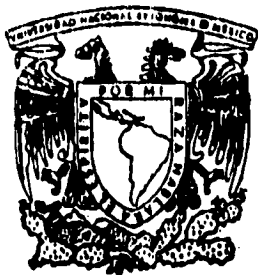


112
29.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**"TRANSFORMACION DE FRIJOL, Phaseolus vulgaris
L., POR MEDIO DE LA INFILTRACION DE
Agrobacterium"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

INGRID AILEEN O'DONNOR SANCHEZ



MEXICO, D. F.



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

1995

FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
Presente

Los abajo firmantes, comunicamos a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis que realiz(ó)ron la pasante(s) Ingrid Aileen O'Connor Sánchez

con número de cuenta 7853022-7 con el Título: "Transformación de frijol, Phaseolus vulgaris L., por medio de la infiltración de Agrobacterium"

Otorgamos nuestro **Voto Aprobatorio** y consideramos que a la brevedad deberá presentar su Examen Profesional para obtener el título de Bióloga

GRADO	NOMBRE(S)	APELLIDOS COMPLETOS	FIRMA
	Dr. Mario	Rocha Sosa	
Director de Tesis	M. en C. Víctor Manuel	Valdéz López	
	Dr. Guadalupe Judith	Márquez Guzmán	
	Dr. Guillermo	Laguna Hernández	
Suplente	M. en C. Luisa Albarina	Alba Lois	
Suplente			

ÍNDICE

RESUMEN -- 1

INTRODUCCIÓN -- 2

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA -- 2

TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS VEGETALES MEDIANTE *Agrobacterium* -- 4

VECTORES PARA CLONAR GENES EN PLANTAS MEDIANTE *Agrobacterium tumefaciens* -6

Vectores cointegrativos -- 8

Vectores binarios -- 9

GENES REPORTEROS (GUS) -- 11

GAMA DE HOSPEDEROS DE *A. tumefaciens* -- 12

MÉTODOS PARA TRANSFORMAR PLANTAS BASADOS EN LA TRANSFERENCIA
DIRECTA DE GENES -- 13

Biolística o técnica de bombardeo de microproyectiles -- 14

Microinyección en proembriones cigóticos y derivados de microsporas -- 15

¿Paso libre de genes a través de la pared celular? -- 17

Incubación de semillas secas o embriones en DNA -- 18

Incubación de tejidos turgentes o cultivos celulares en DNA -- 18

Transformación de polen -- 19

Ruta del tubo polínico -- 19

Fusión de liposomas -- 21

Inyección de liposomas -- 21

Microláser -- 22

EL FRIJOL -- 22

LA RAÍZ-MERISTEMOS -- 25

FIJACIÓN DEL NITRÓGENO -- 28

JUSTIFICACIÓN -- 30

OBJETIVOS -- 32

MATERIALES Y MÉTODO EXPERIMENTAL -- 34

RESULTADOS -- 37

DISCUSIÓN, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS -- 45

BIBLIOGRAFÍA -- 51

RESUMEN

Dos de los principales obstáculos para transformar, *via Agrobacterium*, muchas plantas de interés comercial y/o científico son: 1) la necrosis de las células vegetales ante la infección bacteriana en las condiciones clásicas de cultivo *in vitro*, y 2) la baja eficiencia con que en estas condiciones se transfiere el T-DNA del plásmido Ti. El frijol es una de las plantas recalcitrantes más importantes en México. En esta tesis se diseñaron y experimentaron métodos de infección *in vivo* con *Agrobacterium*, para transformar la radícula de semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris L.*) de dos días de germinación. Uno de estos métodos (el control) consistió en simplemente poner las semillas en contacto con las bacterias (C58Rif/pRi15834/p35SGUSint); en otro se hirió la punta de la radícula previamente al contacto; en el tercero se aplicó un tratamiento de infiltración para infectar; y en el cuarto tanto se hirió, como infiltró. Los resultados muestran que con el procedimiento de herida, aumentó la eficiencia de transformación en casi tres veces con respecto al control, y con el de infiltración el incremento fue de más de cinco veces, al igual que usando ambos. Esto hace posible por un lado, obtener raíces químicas para estudios donde sean necesarias, y por otro usarlas como materia prima para experimentos *in vitro* de regeneración o dediferenciación. Además de dar la base para el desarrollo y empleo de estrategias alternativas de transformación de tejidos vegetales.

INTRODUCCIÓN

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

El término transformación se acuñó a raíz de los experimentos realizados por F. Griffith en el segundo cuarto de este siglo. Griffith trabajó con la bacteria *Diplococcus pneumonia*, conocida vulgarmente como neumococo. Esta bacteria existe en dos formas fenotípicamente diferentes, el fenotipo liso (S) y el rugoso (R). Las células S son virulentas, pueden producir neumonía en ratones, y están cubiertas por una cápsula de polisacáridos. Las células R son avirulentas y carecen de cápsula. Lo que hizo Griffith fue inyectar ratones con una mezcla de neumococos R (avirulentos) vivos y bacterias de tipo S muertas por calor (y, por lo tanto, no virulentas). Encontró, sorprendentemente, que muchos de los ratones murieron de neumonía. Al tomar muestras de sangre de los ratones muertos, vio que había no solo bacterias R, sino también bacterias encapsuladas de tipo S. Se demostró que estas últimas no se pudieron haber producido por mutación. Así pues, de las bacterias vivas inyectadas a los ratones, algunas parecían haberse *transformado* en virulentas. Y transformado además, de manera estable, ya que el nuevo fenotipo persistía a través de las generaciones.

Posteriormente, varios investigadores confirmaron los resultados de Griffith. Entre los experimentos más interesantes que se hicieron, se encuentran aquellos en los cuales la transformación de células R en células S se llevó a cabo *in vitro*; no solo con células S que habían sido matadas con calor, sino con extractos de ellas. La siguiente tarea fue determinar la naturaleza química de la sustancia o "principio transformante", como llegó a ser conocida.

O. T. Avery, C. M. MacLeod y M. McCarty en 1944, concluyeron que el principio transformante era el DNA. A partir de ese momento se han realizado innumerables experimentos por muchos grupos, que demuestran que el fenómeno de transformación tiene lugar en varias especies diferentes de bacterias.

La transformación involucra la exposición de la bacteria a la presencia de DNA exógeno, la inclusión de ese DNA en la célula, y su integración en el genoma bacteriano, ya sea en un cromosoma o permaneciendo como replicón estable. Para que pueda efectuarse la transformación, las células receptoras deben estar en estado *competente* (otro término que se originó de estos experimentos con bacterias). La naturaleza de este estado, así como los factores que lo determinan, no han sido definidos completamente. Sin embargo, todo parece indicar que el estado competente representa una condición fