de transformación genética al polinizar flores con polen infiltrado al vacío con *A. tumefaciens* o el aplicar una gota de la suspensión bacteriana al estigma previo a la polinización, otros trabajos mencionan mejores resultados; Así, Ronde *et al.* en el 2001 reporta la transformación de semillas de soya mediadas por *A. tumefaciens* por infiltración al vacío. Este protocolo se presenta como un método simple y rápido que no requiere del cultivo de tejidos y permite la obtención de plantas transformadas en forma directa con un incremento en el porcentaje de transformantes del 6 al 30%. Charity *et al.*, en el 2002 reporta la transformación de tejidos organogénicos de *Pinus radiata*. En este trabajo, se evalúa la infiltración al vacío como un medio para incrementar la eficiencia de transferencia génica al mejorar la penetración de las células de *Agrobacterium* en las capas de tejidos celulares. La infiltración al vacío incremento significativamente el porcentaje de área de los cotiledones expresando al gen *uidA* como un incremento en intensidad del color azul en tejidos infiltrados.

JUSTIFICACIÓN

En *Musa*, el mejoramiento convencional es difícil por el hecho de que solo algunas clonas diploides producen polen viable y porque el germoplasma de las principales clonas comerciales presentan esterilidad masculina o femenina (Novak *et al.*, 1989).

Los métodos de transferencia génica asexual, como la transformación, son una alternativa viable para introducir características ausentes en bancos genéticos de *Musa* o para el mejoramiento genético de aquellos cultivares no adecuados para el mejoramiento por cruza convencionales tal como es el caso del cultivar *Musa* AAA (subgrupo Cavendish) "Enano Gigante".

Recientemente se ha logrado un éxito relativo a través de los métodos de ingeniería genética para la transformación de bananos. Los avances han permitido la transferencia de genes foráneos a células de estos cultivares. Actualmente diferentes protocolos de transformación de banano se encuentran disponibles para bananos y plátanos. Crouch *et al.*, (1998), considera que la transformación de meristemas heridos por cocultivo con *Agrobacterium* es más adecuado que otros sistemas de transformación por basarse éste en el uso de tejido diferenciado que puede regenerarse rutinariamente a plantas completas. Por otra parte, el sistema de regeneración a partir de meristemas ha sido aplicado ya a varios cultivares de bananos y plátanos e híbridos sintéticos (Crouch *et al.*, 1998).

A la fecha existen diferentes protocolos de transformación de banano que utilizan diferentes sistema de cultivo *in vitro*, sin embargo, no existe ningún reporte que indique la transformación de tejidos meristemáticos mediante infiltración al vacío. Lo anterior abre la alternativa, y justifica, la implementación de un protocolo simple, mediado por *A. tumefaciens* que permite la transformación directa de tejidos meristemáticos de banano por infiltración al vacío.

Por último, la transformación de cultivos de bananos de postre triploides estériles podría tener un importante impacto comercial. De hecho, la comunidad científica espera que en los próximos años se realice la liberación al mercado de cultivos de bananos transgénicos (Crouch *et al.*, 1998).

OBJETIVO

El presente trabajo tiene como objetivo principal el desarrollar un protocolo de transformación mediado por *Agrobacterium tumefaciens* para banano "Enano Gigante" por infiltración al vacío.

Objetivos particulares:

1. Comprobar la capacidad de regeneración de tejidos meristemáticos de banano.
2. Definir la concentración óptima de kanamicina como agente de selección de tejidos de banano.
3. Transformar la cepa de *A. tumefaciens* EHA105 con los vectores: pCambia 2301, pCH32 y BIBAC2.
4. Eliminar el crecimiento de *A. tumefaciens* de tejidos co-cultivados con *Agrobacterium*.
5. Someter a ensayos de transformación al vacío, tejidos meristemáticos de banano (*scalps*).
6. Comprobar la transformación de los tejidos de banano por análisis histoquímico de GUS, por análisis fluorométrico de GUS y PCR.
7. Evaluar la capacidad de regeneración de los tejidos meristemáticos transformados.

REFERENCIAS

- Cox E., Sottzky G. and Goss R. (1960). In vitro Culture of *Musa Balbisiana*. Colla. embryos. Nature 185: 403-404
- Becker D.K., Dugdale B., Smith M.K., Hardin R.M. and Dale J.L. (2000). Genetic transformation of Cavendish Banana (*Musa ssp.* AAA group) cv "Grand Naine" via microprojectile bombardment. Plant Cell Reports, 19, 229-234.
- Charity J.A., Holland L., Donaldson S.S., Grace L. and Walter C. (2001) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Pinus radiata* organogenic tissue using vacuum infiltration. Plant Cell Tissue and Organ Culture 70: 51-60.
- Cronauer S.S. and Krikorian A.D. (1984). Rapid multiplication of bananas and plantains in vitro shoot tip culture. HortScience 19: 234-235
- Crouch J.H., Vuylsteke D. and Ortiz R. (1998). Perspectives on the application of biotechnology to assist the genetic enhancement of plantain and banana (*Musa ssp.*). Electronic Journal of Biotechnology. <http://www.ejb.org>. 1: 1-12.

- Ganapathi T.R., Higgs N.S., Balint-Kurti P.J., Arntzen C.J., May G.D. and Van Eck J.M.** (2000). *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic cell suspension of banana cultivar Rasthali (AAA). *Plant Cell Reports*. 20: 157-162.
- Gelvin S.B.** (2000), "*Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration" *Annual Review of Plant Physiology. Plant Molecular Biology*. 51, 223-256.
- Hooykaas P.J.J.** (1989), "Transformation of plant cells via *Agrobacterium* ", *Plant Molecular Biology*, 13, 327-336.
- INEGI.** (2002). <http://www.inegi.gob.mx/difusion/espanol/>
- Jeknic Z., Lee S.P., Davis J., Ernst R.C. and Chen T.H.H.** (1999), "Genetic transformation of *Iris germanica* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*", *Journal of American Society for Horticultural Science*, 12, 565-580.
- Kunik T., Tzfira T., Kapulnik Y., Gafni Y., Dingwall C. and Citovsky V.** (2001), "Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 1871- 1876.
- Lee W.S., Tzen J.T.C., Kridl J.C., Radke S.E. and Huang A.H.C.** (1991), "Maize oleosin is correctly targeted to seed oil bodies in *Brassica napus* transformed with the maize oleosin gene", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88, 6181-6185.
- Ma S. And Shii C.** (1972). In vitro formation of adventitious buds in banana shoot apex following decapitation. *J. Chin Soc. Hort. Sci.* 18:145-142
- May G.D., Afza R., Mason H.S., Wiecko A., Novak F.J. and Arntzen C.J.** (1995). *Generation of Transgenic banana (Musa acuminata) Plants via Agrobacterium-Mediated Transformation. Biotechnology*. 13: 486-492.
- Mannv M., Harker I., Pecker and Hirschberg J.** (2000), "Metabolic engineering of astaxanthin production in tobacco flowers", *Nature Biotechnology*, 18, 888-892.
- Mysore K., Kumar C.T.R. and Gelvin S.B.** (2000), "*Arabidopsis* ecotypes and Mutants that are recalcitrant to *Agrobacterium* root transformation and susceptible to germ-line transformation", *The Plant Journal*, 21, 9-16.
- Gispert C. Edit.** (2000). *Enciclopedia práctica de la Agricultura y Ganadería*. Arboricultura. Océano Centrum. Barcelona España. 676-680
- Pérez-Hernandez J.B.** (2000). Development and application of *Agrobacterium*-mediated Genetic Transformation to increase Fungus-Resistance in Banana (*Musa* spp). Ph. D. Tesis Katholieke Universiteit Leuven, Belgium.

- Perlak F.J., Deaton R.W., Armstrong T.A., Fuchs R.L., Sims S.R., Greenplate J.T. and Fischhoff D.A.** (1990), "Insect resistant cotton plants", *Biotechnology*, 8, 939-943.
- Robinson J.C.** (1996). *Bananas and Plantains*. University Press Cambridge. UK. Cap. 1, y 3.
- Ronde J.A., Cress W.A. and Van Der Mescht A.** (2001). *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean (*Glycine max*) seed with the β -glucuronidase marker gene. *South African Journal of Science* 97: 421-424.
- Rosales F., Sharrock S. and Tripon S.** (1998). La importancia de las *Musaceas* en el mundo. pp 9-17
- Shewmaker C.K., Sheehy J.A., Daley M., Colburn S. and Ke D.Y.** (1999), "Seed-Specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects", *The Plant Journal*, 20, 401-412.
- Soto-Ballestos M.** (1985) *Bananos, Cultivo y Comercialización*. Ed. Lil S.A. Costa Rica. Cap: 1, 2 y 4.
- Sági L., Remy S., Panis B., Swennen R. and Volckaert G.** (1984). Transient gene expression in electroporated banana (*Musa* spp., cv "Bluggoe" ABB group) protoplast isolated from regenerable embryogenic cell suspension. *Plant Cell Reports* 13:262-266.
- Stover and Simmonds.** (1987). *N.W. Bananas*, 3rd edición. Longman, London.
- Swennen R., Vuylsteke D. and Ortiz R.** (1995). Phenotypic diversity and patterns of variation in west and central African plantains (*Musa* spp., AAA group *Musaceae*). *Economic Botany* 49:320-327.
- Tinland B., Hohn B. and Puchta H.** (1994), "*Agrobacterium tumefaciens* transfers single-stranded transferred (T-DNA) into the plant cell nucleus, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91, 8000-8004.
- Tjokrokusumo D., Heinrich T., Wylie S., Potter R. and McComb J.** (2000). Vacuum infiltration of petunia hybrida pollen with *Agrobacterium tumefaciens* to achieve plant transformation. *Plant Cell Reports*. 19: 792-797.
- Tzfira T. and Citovsky V.** (2000), "From host recognition to T-DNA integration: the function of bacterial and plant genes in the *Agrobacterium*-plant cell interaction", *Molecular Plant Pathology*. 1, 201-212.
- Tzfira T. and Citovsky V.** (2002), "Partners in-infection : host proteins involved in the transformation of plant cells by *Agrobacterium*", *Trends in Cell Biology*, 12, 121-129.

Ye X., Al-Balili S., Kloti A., Zhang J. Lucca P., Beyer P. and Potrykus I. (2000),
"Engineering the provitamin A (β -carotene) Biosynthetic pathway into
(carotenoid free) rice endosperm" *Science*, 287, 303-305.

Ziemiencowicz A., Merkle T., Schoumacher F., Hohn B. and Rossi L. (2001).
"Import of *Agrobacterium* T-DNA into plant nuclei: two distinct functions of
virD2 and virE2 proteins", *The Plant Cell*, 13, 369-383.

CAPÍTULO II

Evaluación de kanamicina como agente de selección para la transformación de *Musa* cv. "Enano Gigante"

RESUMEN

En este trabajo, se presenta el efecto de diferentes concentraciones de kanamicina en el crecimiento y morfogénesis de tejidos meristemáticos de banano "Enano Gigante". Los resultados obtenidos permitieron establecer la concentración de kanamicina para la selección de tejidos de banano transformados con el gen *nptII*. A partir del día 30, no se observó diferencia estadística significativa entre los pesos frescos registrados para cada tratamiento ensayado aunque si se registro una diferencia estadística significativa con el control.

La determinación de la concentración de kanamicina como agente de selección para tejidos de banano se baso en el registro de su crecimiento relativo y en el desarrollo morfológico de los mismos. Se concluyó que la concentración de kanamicina de 150 mg L⁻¹ fue la mas adecuada al permitir una inhibición satisfactoria en el crecimiento de los tejidos, así como en su morfogénesis. Este resultado permitió proceder con la selección de tejidos de banano transformados con resistencia a kanamicina por integración del gen *nptII*.

INTRODUCCIÓN

En las pasadas dos décadas, el mejoramiento genético de bananos y plátanos, *Musa* sp., por métodos clásicos, ha tenido progresos muy moderados en la producción de plantas con características agronómicas superiores en rendimiento y resistencia a enfermedades (principalmente hongos y nemátodos). De hecho, el cultivo convencional para la obtención de plantas de banano y plátano resistentes a enfermedades ha estado impedido por niveles altos de esterilidad de gametos femeninos y masculinos, poliploidia, tiempos de generación prolongados, combinaciones genómicas diferentes de germoplasma y la necesidad de retener las características nuevas en la progenie (Fullerton and Olsen, 1995). Los híbridos producidos en los programas de cultivo clásico a menudo carecen de una o más características importantes tales como el sabor o aroma; fisiología poscosecha o forma adecuada de racimos de frutos, problemas de enanismos, ciclos de maduración cortos etc.

La ingeniería genética como un método alternativo para el mejoramiento de las plantas de banano tiene la ventaja de poder integrar nuevas características a la planta sin cambiar características deseables existentes en el cultivar. Como la planta de banano se propaga vegetativamente, si estas características se expresan, ofrecen una ganancia genética inmediata. La mayoría de los protocolos de transformación requieren un paso de cultivo de tejidos, el cual permite la generación de plantas transgénicas a través de organogénesis o embriogénesis somática mediante el uso de fitorreguladores y otros compuestos en el medio de cultivo.

Algunas especies tales como la soya, el banano y la remolacha, pueden regenerarse por ambos métodos (Hansen and Wright, 1999). La resistencia a kanamicina es el marcador de selección mas frecuentemente utilizado para la selección de plantas transformadas. El conocimiento de la sensibilidad de una especie particular a este antibiótico, es el elemento clave en el desarrollo de un sistema de transformación donde se integre el gen *nptII* de resistencia a kanamicina.

En este sentido, la kanamicina ya ha sido utilizado para la selección de tejidos transformados de *Musa* "Enano Gigante" AAA. May *et al.* (1995) reporto el empleo de 100 mg L⁻¹ de sulfato de kanamicina como agente de selección. Aunque aproximadamente el 50 % de los meristemos apicales y el 40 % de las rebanadas de bulbo formaron brotes sobre medio de micropropagación selectivo, solo un 40 % de los tejidos que formaron brotes demostró un crecimiento de raíces vigoroso al transferirse a medio de enraizamiento con kanamicina. Este resultado implica que aproximadamente el 60% de los brotes pudieron ser quiméricos o no contenían tejidos meristemáticos transformados que dieran lugar a raíces resistentes a kanamicina.

Becker *et al.* (1999), seleccionó células embriogénicas bombardeadas de *Musa* "Enano Gigante" en medio conteniendo 100 mg L⁻¹ de kanamicina. Subsecuentemente la kanamicina se omitió del medio de germinación para embriones, pero se reintrodujo en la etapa de enraizamiento donde los embriones germinados formaron raíces. En el trabajo de May *et al.* (1995), es posible que el nivel de kanamicina no fuera lo suficientemente elevado para ser utilizado como agente de selección, mientras que en el trabajo de Becker *et al.* (2000), el uso del mismo nivel de kanamicina, pero con un protocolo diferente, permitió la selección de células transformadas individuales.

Adicionalmente, se ha reportado un efecto estimulante de la kanamicina en cultivos *in vitro* de varias especies (Costa *et al.*, 2000) así como fitotoxicidad en callos no diferenciados y en la organogénesis y regeneración de brotes (Tang *et al.*, 2000). Tanto la kanamicina como la estreptomomicina favorecen la diferenciación de brotes de secciones de hojas de tabaco y la kanamicina también estimula la producción de brotes de callos de zanahoria (Holford and Newbury, 1992).

Teniendo en cuenta los trabajos anteriores, la finalidad de este trabajo fue evaluar el efecto de la kanamicina en el crecimiento y organogénesis de tejidos de banano con la finalidad de determinar la concentración óptima a usarse como agente de selección en el desarrollo de un sistema de transformación para banano, *Musa acuminata* cv "Enano Gigante".

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Tejidos altamente meristemáticos de banano *Musa acuminata* cv "Enano Gigante", código INIBAP: 1256, derivados de meristemos de brotes crecidos *in vitro* y

denominados "scalps", se obtuvieron del laboratorio de mejoramiento de cultivos tropicales de la Universidad Católica de Leuven, Bélgica.

Cultivo de tejidos

Los Scalps se mantuvieron sobre medio semisólido consistente de medio completo Murashige y Skoog (Murashige and Skoog, 1962), 3% de sacarosa, 100 μM de bencilaminopurina (BAP), 1 μM de ácido indolacético (IAA) y 0.2% de gel rite. El pH se ajustó a 5.7 antes de esterilizar en autoclave. Antes de su uso, los cultivos de scalps se mantuvieron a 15°C, con fotoperiodo de 12 hs de luz blanca (luz fluorescente blanca Phillips) con la finalidad de minimizar los ciclos de subcultivo. Para su proliferación, los scalps se incubaron a 26°C con fotoperiodo de 16 hs de luz blanca y subcultivados cada 15 días. Para la preparación del medio de selección, la kanamicina se disolvió en agua, se esterilizó por filtración con un filtro Millipore de 0.22 μm y se adicionó al medio de multiplicación MS previamente esterilizado en autoclave y enfriado a 50°C. El medio con antibiótico se vertió a frascos Gerber. El volumen de medio por frasco Gerber fue de 20 ml.

Método experimental

Se evaluaron los siguientes niveles de kanamicina: 0, 75, 150, 300 y 600 mg L⁻¹. El tamaño de la muestra fue de cuatro por caja petri con cuatro repeticiones para cada tratamiento. Las muestras se incubaron a 25 °C con fotoperiodo de 16 h. de luz blanca y subcultivados cada 15 días, registrándose el peso fresco y el desarrollo morfológico. La información del peso fresco se transformó a crecimiento relativo (CR) usando la siguiente fórmula CR: $\text{Ps}-\text{Pi}/\text{Pi}$, donde Ps es el peso de la muestra registrada a cada subcultivo y Pi es el peso inicial del tejido.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los crecimientos relativos promedio (CR) de las muestras cultivadas con diferentes niveles de kanamicina y de tejidos control (sin kanamicina) por 60 días se muestra en la figura 2.1. Al día 30 del inicio del experimento se observaron grandes diferencias en el incremento en el peso de los tejidos. El control mostró un CR cercano a 20, mientras que los diferentes tratamientos aplicados (75, 150, 300 y 600 mg L⁻¹ kan.), mostraron valores de CR fluctuando entre 20 y el 50 % del valor del control. Al día 45, el efecto inhibitorio de la kanamicina era claramente visible en el crecimiento del tejido; el control registró un CR de 75 con relación a su peso inicial, mientras que los tratamientos con 75 y 600 mg L⁻¹ de kanamicina tuvieron un CR de 19 y 5.5 respectivamente. El tratamiento a 75 mg L⁻¹ de kanamicina fue el menos inhibitorio del crecimiento, mientras no hubo diferencia entre tratamientos en el rango de 75 a 600 mg L⁻¹ de kanamicina.

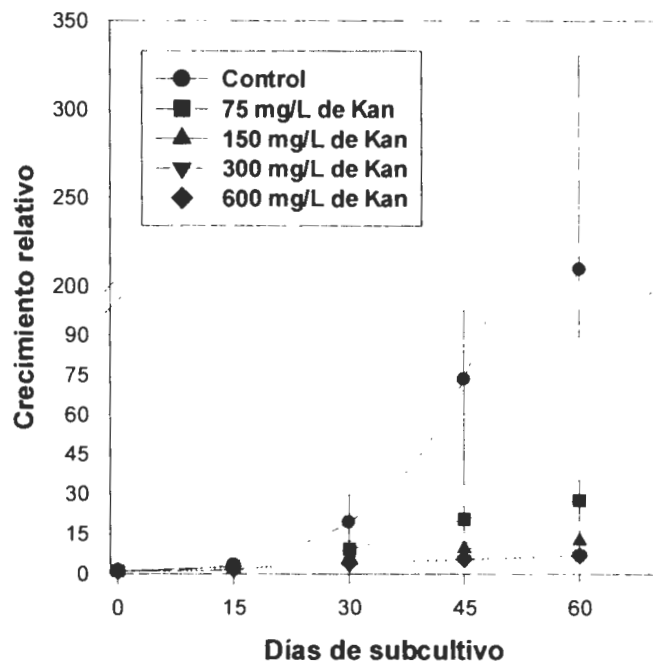


Figura 2.1. Evaluación del efecto de la kanamicina en el crecimiento relativo de tejidos meristemáticos de *Musa* cv "Enano Gigante" sometidos a los tratamientos: 0, 75, 150, 300, y 600 mg L⁻¹ de kanamicina.

Al día 60, se registro un CR superior a 200 para el control, mientras que para los tratamientos con kanamicina, los crecimientos relativos incrementaron de 1 a 7 veces el peso inicial. Las diferencias entre tratamientos con 75 mg L⁻¹ de kanamicina y los niveles de kanamicina de este nivel se mantuvo. Para los últimos subcultivos, a los días 75 y 90, el control tuvo un CR arriba de 400 y 800 respectivamente, mientras que en presencia de kanamicina los tejidos tuvieron un CR de 30 como valor máximo. No obstante, solo una ligera necrosis se observó en los muestras (información no mostrada), pero en presencia de 600 mg L⁻¹ de kanamicina se observó necrosis parcial.

De estos resultados se concluye que este tipo de tejidos meristemáticos de banano tienen una resistencia natural elevada a la kanamicina como se ha reportado anteriormente para otras monocotiledóneas. Por ejemplo, se requieren concentraciones de kanamicina por arriba de 500 mg L⁻¹ para inhibir el crecimiento de callos de arroz (Colby and Meredith, 1990) y se requieren mas de 800 mg L⁻¹ para inhibir el crecimiento de varios cultivos celulares de *Gramineae* en la oscuridad (Hauptmann *et al.* 1988). Además, en cultivos de tejidos de manzana, una dosis

elevada de kanamicina se asocia con amarillamiento o blanqueo de tejidos (Norelli and Aldwinckle, 1993). Esta respuesta posiblemente esta relacionada al modo de acción de la kanamicina. Este antibiótico actúa en los plástidos inhibiendo el inicio de la traducción durante la unión a la subunidad ribosomal 30S (Kapaun and Cheng, 1999). Esto puede explicar porque los tejidos, carentes de plástidos funcionales como resultado de cultivarse heterotroficamente, son resistentes a altas concentraciones de kanamicina.

Con respecto a la morfología; después de la tercera semana empezaron a diferenciarse los brotes del tejido control; estos empezaron a quedar verdes en aproximadamente la quinta semana cuando la diferenciación de los primordio fue evidente (figura 2.2A). Sin embargo, con los tejidos cultivados en presencia de kanamicina, el desarrollo de los brotes se retrazo notablemente (figura 2.2 B). Aunque algunos primordios foliares se desarrollaron en presencia de kanamicina, finalmente se pusieron negros y necróticos (Información no mostrada). Esto puede atribuirse al efecto necrótico de la kanamicina sobre el proceso de traducción de los plástidos (Kapaun and Cheng, 1999).

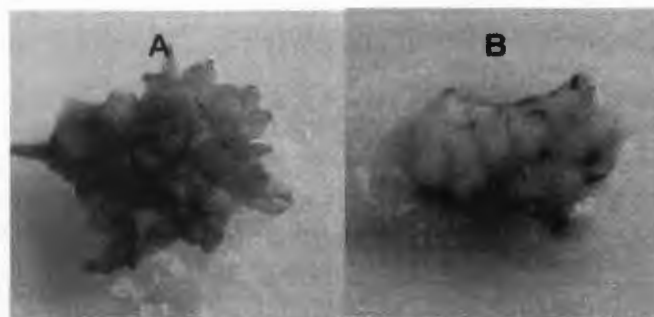


Figura 2. 2. Efecto de la kanamicina en el desarrollo de tejidos meristemáticos de Musa cv "Enano Gigante". (A) muestra control, (B) muestra con 300 mg L⁻¹ de kanamicina.

Con relación al efecto observado de la kanamicina como inductor de negrosis en tejidos de banano, cabe mencionar que se han reportado efectos similares en la organogénesis de otras especies. Por ejemplo, en el caso de tejidos de manzana, se ha observado la inhibición total en la regeneración de brotes tejidos foliares, los tejidos se volvieron cloróticos y eventualmente necróticos a 5 mg L⁻¹ de kanamicina (Yepes and Aldwinckle, 1994). En *Vitis vinifera*, concentraciones de al menos 4 mg L⁻¹ de kanamicina inhibieron la formación de raíces en brotes obtenidos de microcortes (Perós *et al.*, 1998). El efecto inhibitorio de la kanamicina se demostró en la embriogénesis somática por Tang *et al.*, (2000), quien reportó la inhibición de la formación de embriones secundarios cultivados en presencia de 100 mg L⁻¹ de kanamicina.

El análisis de varianza (ANOVA) aplicado a los resultados obtenidos en el presente trabajo (Tabla 2.1), indicó que al día 15 hubo diferencia estadística significativa entre las medias del crecimiento relativo entre tratamientos a un nivel de confianza del 95 %.

Tabla 2.1. Análisis de varianza de una vía (ANOVA) para el crecimiento relativo obtenidos por tratamiento

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón F
Entre grupos	10.2079	4	2.55197	7.18
Dentro de grupos	5.32879	15	0.355253	
Total	15.5367	19		

La prueba de rango múltiple indicó que hubieron diferencias estadísticas significativas entre el control y los tratamientos de kanamicina de 150, 300 y 600 mg L⁻¹ así como entre el tratamiento de 75 y los de 150, 300 y 600 mg L⁻¹ (información no mostrada). Después del día 30 hubo una diferencia estadística significativa entre el control y todos los niveles ensayados aunque no hubo una diferencia estadística significativa entre ellos (tabla 2.1).

Tabla 2.2. Prueba de rango Múltiple para el crecimiento relativo al día 30. El signo * denota una diferencia estadística significativa.

Comparación de tratamiento	Diferencias	+ / - Límites.
0 – 75	*10.1684	7.12951
0 – 150	*13.2866	7.12951
0 – 300	*16.03	7.12951
0 – 600	*15.4375	7.12951
75 – 150	3.11826	7.12951
75 – 300	5.86161	7.12951
75 – 600	5.26912	7.12951
150 – 300	2.74335	7.12951
150 – 600	2.15078	7.12951
300 – 600	-0.592484	7.12951

A pesar de no haber diferencia estadística significativa entre los tratamientos después del día 30, se pudo determinar que 150 mg / L⁻¹ de kanamicina es la concentración óptima para la selección de las células transformadas de banano puesto que esta es la concentración mínima donde se observa la inhibición del crecimiento y organogénesis. En contraste, aunque el tratamiento con 75 mg / L⁻¹ de kanamicina permitió inhibir la morfogénesis, el crecimiento relativo fue de 60 al 79 % mayor que para los otros tratamientos lo cual podría permitir algunos escapes.

La concentración de 150 mg L⁻¹ reportada en este trabajo es mayor que la reportada (100 mg L⁻¹) por May *et al.* (1995) para la regeneración de tejidos por

organogénesis. En aquel trabajo la concentración de kanamicina no permitió una buena selección de los tejidos transformados. Becker *et al.* (2000) reportó 100 mg L⁻¹ de kanamicina para la selección y regeneración de células embriogénicas bombardeadas. Esta concentración permitió la selección de células individuales transformadas.

La inhibición en presencia de kanamicina, de la formación de yemas en tejidos de banano o su crecimiento retrasado con relación al control indica que este antibiótico es un buen agente de selección para el desarrollo de protocolos de transformación para tejidos meristemáticos de banano. Es probable que las células transformadas sean capaces de metabolizar la kanamicina y formar brotes nuevos incluso a concentraciones elevadas de kanamicina y de esta forma generar plantas transformadas.

REFERENCIAS

- Becker D.K., Dugdale B., Smith M.K. Hardin R.M. and Dale J.L.** (2000). Genetic transformation of Cavendish Banana (*Musa* ssp. AAA group) cv "Grand Naine" via microprojectile bombardment. *Plant Cell Reports*, 19, 229-234.
- Colby S.M. and Meredith C.P.** (1990). Kanamycin sensitivity of cultured tissues of *Vitis*. *Plant Cell Reports*, 9, 237-240.
- Costa M.G.C., Nogueira F.T.S., Figueira M.L., Otoni W.C., Brommonschenkel S.H. and Cecon P.R.** (2000). Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars. *Plant Cell Reports*, 19, 327-332.
- Crouch J., Vuylsteke D. and Ortiz Z.R.** (1985). Perspectives on the application of biotechnology to assist the genetic enhancement of plantain and banana (*Musa* spp.). *Electronic Journal of Biotechnology*, 1, 1-12.
- Hansen G. and Wright M.S.** (1999). Recent Advances in the transformation of plants. *Trends in Plant Science*, 4, 226-231.
- Hauptmann R.M., Vasil V., Ozias-Akins P., Tabaeizadeh Z., Rogers S.G., Fraley R.T., Horsch R.B. and Vasil I.V.** (1988). Evaluation of selectable markers for obtaining stable transformants in the Gramineae. *Plant Physiology*, 86, 602-606.
- Holford P. and Newbury H.J.** (1992). The effects of antibiotics and their breakdown products on the *in vitro* growth of *Antirrhinum majus*. *Plant Cell Reports*, 11, 93-96.
- Kapaun J.A. and Cheng Z.M.** (1999). Aminoglycoside antibiotics inhibit shoot regeneration from Siberian Elm leaf explants. *HortScience*, 34, 727-729.

- May G.D., Afza R., Mason H.S., Wiecko A., Novak F.J. and Arntzen C.J.** (1995). Generation of Transgenic Banana (*Musa acuminata*) Plants via *Agrobacterium*- mediated transformation. *Biotechnology*, 13, 486-492.
- Murashige T. and Skoog F.** (1962). A revised medium for rapid growth and Bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- Norelli J.L. and Aldwinckle H.S.** (1993). The role of aminoglycoside antibiotics in the regeneration and selection of neomycin phosphotransferase-transgenic apple tissue. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 118, 311-316.
- Perós J.P., Torregrosa L. and Berger G.** (1998). Variability among *Vitis vinifera* cultivars in micropropagation, organogenesis and antibiotic sensitivity. *Journal of Experimental Botany*, 49, 171-179.
- Tang H., Ren Z. and Krczal G.** (2000). An evaluation of antibiotics for the elimination Of *Agrobacterium tumefaciens* from walnut somatic embryos and for the effects on the proliferation of somatic embryos and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Reports*, 19 , 881-887.
- Yepes L.M. and Aldwinckle H.S.** (1994). Factors that affect leaf regeneration Efficiency in apple, and effect of antibiotics in morphogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 37, 257-269.

CAPÍTULO III

Establecimiento de un protocolo de transformación mediado por *A. tumefaciens* para *M. acuminata* var. "Enano Gigante" por infiltración al vacío

Para la implantación del protocolo de transformación de *Musa acuminata* var. "Enano Gigante" mediado por *A. tumefaciens* por infiltración al vacío, se evaluó la respuesta de tejidos meristemáticos de banano a diferentes concentraciones del antibiótico kanamicina para determinar la concentración a utilizar como agente de selección del tejido vegetal transformado y en forma simultánea, verificar la capacidad de regeneración de los tejidos a plántulas. Se transformó la cepa EHA105 de *A. tumefaciens* con los vectores a) pCambia 2301, el vector pCambia 2301 y el plásmido auxiliar pCH32 y c) el vector BIBAC2 el cual portaba un inserto de ADN genómico de 50 kb de la variedad de banano Calcuta IV. Se determinaron los parámetros de transformación por infiltración al vacío en tejidos meristemáticos de banano y se efectuaron ensayos de transformación por lotes. Se estableció el protocolo de eliminación o control de *A. tumefaciens* de tejidos infiltrados. Se efectuó la evaluación de la transformación de los tejidos infiltrados mediante pruebas histoquímicas, actividad de β -glucuronidasa (GUS) y análisis por PCR.

MATERIALES

Material vegetal

Se utilizaron tejidos meristemáticos de banano *M. acuminata* cv "Enano Gigante" derivados de brote crecidos *in vitro*, denominados "*scalps*". Los tejidos fueron obtenidos del laboratorio de mejoramiento de cultivos tropicales de la Universidad Católica de Leuven, Bélgica.

E. coli* y *A. tumefaciens

La mayoría de los experimentos que utilizan *A. tumefaciens* como medio para la introducción de genes en células de las plantas, utilizan un vector binario pequeño el cual se propaga y mantiene en *E. coli*. antes de ser transferido a *Agrobacterium* vía conjugación o por transferencia directa del DNA (conjugación bacterial o técnicas de congelamiento descongelamiento). En este trabajo se emplearon la cepa de *E. Coli* DH10B y la cepa de *A. tumefaciens* EHA105 (Rimfampicina como agente para selección bacterial).

Vectores

Vector binario pCambia 2301. Este vector posee capacidad para replicarse en una amplia gama de hospederos. Su permanencia en *A. tumefaciens* es muy estable en ausencia de agente de selección bacterial kanamicina. Dentro del T-DNA, adyacente al borde izquierdo, se localiza la secuencia del gen *npII* que codifica la

Se ha de mostrado que la eficiencia de transformación se mejora al incrementar la transcripción y traducción de los genes *VirG* y *VirE* (Hamilton *et al.*, 1996). El gen *VirG* es el activador transcripcional de los genes de virulencia de *A. tumefaciens*, por lo cual favorece la activación de los genes de virulencia que se encuentran involucrados en la transferencia del T-DNA. Las proteínas *VirE2*, de unión al DNA de cadena simple, tienen como función cubrir y proteger al T-DNA de endonucleasas, manteniendo su integridad durante el proceso de transferencia.

Vector binario BIBAC2. El plásmido binario BIBAC2 posee como características: la región GUS-NPTII que codifica al péptido bifuncional β -glucuronidasa y neomicina fosfotransferasa II respectivamente. La β -glucuronidasa actúa como una proteína reportera, permitiendo la identificación de células transformadas, ver 3.2.5 prueba histoquímica de GUS, mientras que la neomicina fosfotransferasa II permiten la selección de células transformadas. La secuencia del gen *hptII* que codifica para higromicina fosfotransferasa, se localiza adyacente al borde derecho y puede utilizarse como marcador de selección adicional en plantas. El único sitio de clonación múltiple, permite la introducción de cualquier otro fragmento de DNA incluyendo otro marcador de selección (Figura 3.3). Esta región, localizada adyacente al borde izquierdo, permite identificar transformantes que probablemente reciben todo el DNA de transferencia.

El gen *sacB*, se inactiva cuando un fragmento de ADN se inserta en el sitio *Bam*HI. Esto último permite seleccionar cepas y células transformadas cuando crecen en un medio que contiene sucrosa al 5 %.

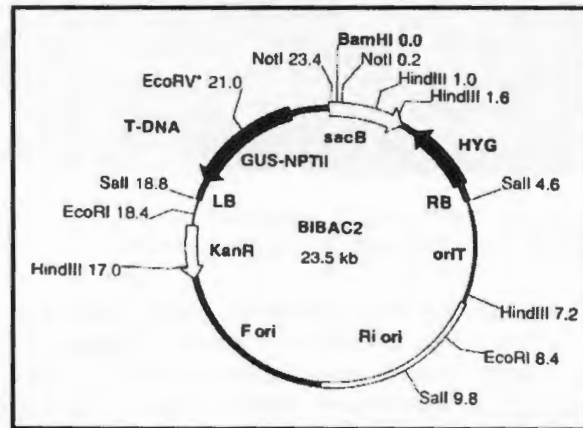


Figura 3.3. Vector binario BIBAC2

Para evitar redundancias de secuencias que reduzcan la estabilidad del vector, los marcadores de selección poseen diferentes promotores y secuencias de terminación de la transcripción, así como una orientación que no permiten una transcripción convergente, que pueda dañar la expresión transgénica de fragmentos

pequeños de DNA (Hamilton, 1997.). El plásmido BIBAC2 es capaz de transferir fragmentos de DNA foráneo de 50 a 400 kb al genoma nuclear de las plantas (Hamilton, 1996.).

MÉTODOS

En esta sección se desarrollan los métodos considerados más importantes para la realización de este trabajo. Las técnicas complementarias se presentan en el apéndice de este documento.

Cultivo de tejidos

El manejo de los tejidos meristemáticos de banano implicó: mantenimiento, propagación y regeneración. En todos los casos, se utilizó medio semisólido (Murashige and Skoog, 1962) completo ajustado a pH 5.7 antes de esterilizar en autoclave. El medio contenía: sacarosa al 3% (p/v), ácido nicotínico 4.06^{-03} mM, piridoxina 2.43^{-03} mM, glicina al 0.026 mM, ácido ascórbico 5.57^{-03} mM y gelrite 0.2%. La concentración de fitorreguladores se modificó para mantener o regenerar los tejidos. Los tejidos se cambiaron de medio cada 15 días. Los tejidos se subcultivaron o multiplicaron al alcanzar la madurez o estadio de "Scalps" (ver figura 3.4).



Figura 3.4. Propagación de tejidos meristemáticos de banano "Enano Gigante". A) Cortes meristemáticos o scalps. B) Frascos con tejidos de cortes meristemáticos en el cuarto de cultivo.

El ciclo de propagación se inició al transferir puntas de brotes no diferenciados o yemas seccionados de los scalps a medio MS fresco. El tiempo de desarrollo de los cortes meristemáticos a *scalps* fluctuó entre 3 a 4 semanas, a 26°C y con fotoperíodo de 12 horas de luz blanca (luz fluorescente blanca Phillips), dependiendo del tamaño de inicio del meristemo.

Para fines de mantenimiento o propagación se utilizó bencilaminopurina (BAP) 100 μ M y ácido indolacético (AIA) 1 μ M; los *scalps* se incubaron a 26°C bajo fotoperíodo de 16 horas de luz blanca con subcultivos cada 15 días. Con la finalidad de reducir la velocidad de crecimiento y minimizar los ciclos de subcultivo, los cultivos de *scalps* se mantuvieron a 15°C, con fotoperíodo de 12 horas de luz blanca (luz fluorescente blanca Phillips).

La regeneración se llevó a cabo en dos etapas. En la primera etapa se fomentó la inducción de brotes foliares al reducir la concentración de BAP a 8.8 μM . Una vez desarrollados los brotes foliares, se indujo la formación de raíces eliminando el empleo de BAP y AIA.

Transformación de *A. tumefaciens*, *E. Coli* y *N. tabacum*

Las células competentes de *A. tumefaciens* cepa EHA105 y de *E. Coli* DH10B se transformaron mediante choque térmico o electroporación (Ver apéndices III y V). Las células de *A. tumefaciens* y de *E. Coli* transformadas se seleccionaron en medios YEP y LB, respectivamente, conteniendo los agentes selectivos adecuados. Las células de *A. tumefaciens* y de *E. Coli* transformadas se prepararon para su conservación a -80°C a largo plazo, mezclándose con glicerol a una concentración final del 15 y del 10% respectivamente. La cepa de *A. tumefaciens* EHA105, se transformó con los vectores: a) pCambia 2301, b) el vector pC2301 y el plásmido auxiliar pCH32 y c) el vector BIBAC2 en el cual se halla clonado un inserto de 50 kb. La transformación de la cepa de *A. tumefaciens* se verificó por crecimiento en presencia de antibióticos, así como por ensayos de transformación (ver figura 3.4), usando como sistema modelo, discos foliares de tabaco. Los principales métodos moleculares aplicados se reportan en la sección de apéndices.

Transformación de meristemos de banano por infiltración al vacío

Se cortaron tejidos meristemáticos con un tamaño promedio de 2 a 3 mm y se dejaron recuperar a 27°C en oscuridad por 5 días. Posteriormente se incubaron en foto-periodo de 16 horas de luz fluorescente blanca Phillips y 8 horas de oscuridad por 3 días, antes de ser infiltrados. Paralelamente, una alícuota de *A. tumefaciens* fue inoculada en 5 ml de YEP conteniendo los antibióticos adecuados y se dejó crecer durante 2 días a 27°C y 110 rpm. El contenido del tubo fue inoculado en 100 ml de YEP. El cultivo se dejó crecer a 27°C en agitación a 110 rpm durante 24 horas. Posteriormente el cultivo se centrifugó a 4000 rpm durante 30 minutos. El precipitado bacteriano se resuspendió con 100 ml de YEP conteniendo glucosa 55 mM y se dejó crecer por 4 horas. El cultivo de *A. tumefaciens* se indujo con acetosiringona 100 mM. Los cultivos se dejaron a 27°C a 110 rpm por 4 horas. Esta bacteria se utilizó para los experimentos de infiltración al vacío de tejidos meristemáticos de banano. Los meristemos se incubaron en medio de inducción y se sometieron a vacío por 4 minutos a 400 mm de mercurio.

Eliminación de *A. tumefaciens* de tejidos infectados

Las muestras de tejidos fueron enjuagadas con agua estéril para eliminar el exceso del cultivo bacteriano adherido; posteriormente, estos se trataron con una solución de timentina 200 $\mu\text{g/ml}$ por 10 minutos; finalmente, los tejidos se sumergieron en una solución de timentina y claforan a 200 $\mu\text{g/ml}$ de cada uno por 10 minutos. Después de los lavados con antibióticos, los tejidos se transfirieron a medio MS líquido conteniendo timentina (200 $\mu\text{g/ml}$) y kanamicina (150 mg L^{-1}) como agente de

selección del tejido vegetal transformado. Este tratamiento se realizó de nuevo a las 48 y 98 horas. Después del tratamiento en medio líquido, los tejidos fueron transferidos a medio sólido conteniendo timentina (200 µg/ml) y kanamicina (150 µg/ml) por un periodo de un mes. El cambio de medio MS semisólido con antibióticos de realizó cada 15 días. Finalmente, los tejidos se pasaron a medio MS sólido sin antibióticos.

Prueba histoquímica de GUS

La detección del gen *uidA* se basó en la actividad que presenta la glucuconidasa para catalizar la hidrólisis de X-gluc (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil β-D-glucuronido), (ver figura 3.6).

Las muestras fueron sumergidas en un amortiguador de fosfatos con un pH 8, y sometidas a vacío de 10 a 15 minutos. Posteriormente, las muestras se dejaron reposar en el amortiguador de fosfatos por 45 minutos antes de transferirse a la mezcla de reacción de X-gluc (0.005 g de X-gluc en 100 µl de NN-dimetilformamida, adición 25 µl de tritón 100X, 50 µl de ferrocianuro de K 50 mM, 50 µl de ferricianuro de potasio 50 mM, 500 µl de metanol y 500 µl de fosfato diácido de sodio 1000 mM en 5 ml de agua destilada). Las muestras se incubaron a 37°C de 12 a 24 horas. Los pigmentos se eliminaron con lavados con alcohol etílico al 70%. Finalmente las muestras se observaron al estereoscopio o en forma directa según la extensión de la expresión y se fotografiaron.

Actividad específica de β-glucuronidasa

La actividad específica de la β-glucuronidasa se determinó por fluorometría utilizando el sustrato 4-MUG (4-metilumbeliferil β-D-glucuronido). La velocidad de formación del producto 4-MU (4-metilumbeliferona) indico la actividad enzimática de GUS (Edwin., 1995). La concentración de proteína total se evaluó por el método Bradford (ver apéndices VIII y IX).

Para la determinación de la actividad específica, se adicionó 20 µl del extracto proteico, 20 µl de amortiguador de ensayo (0.002 g de MUG aforado a 5 ml con amortiguador para extracción de proteína) y 60 µl de amortiguador de extracción en un tubo Eppendorf. Las muestras se incubaron a 37°C por 120 minutos. La reacción se detuvo por adición de 900 µl de carbonato de sodio al 2%. Las fluorescencias se leyeron utilizando el filtro de excitación de 360/40 y el filtro de emisión de 460 /10 nm. El equipo se calibró a cero utilizando el blanco (20 µl del amortiguador de ensayo y 80 µl del amortiguador de extracción). La ganancia del equipo se ajustó a 2000 cuentas por fluorescencia utilizando una de las muestras.

Aislamiento y limpieza de DNA genómico

Las muestras se maceraron con 200 μ l de buffer de extracción EDM (Tris-HCl 200 mM pH 7.5, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM y SDS 0.5%), se agitaron con un vortex por 2 minutos y se centrifugaron a 13000 rpm x 3 minutos. Los sobrenadantes se transfirieron a tubos Eppendorf nuevos. Se adicionó al sobrenadante 100 μ l de la mezcla fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó por 10 segundos, se dejó reposar en hielo por 2 minutos y se centrifugo a 13,000 rpm por 5 minutos. La fase superior se transfirió a un vial nuevo y se adicionó a este 900 μ l de alcohol absoluto grado biología molecular. Las dos fases se mezclaron con suavidad y se centrifugaron a 13,000 rpm x 5 minutos. El sobrenadante resultante se descarto y a la pastilla se le adicionó 500 μ l de alcohol etílico al 70% enfriado en hielo. Sin agitar se centrifugo a 13,000 rpm x 5 minutos. Después de descartar el alcohol etílico, la pastilla se dejó secar al aire por 10 minutos antes de redisolverse en 20 μ l agua y almacenarse a -20°C .

Amplificación por PCR de fragmentos de los genes NPTII y GUS

Para la amplificación de los fragmentos deseados, el DNA extraído de las muestras (ver inciso 3.2.7), se sometió en un termociclador a condiciones de temperatura específicas. Para la amplificación del fragmento del gen *nptII* se utilizaron los siguientes cebadores: sentido (5'ATG ATT GAA CAA GAT GGA TTG C3') antisentido (5'TCA GAA GAA CTC GTC AAG AAG G3'). Para la amplificación del fragmento del en *uidA* (GUS) se utilizaron los cebadores: sentido (5'CGT CCT GTA GAA ACC CCA ACC 3') antisentido (5'GCC TCC CTG CTG CGG TTT TTC3'). Se utilizó un volumen de reacción de 25 μ l, a una concentración final 1X de buffer, 0.2 mM de dNTPs, 0.02 mM de MgCl_2 , 0.5 μ M de secuencias iniciadoras sentido y antisentido, 200 ng de DNA de la muestra y 0.04 U/ μ l de Tag polimerasa. Para la determinación de fragmento de NPTII, las muestras se corrieron con las siguientes condiciones de reacción: Desnaturalización inicial 96°C por 5 minutos; 30 ciclos a las siguientes condiciones: Temperatura de desnaturalización 94°C por 1 minuto, temperatura de hibridación de los cebadores 57°C por 1 minuto, temperatura de elongación de las cadenas 72°C por 1 minuto. El equipo se llevó a 72°C por 10 minutos antes de bajar a temperatura a 4°C . Para la determinación del fragmento del gen GUS, la temperatura de hibridación se modifico a 60°C .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Transformación de *N. tabacum*

Los ensayos de transformación de la cepa EHA105 de *A. tumefaciens* se verificaron por crecimiento de las bacterias en presencia de los antibióticos correspondientes (datos no mostrados). La capacidad de infección y transformación de las cepas, se verificó por ensayos de transformación de discos foliares de tabaco. En la figura 3.5 se muestran los resultados del ensayo realizado. En dicha figura se observan secciones de hojas u hojas completas de tabaco positivas a la prueba histoquímica de GUS obtenida de regenerantes. Se obtuvieron resultados positivos para los regenerantes cocultivados con *A. tumefaciens* EHA105 portando los plásmidos los tres sistemas de vectores ensayados, (figuras 3.5 A, B, C y D).

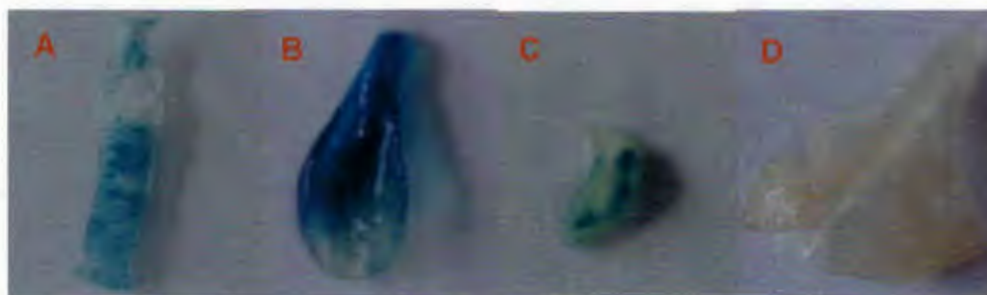


Figura. 3.5. Muestras de tejidos foliares de tabaco GUS positivas transformados con: A) pCambia 2301, B) pCambia 2301 y pCH32, C) BIBAC2 y D) Testigo.

El enfoque de utilizar al tabaco, como modelo para establecer y corroborar resultados de ensayos de transformación ya ha sido aplicado anteriormente. Así, Ghosh *et al.*, (2001) reportan la expresión en tabaco de la región carbono terminal de la proteína de superficie merozoita de *Plasmodium falciparum*, como un primer paso hacia el desarrollo de una vacuna comestible de bajo costo.

Las plántulas de tabaco positivas a la prueba histoquímica de GUS, permitieron contar con controles positivos de los sistemas ensayados para las pruebas histoquímica de GUS, actividad fluorométrica de GUS, extracción y verificación de la integridad de DNA genómico y análisis por PCR de transformantes de banano.

Transformación de tejidos meristemáticos de banano por infiltración al vacío

Para el establecimiento de los parámetros de infiltración al vacío, se evaluó como variable dependiente la respuesta de los tejidos en término del necrosamiento que presentaron al ser sometidos al proceso de transformación por infiltración en presencia de *A. tumefaciens*.

En la tabla 3.1 se muestran resultados de ensayos preliminares de transformación por infiltración al vacío. Los resultados permitieron establecer las condiciones experimentales de presión (en mm de mercurio) y tiempo (en minutos) a emplearse para los ensayos posteriores en lotes de 80 a 100 tejidos meristemáticos. Basándose en el área necrosada y a la respuesta de recuperación presentada por los tejidos infiltrados, se seleccionó la respuesta "necrosamiento moderado", como adecuada para permitir la transformación de los tejidos así como su posterior recuperación.

Tabla 3.1. Efecto del tiempo y presión de infiltración en meristemos de banano. Se utilizaron 16 tejidos para cada ensayo. El tiempo de infiltración se evaluó a una presión constante de 400 mm de Hg y la presión de infiltración se evaluó a un tiempo constante de 4 minutos.

Tiempo de infiltración (minutos)	Necrosis
1	Leve
2	Leve
4	Moderada
8	Intensa
Presión de infiltración (mm de mercurio)	Necrosis
200	Leve
400	Moderada
600	Intensa

Las condiciones experimentales seleccionadas fueron: tejidos con un tiempo de subcultivo de siete días, cultivos de *A. tumefaciens* con 18 horas de inducción con acetosiringona 100 μM , 400 mm de mercurio de presión de infiltración, 4 minutos de tiempo de infiltración y 24 horas de tiempo de recuperación en medio MS.

Los ensayos de transformación por lote de tejidos meristemáticos de banano se efectuaron utilizando las tres combinaciones de bacteria vector indicadas anteriormente (ver inciso 3.3.1). Los resultados obtenidos de estos ensayos de presentan y se discuten a continuación.

Eliminación de *A. tumefaciens* de tejidos infectados

En esta fase se eliminó *A. tumefaciens* EHA105, portando cualquiera de los tres sistemas de vectores ensayados, en los tejidos meristemáticos de banano infiltrados al vacío. Para lo anterior se utilizó el protocolo descrito en el inciso 3.2.4

Aunque está reportado que es posible eliminar *A. tumefaciens* utilizando carbencilina o compuestos relacionados (Hamilton 1997), es este caso se decidió utilizar a la timentina (mezcla de ácido clavulónico y) a una concentración de 200 mg L^{-1} como antibiótico para eliminar *A. tumefaciens*. Lo anterior se debe a que Nauerby *et al* 1996 reportaron que la timentina no solo es efectiva para eliminar *A. tumefaciens*, sino que también presenta en tejidos de *Nicotina tabacum*, un efecto tóxico despreciable o inclusive positivo comparado al de cefotaxima o carbencilina. No

obstante, en el protocolo, para obtener un efecto sinérgico en la eliminación de la bacteria, se utilizó también cefotaxima ya que, Lin *et al.*, (1995), reportan que las células de *A. tumefaciens* fueron más sensibles a la cefotaxima que a la carbencilina. Por otra parte, el uso de la cefotaxima se limitó a un lavado inicial, ya que este antibiótico es uno de los que más interfiere en los procesos de regeneración. Específicamente, Tang *et al.*, (1990) reportaron que la cefotaxima reduce la producción de embriones somáticos de nogal. En este caso, la eliminación de *A. tumefaciens* se confirmó por ausencia de crecimiento bacterial en ausencia de antibióticos por tres meses en los tejidos infiltrados. Por otra parte, Tang *et al.*, (1999) reportan la eliminación de la cepa hipervirulenta de *A. tumefaciens* C58C1 de embriones somáticos de nogal, mediante tratamientos con timentina a concentraciones entre 500 y 1000 mg L⁻¹.

Prueba histoquímica y actividad de β -glucuronidasa

Los ensayos de transformación fueron evaluados mediante las pruebas de tinción histoquímica y actividad de β -glucuronidasa (GUS). La figura 3.6 muestra los resultados obtenidos con las pruebas de tinción histoquímica de GUS de tejidos meristemáticos de banano infiltrados al vacío con la cepa EHA105. En dicha figura se observa que para todos los sistemas de transformación ensayados se obtuvieron resultados positivos a la prueba histoquímica de GUS. En el panel A, se muestra la ausencia de expresión de GUS en la muestra testigo. En el panel B y C se muestra la respuesta que presentaron los tejidos meristemáticos de banano, transformados con el vector pCambia 2301 y BIBAC2. En estas figuras se observa, que la expresión de GUS se manifestó en grupos de células completas. Se determinó que las regiones de respuesta positiva se localizaron en las regiones de corte y cicatrización que se obtuvieron al subcultivar los tejidos y posteriormente infiltrarlos al vacío. Así mismo, en el panel D, se aprecian cortes de tejidos correspondientes a regenerantes transformados con *A. tumefaciens* EHA105 portando el vector binario pCambia 2301 y el plásmido auxiliar pCH32; en este caso, se detectó la expresión del gen GUS en regiones vastas de los tejidos. Esto último, eliminó la necesidad de visualizar los resultados mediante estudios por corte histológicos, pues la extensión de la expresión de GUS fue visible a simple vista (ver figura 3.6 panel D).

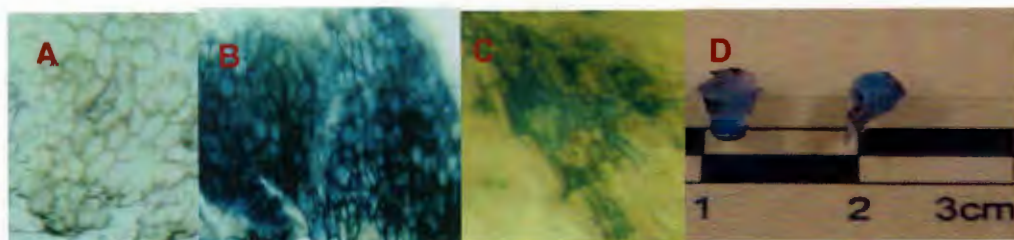


Figura 3.6. Prueba Histoquímica de GUS de tejidos de banano Enano Gigante infiltrados con EHA105 a 400 mm de Hg por 4 minutos. A) Tejido meristemático testigo, B) Tejido meristemático infiltrados con pCambia 2301, C) Tejido meristemático infiltrados con el vector BIBAC2 D) Cortes obtenidos de regenerantes transformados con pCambia 2301 y pCH32.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado en la literatura; Ganapathi *et al.* (2000), reportaron resultados negativos de muestras testigos sometidas a la prueba histoquímica de GUS para diferentes tejidos y estadios de desarrollo de tejidos de plátano Rhashtali; Pérez-Hernández, (1998), reportaron que aunque la unión de la bacteria a los tejidos de banano no requiere necesariamente de heridas, la migración bacteriana se incrementa hacia exudados de tejidos heridos, lo que hace que las regiones dañadas sean más susceptibles de ser transformadas. Por otra parte, Charity *et al.* 2001, reportaron que una alta expresión no se traduce necesariamente en una transformación estable.

Aunque la prueba histológica de GUS es un buen indicador de transformación, no es suficiente para asegurar dicho resultado por lo que la transformación se confirmó mediante la determinación de la actividad específica de GUS y posteriormente análisis por PCR.

En la figura 3.7, se muestran los resultados de la actividad específica de la β -glucuronidasa utilizando el sustrato 4-MUG, en tejidos infiltrados con *A. tumefaciens*. Los resultados mostrados corresponden a las fluorescencias netas de los tejidos. Se observó que la mayoría de los tejidos analizados sometidos a infiltración desarrollaron un incremento en la actividad específica superior en comparación a los resultados obtenidos en los tejidos de banano control (186.28 F /mg de P/min). Por otro lado, se observó que tejidos meristemáticos infiltrados con pCambia 2301 y pCH32 (923.44 F/mg de P/min), así como tejidos foliares obtenidos de regenerantes transformados con pCambia 2301 (803.46 F /mg de P/min) presentaron fluorescencias equiparables a los controles positivos de tabaco transformados con el vector pCambia 2301 (869.66 f /mg de P/min).

Así mismo, al analizar los resultados, se observaron diferencias entre las actividades específicas de diferentes tejidos transformados con el mismo vector, así como diferentes perfiles de actividades específicas de GUS entre los tejidos meristemáticos y los tejidos foliares obtenidos a partir de los primeros. Las diferencias observadas pudieron deberse a efectos posicionales de los genes introducidos dentro de los cromosomas nucleares y posiblemente al desarrollo de tejidos quiméricos del material vegetal utilizado para los ensayos (May *et al.*, 1995). May *et al.*, (1995), reportaron la actividad específica de GUS en extractos de tejidos de hojas de plantas individuales derivadas de tejidos meristemáticos de banana transformados con *A. tumefaciens*.

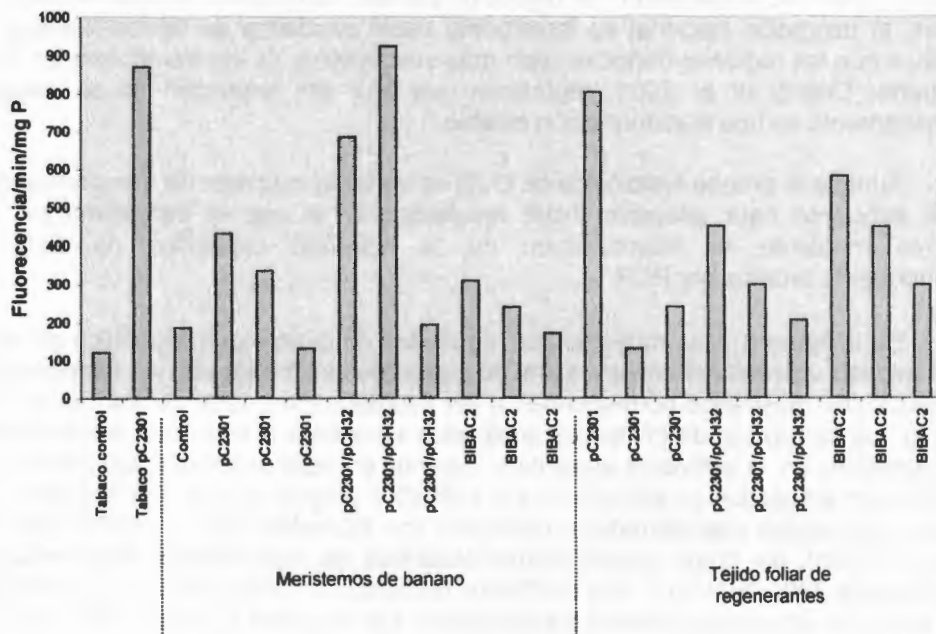


Figura 3.7. Actividad específica de GUS en tejidos tratados por infiltración al vacío. El experimento se realizó por triplicado. Error estándar para las muestras de banana fue de = 135.86

La actividad de GUS reportada por May *et al.*, (1995) para las muestras control fue en promedio de 36.1 pmoles de 4-MU /min/mg de proteína total y para muestras foliares de regenerantes obtuvo un valor promedio de 477 pmoles de 4-MU /min/mg de proteína total. Para fines de comparación, los datos anteriores puede expresarse como el cociente de la respuesta promedio de las muestras entre el valor promedio del control. El valor resultante, 13.21 es una medida del incremento en actividad de la β -glucuronidasa como resultado de la integración del gen GUS. En nuestro caso, se encontraron algunos valores equiparables, así se obtuvieron los valores 2.31, 4.95 y 1.65 en tejidos meristemáticos infiltrados con P cambia 2301 (actividad específica 431.17 F/mg de P /min), pCambia 2301 y pCH32 (actividad específica: 923.44 F/mg de P /min) y BIBAC2 (actividad específica: 309.0 F/mg de P /min) respectivamente. Estos valores fueron más bajos que los reportados por May *et al.* (1995). Lo anterior puede deberse a que la selección de las células transformadas se inició a un tiempo más corto. Por otra parte, en este trabajo, el vector pCambia 2301 porta un intrón de catalasa y la eliminación de la bacteria se comprobó por ausencia de su crecimiento por tres meses, por lo que el incremento en actividad determinada podría atribuirse a la transformación del tejido vegetal de banana.

Los resultados obtenidos de la prueba histoquímica y actividad de la β -glucuronidasa (GUS), sugiere que los tejidos analizados se encuentran transformados.

Aislamiento de DNA genómico

Se hizo necesario evaluar diferentes protocolos de extracción de DNA para evitar la degradación de éste y evitar la interferencia de compuestos fenólicos que se producen *de novo* al manipularse las muestras (Scarafoni y Duranti., 2001). En la figura 3.8 se presenta la separación electroforética de ácidos nucleicos en un gel de agarosa al 0.8%, de tejidos de banano empleados en experimentos de transformación y positivos a la prueba histoquímica de GUS. En la parte superior de la figura se observa, en todos los casos, la integridad del DNA de alto peso molecular. Por lo tanto, este método presenta como ventaja, la capacidad de aislar DNA y RNA. Para los ensayos de amplificación, el RNA se eliminó posteriormente por tratamientos con RNAasa.

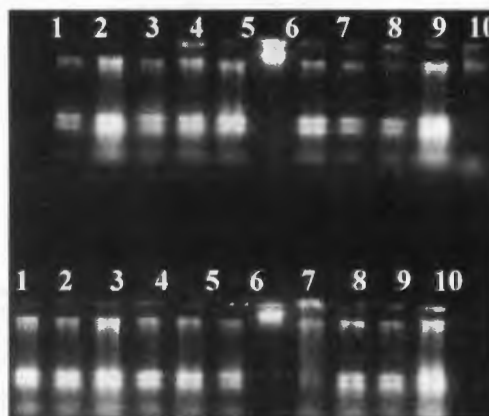


Figura 3.8. Verificación de la integridad del DNA genómico de regenerantes de banano Enano Gigante transformados con EHA105 portando el vector pCambia 2301 y pCH32. Carriles 7: DNA genómico de tabaco. Carriles superiores: muestras extraídas con buffer EDM. Carriles inferiores 1, 2, 3, 4, 5, 6, muestras extraídas una semana antes con buffer EDM; Carriles 8, 9, 10, y 11 muestras extraídas con buffer EDM con sarcosil al 2% y urea 5 M.

La electroforesis de los ácidos nucleicos obtenida cumplió con las características de limpieza e integridad reportadas por Scarafoni y Duranti., (2001), y por lo tanto, el DNA de alto peso molecular resultante, fue adecuado para llevar a cabo ensayos de digestión con enzimas de restricción, reacciones en cadena de la polimerasa (PCR), o análisis de Southern Blot (WoodHead *et al.*, 1998). Adicionalmente el método permite obtener RNA mensajero para realizar análisis de expresión génica en los transformantes detectados. En este caso, el aislamiento y purificación del RNA puede efectuarse ya sea por métodos cromatográficos de columna o por precipitación con sales de litio (López-Gómez y Gómez Lim., 1992).

Amplificación por PCR de fragmentos del gen NPTII y GUS

El desarrollo de la metodología para la amplificación por PCR de fragmentos de los genes NPTII y GUS a partir de DNA genómico extraído de tejidos GUS positivos, incluyó la verificación de amplificación de dichos genes a partir del vector pCambia 2301 con iniciadores definidos a partir de secuencias reportadas en banco de datos. Una vez diseñados los cebadores, se determinó que el tamaño de los fragmentos a amplificar fue de 675 pb para el gen NPTII y de 1805 pb para el gen GUS.



Figura 3.9. Amplificación de los genes GUS y NPTII. Carril 1: Marcador de peso molecular de 0.07 a 12.2 kbp. Carriles 2 y 3, amplificación de un fragmento de 1805 pb del gen GUS; carriles 4 y 5, amplificación de un fragmento de 675 pb del gen marcador NPTII.

La figura 3.9 ilustra los resultados obtenidos en un gel de agarosa al 0.8% en el cual se separaron los productos de la amplificación por PCR. En dicha figura se observa que los dos juegos de cebadores ensayados amplificaron exitosamente fragmentos de los tamaños esperados.

La figura 3.10 muestra los resultados obtenidos de ensayos de amplificación por PCR de un fragmento del gen NPTII para tejidos meristemáticos de banano. En esta figura se observa la amplificación positiva del gen NPTII para tejidos de banano transformados con el vector pCambia 2301 y el plásmido auxiliar pCH32. Este resultado corrobora el resultado obtenido mediante la prueba histoquímica y la determinación de la actividad de la β -glucuronidasa. La eficiencia de transformación determinada es equiparable a los resultados presentados por Ganapathi *et al.*, (2000), quienes reportan un registro de 16 PCR positivos de 16 muestras de regenerantes de banano Rasthali (AAB).



Figura 3.10. Amplificación positiva del gen NPTII por PCR en tejidos meristemáticos de banano. Carril 6: marcador de peso molecular de 0.07 a 12.2 kb, carril 13 control positivo (vector pCambia 2301). Los carriles del 1 al 5 y del 8 al 12 corresponden a tejidos meristemáticos de banano transformados con el vector pCambia2301 y el plásmido auxiliar pCH32.

Cabe recalcar, que los tejidos analizados por Ganapathi *et al.*, (2000) fueron seleccionados por haber sido los primeros brotes en producir raíces. En nuestro caso, los tejidos seleccionados solo mostraron capacidad de regenerar brotes foliares, lo cual es probablemente una indicación de que la mayoría de los regenerantes son quiméricos.

Los resultados anteriores permitieron concluir que los porcentajes de eficiencia, medida con base a los resultados de PCR fueron, 73.6% para tejidos infiltrados con pCambia, 70% para tejidos infiltrados con pCambia 2301 y PCH32 y 76.6% para tejidos transformados con BIBAC2.

Regeneración de tejidos meristemáticos de banano

Para la regeneración de meristemos de banano, se utilizó kanamicina a 150 mg L⁻¹ como agente de selección de transformantes. La figura 3.11 ilustra los resultados de regeneración obtenidos de tejidos no transformados y transformados con *A. tumefaciens* EHA105. En esta figura, panel A, se observa que los tejidos no transformados, mostraron una capacidad normal de regeneración a plántula con brotes foliares y raíces.

Los tejidos control del proceso de transformación (sometidos a vacío, sin tratamiento con kanamicina) mostraron un desarrollo normal pero retardado (panel B). Los tejidos control sometidos a vacío, y tratados con kanamicina mostraron un desarrollo nulo o incipiente de brotes foliares (panel C). En contraste, los tejidos transformados con *A. tumefaciens* y sometidos a kanamicina como agente de selección de planta, mostraron una capacidad restringida para regenerar brotes foliares y una capacidad nula para regenerar raíces (panel E).



Figura 3.11. Regenerantes de banano Enano Gigante a partir de meristemos. A) Tejidos no transformado, B) Testigo regenerado sin kanamicina C) Testigo tratado con kanamicina, D) muestra transformada *A. tumefaciens* EHA105 portando el vector pCH32 y regenerada en presencia de kanamicina.

En la figura 3.12 se muestra los resultados obtenidos en las pruebas de regeneración a partir de tejidos meristemáticos de banano infiltrados con *A. tumefaciens* EHA105. En dicha figura se muestran los porcentajes de regeneración de brotes foliares alcanzados para las tres combinaciones de bacteria vector utilizadas. Los resultados obtenidos fueron: 24% para los tejidos infiltrados con pCambia 2301, 28% para los tejidos infiltrados con pC2301 y pCH32 y 27% para los tejidos infiltrados con BIBAC2 con inserto de 50 kb. Los brotes apicales presentaron una morfología moderadamente normal.

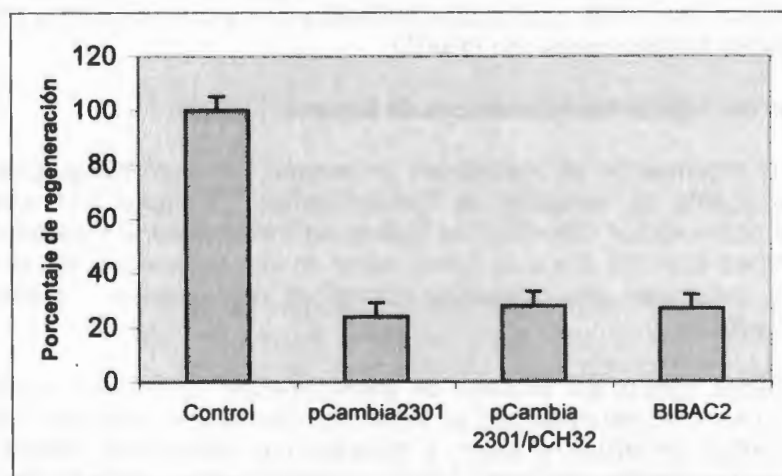


Figura 3.12. Porcentajes de regeneración de brotes en tejidos meristemáticos de banano sometidos a infiltración. Error estándar = 5.25836

En la tabla 3.2 se muestra el análisis de varianza de regenerantes de brotes foliares producidos de tejidos meristemáticos de banano sometidos a infiltración al vacío. En esta tabla se compara el valor medio de regeneración de los tratamientos. La prueba F en la tabla de ANOVA probó una diferencia estadística significativa entre las medias de los tratamientos

Tabla 3.2. Análisis de varianza de una vía (ANOVA) para el número de regenerantes obtenidos por tratamiento.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón F
Entre grupos	12195	3	4065	48.65
Dentro de grupos	668.667	8	83.58	
Total	12863.7	11		

Por otra parte, en la tabla 3.3. se muestra el análisis de medias de regenerantes por tratamiento, el error estándar y de la prueba de rango múltiple. En esta tabla se observa, a un nivel de confianza del 95%, que si hubo una diferencia estadística significativa entre los tratamientos y el control. Sin embargo, la verificación del análisis de varianza, a un nivel de confianza del 95%, mostró que no había una diferencia estadística significativa entre las medias de los tratamientos.

Tabla 3.3. Medias de regeneración por tratamiento y prueba de rango múltiple de regenerantes por tratamiento

Tratamiento	Repetición	Media	Error estándar	Varianza	Desviación estándar	Homogeneidad
Control	3	100	5.27836	0	0	a
PCambia2301	3	24.3333	5.27836	105.33	10.2682	b
PCambia2301/pCH32	3	28	5.27836	100	10	b
BIBAC2	3	27	5.27836	129	11.3568	b
TOTAL	12	44.8333				

En contraparte a nuestros resultados, May *et al.* (1995) reportaron 50% de regeneración de brotes apicales quiméricos de tejidos meristemáticos de banano presuntamente transformados y seleccionados con 100 mg L⁻¹ de kanamicina, así como la detención del crecimiento y amarillamiento de las hojas por efecto inhibitorio del antibiótico. En comparación, nuestro resultado con el ensayo de selección de transformantes con 150 mg L⁻¹ de kanamicina, produjeron una reducción en el porcentaje de regenerantes, reduciendo probablemente el número de escape. No obstante, se observó, que la concentración de kanamicina de 150 mg L⁻¹, produjo un efecto dañino acumulativo que se tradujo en un retroceso del vigor de los tejidos, con detención del crecimiento, amarillamiento y necrosis de los brotes foliares de los tejidos. De hecho, no se logró la regeneración de raíces.

De lo anterior se concluyó que: al someter a los tejidos infiltrados al vacío con *A. tumefaciens* a una concentración de kanamicina de 150 mgL^{-1} , se obtuvo, un promedio del 26% de regeneración apical y que la capacidad de los tejidos meristemático infiltrados al vacío para regenerar brotes foliares, en presencia de 150 mg L^{-1} de kanamicina, es independiente del vector utilizado.

REFERENCIAS

- Costa M.G.C., Nogueira F.T.S., Figueira M.L., Otón W.C., Brommonschenkel S.H. and Cecon P.R.** (1999). Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.)cultivars. Plant Cell Reports 19:327-332.
- Charity J.A., Holland L., Donaldson S.S., Grace L. and Walter C.** (2001) *Agrobacterium*–mediated transformation of *Pinus radiata* organogenic tissue using vacuum infiltration. Plant Cell Tissue and Organ Culture 70: 51-60.
- Edwin J.** (1995). Methods in Molecular biology. Plant gene transfer and expression protocols. 49: 125-141.
- Erlich H.A** (1989), Principles and applications for DNA amplification. Stockon Press. New York. USA.
- Ganapathi T.R., Higgs N.S., Balint-Kurti P.J., Arntzen C.J., May G.D. and Van Eck J.M.** (2000) *Agrobacterium* –mediated transformation of embriogenic cell suspensión of banana cultivar Rasthali (AAA). Plant Cell Reports. 20: 157-162.
- Hamilton C.M., Frary A., Lewis C. and Tanksley S.D.** (1996). Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes. Proc Natl Acad. Sci. 93: 9975-9979.
- Hamilton C.M.** (1997). A binary-BAC system for plant transformation with high-molecular-weight DNA. Gene 200: 107-116.
- Ghosh S., Malhotra P., Laitha P.V., Guna-Mukherjee S. and Chauhan V.S.** (20001). Expression of *Plasmodium falciparum* C-terminal region of merozoite surface protein (PfMSP1₁₉), a potencial malaria vaccine candidate, in tobacco. Plant Science: 162: 335-343.
- Jeferson R.A. and Wilson K.J.** (1991). The Gus Gene fusion System. Plant Mol. Biol. 14: 1-33.
- López-Gómez and Gómez Lim** (1992). A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysacarides using ripe mango mesocarp. HortScience 27: 440-444.

- Nauerby B., Billing K. and Wyndaele R.** (1996), Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration compared to carbenicillin and cefotaxime in concentrations suitable for elimination of *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Sciece. 123: 169-177.
- Novak F.J., Afza R., Van-Duren M., Perea Dallos M., Conger B.V. and Xiaolang T.** 1989) Somatic embriogénesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB) bananas (*Musa* spp) Biotechnology Genet Eng REV 15:313-327.
- May G.D., Afza R., Mason H.S., Wiecko A., Novak F.J. and Arntzen C.J.** (1995). Generation of transgenic banana (*Musa acuminata*) plants via *Agrobacterium* – mediated transformation. Biotechnology. 13: 486-492.
- Norelli J.L. and Aldwinckle H.S.** (1993). The role of Aminoglycoside Antibiotics in the Regeneration and selection of Neomycin Phosphotransferase –transgenic Apple Tissue. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 182 (2): 311-316.
- Pérez Hernández J.B., Remy S. and Sagi L.** (1998). Chemotactic movement to wound exudates and attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to single cells and tissue from banana plants. Acta Hort. 490: 463- 467.
- Sandoval F.A.G** (2001). Biotecnología aplicada para la micropopagación de banano y plátano (*Musa* AAA,AAB) Manual básico. San José, Costa Rica CORBANA.
- Scarafoni A. and Duranti M.** (20001). An approach to the critical assessment of the experimental condition in practical molecular biology: isolation of plant DNA. Biochemistry and Molecular Biology Education. 29:21-23
- Tabor J.M.** (1989). Genetic Engineering Technology in industry and Pharmacy. Principles and applications. New York. USA.
- Tang H., Ren Z. and Krezal.** (1999). An evaluation of antibiotics for the elimination of *Agrobacterium tumefaciens* from walnut somatic embryos and for the effects on the proliferetion of somatic embryos and regeneration of transgenics plants. Cell Biology and morphogenesis 19: 8881-887.
- Woodhead M., Davies H.V., Brennan R.M. and Taylor M.A.** (1998). The isolation of Genomic DNA from Blackcurrant (*Ribes nigrum* L). Molecular Biotechnology 9: 243-245.

CONCLUSIONES

Se comprobó la capacidad de regeneración a plántulas de los tejidos meristemáticos utilizados en los protocolos de transformación.

Se evaluó la concentración de kanamicina a usarse como agente de selección de tejidos meristemáticos de banano.

Se determinó la expresión transitoria del gen GUS en tejidos meristemáticos de banano "Enano Gigante" transformados con: a) *Agrobacterium* EHA105 portando el vector pCambia 2301, b) *Agrobacterium* EHA105 portando el vector pCambia 2301 y el plásmido auxiliar pCH32 y c) *Agrobacterium* EHA105 portando el vector binario BIBAC2 con un inserto de 50 kbp de DNA genómico de banano Calcuta IV.

Se logró la eliminación de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105, de tejidos de banano sometidos a transformación por infiltración al vacío, mediante tratamientos de lavados con antibióticos.

Se confirmaron los resultados de la prueba histológica mediante la determinación de la actividad específica de la β -Glucuronidasa sobre MUG en tejidos de banano Enano Gigante.

Se implementó la metodología para el aislamiento del DNA genómico de banano. Se confirmó la transformación de tejidos meristemáticos de banano "Enano Gigante" transformados por infiltración al vacío con *A. tumefaciens* EHA105 portando el vector pC2301 y el plásmido auxiliar pCH32 mediante amplificación de un fragmento del gen *nptII*.

Se obtuvo la regeneración de primordios foliares de tejidos sometidos a transformación.

PERSPECTIVAS

Los experimentos de transformación mediado por *A. tumefaciens* para *M. acuminata* var. "Enano Gigante" por infiltración al vacío, permitieron incrementar ligeramente la eficiencia de transformación con respecto a ensayos de transformación efectuados solo por cocultivo con *A. tumefaciens*.

Aunque el protocolo desarrollado demostró ser eficiente para la transformación de tejidos meristemáticos de banano, todavía falta explotar el potencial del protocolo. Una gama de alternativas se visualizan, las cuales podrían incrementar la eficiencia de transformación y la capacidad de regeneración de los tejidos. Entre algunas de las alternativas todavía por explorar, se pueden mencionar: el empleo de otras cepas de *A. tumefaciens*, el ensayo con otros vectores plasmídicos, el empleo de nuevos diseños de construcciones que permitan la integración de genes que aceleren por ejemplo el proceso de división celular y embriogenesis somática, incrementando así, la capacidad de regeneración de los tejidos transformados por infiltración. El empleo de la proteína verde fluorescente GFP, como gen reportero, o el uso de gen *bar* que confiere resistencia a fosfinotricina (Basta®), podría facilitar la identificación y selección de los transformantes.

El incremento en la eficiencia de transformación y regeneración, permitirá a futuro, el ensayo con nuevas construcciones que permitan enfocar el trabajo de investigación hacia la resolución de problemas específicos. Son indispensables por ejemplo: los ensayos de transformación con secuencias que codifiquen las llamadas proteínas antifugicas (AFPs), pequeños péptidos estables ricos en cisteína, aislados de semillas de diferentes especies de plantas. Estas proteínas antifúngicas presentan la ventaja, no solo de ser de amplio espectro antifúngico, sino de no ser tóxicas para las células de banano o humanas; otros ensayos de transformación podrían enfocarse, al empleo de secuencias que incluyan el gen replicasa, necesario para conferir resistencia al virus del bunchy top (BBTV) (Sagi *et al.*, 2001).

Alternativamente, otra opción, es redirigir los estudios de transformación mediados por *A. tumefaciens* sobre suspensiones células embriogénicas de banano, lo cual favorecería la obtención de regenerantes no quiméricos.

APÉNDICE

I. Extracción de DNA plasmídico “MINIPREP ”

Procedimiento:

1. Inocular 5 ml de LB (ver apéndice A) a partir de freezer stock y crecer a saturación inicial.
2. Transferir el cultivo a tubos Eppendorf y centrifugar a 3800 rpm x 6 minutos.
3. Decantar y descartar el sobrenadante.
4. Adicionar 100 μ l de TE 1X (Tris-HC 10 mM, EDTA₂Na 1 mM) y resuspender golpeando con la punta de los dedos.
5. Adicionar 450 μ l de TENS Tris-HC 10 mM, EDTA₂Na 1 mM, NaOH 0.1 M SDS 0.5 %), Invertir sin agitar unas 4 veces y dejar en hielo 5 minutos.
6. Agregar 225 μ l de acetato de sodio 3 M. Invertir sin agitar unas 4 veces y dejar en hielo 5 minutos.
7. Centrifugar a 12000 rpm por 20 minutos.
8. Transferir el sobrenadante a otro tubo Eppendorf.
9. Agregar al sobrenadante 700 μ l de etanol al 100% enfriado en hielo.
10. Invertir sin agitar unas 4 veces.
11. Inmediatamente centrifugar a 14000 rpm por 5 minutos.
12. Lavar el pelet con 700 μ l etanol al 70% enfriado en hielo. Invertir sin agitar 2 veces.
13. Centrifugar por 5 minutos, descartar el sobrenadante y secar el pelet al aire.
14. Agregar 50 μ l de TE (1X) y resuspender golpeando con la punta de los dedos.
15. Tomar de 1-3 μ l para electroforesis.

II. Preparación de células competentes de *Agrobacterium* con CaCl₂

Procedimiento:

1. Inocular 2 tubos con 5 ml de medio líquido YEP (apéndice A), suplementado con antibióticos (Apéndice B y C), con una única colonia fresca o alternativamente utilizar de 2 a 5 μ l de *freezer stock*.
2. Crecer el cultivo a saturación inicial, de 1 a 2 días. (aproximadamente 20 horas)
3. Inocular 250 ml de YEP, suplementado con antibióticos, con 10 ml del cultivo anterior.
4. Agitar a 28°C hasta obtener una densidad óptica de 0.5 a 0.55 y enfriar en hielo.
5. Centrifugar 200 ml del cultivo anterior, utilizando 4 tubos cónicos de polipropileno de 50 ml, a 4000 rpm de 10 a 15 minutos.
6. Centrifugar utilizando el mismo programa y decantar el agua de lavado.
7. Resuspender la pastilla bacteriana utilizando 4 ml de CaCl₂ 20 mM frío (2 ml para cada tubo); No pipetee.
8. Transferir a tubos Eppendorf, 100 μ l de las células de *Agrobacterium* resuspendidas con CaCl₂, cerrar y enfriar inmediatamente sumergiendo en nitrógeno líquido.
9. Almacenar a -80 °C.

III. Transformación de células competentes de *Agrobacterium* en CaCl₂ por choque térmico

Procedimiento:

1. Descongelar y mantener los minipreps y las células competentes de *Agrobacterium* en recipientes con hielo.
2. Transferir 5 µl del miniprep a 100 µl de las células competentes de *Agrobacterium*.
3. Incubar la mezcla DNA plasmídico-*Agrobacterium* a 37°C por 5 minutos.
4. Sumergir la mezcla DNA-*Agrobacterium* por cinco segundos en nitrógeno líquido.
5. Adicionar 1 ml de YEB (apéndice A), con el antibiótico correspondiente, (apéndices B y C) enfriado en un baño de hielo.
6. Agitar a 28°C de 3 a 4 horas.
7. Centrifugar a 12000 rpm x 30 segundos. Retirar 1 ml del sobrenadante y mezclar la pastilla bacterial con el sobrenadante restante utilizando una punta.
8. Transferir todo el contenido a una placa petri con medio YEB conteniendo los antibióticos correspondientes.
9. Estriar hasta que toda la muestra se seque; tapar y marcar la placa.

IV. Preparación de células electro-competentes

Procedimiento:

1. Inocular 4 tubos con 5 ml de YEP (*Agrobacterium*) o LB (*E. Coli*) con antibióticos (ver apéndice A, B y C).
2. Crecer a hasta saturación inicial, agitando a 28°C de 1-2 días para *Agrobacterium* y a 37°C por 1 días para *E.coli*.
3. Diluir con 400 ml de YPE o LB.
4. Crecer hasta una densidad óptica de 0.5 a 7 ua (A = 600 nm) (aproximadamente 8 horas para *Agrobacterium* y 4 horas para *E.coli*).
5. Enfriar utilizando un baño de hielo.
6. Precipitar por centrifugación a 4000 rpm x 15 minutos a 4°C.
7. Resuspender con 160 ml de HEPES 1 mM a pH 7.
8. Precipitar por centrifugación a las mismas condiciones.
9. Resuspender con 160 ml de HEPES 1 mM pH 7 con glicerol al 10%.
Nota sustituya el HEPES 1 mM pH 7 con glicerol al 10% con solo glicerol al 10% para *E.coli*.
10. Precipitar nuevamente. Realizar este paso dos veces.
11. Resuspender con 8 ml de HEPES 1 mM pH 7 con glicerol al 10%.
12. Dividir la mezcla resuspendida en 8 tubos Eppendorf.
13. Centrifugar a 4,000 rpm a 4 °C por 5 minutos.
14. Resuspender cada pelet en 800 µl de HEPES 1 mM pH 7 con glicerol al 10%.
15. Transferir alícuotas de 50 µl a tubos Eppendorf.
16. Almacenar a - 80°C.

V. Transformación de células electro-competentes por electroporación

Procedimiento:

1. Adicionar 1 μl de DNA plasmídico a 20 μl de células electro-competentes (manéjese en hielo).
2. Colocar la mezcla de bacteria ADN plasmídico entre los domos de la celda sin que se formen burbujas (La deposición puede realizarse en la parte inferior de la celda).
3. Cerrar la celda de electroporación e introducir en el equipo.
4. Colocar la capacitancia a 300 μF , colocar el voltaje a (LOW Ω), y la tasa de carga a FAST.
5. Subir el voltaje a 410 Voltios para *A. tumefaciens* y a 230 para *E. coli*.
6. Pulsar la mezcla de DNA-bacterias: pasar el botón de "CHARGE" a "ARM", oprimir TRIGGER cuando el voltaje descienda entre 385 y 400 voltios para *Agrobacterium* y a 115 para *E. Col*. (La unidad A debe mostrar un valor cercano a 1.9–2)
7. Pasar el botón de "ARM" a "CHARGE"
8. Inmediatamente después del pulso, adicionar 1 ml de medio YEP o LB (apéndice A) líquido e incubar en agitación a 28°C de 4 a 6 horas para *Agrobacterium*, y a 37°C por 1 hora para *E.coli*.
9. Plaquear 100 μl sobre medio de selección y dejar reposar a 28°C o 37°C según corresponda.

NOTAS:

1. Leer cuidadosamente las instrucciones antes de tocar el equipo de electroporación.
2. Se proporcionan las condiciones de electroporación para el equipo Cell-Porator voltaje Booster de Life technologies).

VI. Extracción de proteína

Procedimiento:

- 1 Macerar la muestra dentro de un tubo Eppendorf.
- 2 Adicionar 500 μl de buffer de extracción de proteína (buffer de fosfatos 2.5 mM, β -mercaptoetanol 0.1 M, EDTA₂Na 0.1 M, Sarcosil 0.001 %, tritón x-100 1 $\mu\text{l}/\text{ml}$)
- 3 Macerar nuevamente.
- 4 Agitar los tubos Eppendorf con un vortex para maximizar la liberación de las proteínas en el buffer.
- 5 Centrifugar por 10 minutos a 14 rpm.
- 6 Pasar el sobrenadante a tubos Eppendorf limpios.
- 7 Guardar a -20°C el sobrenadante y a -70°C la muestra macerada.

VII. Determinación de proteína por el método Bradford

Procedimiento:

1. Preparar una curva de calibración usando suero de albúmina bovina (BSA) 1 mg/ml. Adicionar 0, 2, 4, 6, 8 y 10 μ l del stock BSA en tubos Eppendorf.
2. Preparar las muestras a analizar. Adicionar 2 μ l del extracto proteico de cada muestra en tubos Eppendorf.
3. Adicionar a los estándares y muestras: 30 μ l de tritón al 0.5%.
4. Agitar con un vortex y reposar por 5 minutos a temperatura ambiente.
5. Adicionar el complemento a 900 μ l con agua destilada.
6. Adicionar en cada tubo 200 μ l de reactivo de Bradford.
7. Agitar en un vortex y dejar en reposo 5 minutos.
6. Leer la absorbancia a 595 nm.

VIII. Digestión de DNA genómico para análisis por PCR

Procedimiento:

1. Utilizar un volumen de digestión de 30 μ l a una concentración del buffer de la enzima a 1X. Digerir 3 μ l del DNA genómico, usando enzima Swa I a una concentración final de 0.8 U/ μ l, incubar toda la noche a 25°C.
2. Verificar la digestión de las muestras por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%.

NOTA: Alternativamente, en lugar de la enzima Swa I, digerir usando las enzimas EcoR I y Bam H I a una concentración final de 0.6 u / μ L.

Tablas

A. Medios para el crecimiento de *Agrobacterium* y *E. coli*

	<i>A. tumefaciens</i>	<i>E. coli</i>
Medio (100 ml)	YEP	LB
Peptona	1 g	
Triptona		1 g
Ext. De Levadura	1 g	0.5 g
NaCl	.5 g	1 g
Agar	1.5 g	2 g

B. Antibiótico utilizado para el cultivo de microorganismos

Bacteria	Plásmido	Antibiótico
<i>E. coli</i>	-----	-----
E. Coli	BIBAC2	Kan + Hyg
EHA105	-----	Rf
EHA105	pC2301	Rf + Kan
EHA105	pC2301 + pCH32	Rf + Kan + Tet
EHA105	BIBAC2	Rf + Kan + Hyg
EHA105	BIBAC2 + pCH32	Rf + Kan + Tet

C. Concentración de antibiótico recomendada para *A. Tumefaciens*

Antibiótico	Stock	Concentración recomendada
Rifampicina	100 mg/ml	100 µg /ml
Kanamicina	100 mg/ml	100 µg /ml
Tetraciclina	050 mg/ml	005 µg /ml
Hyg.	050 mg/ml	020 µg /ml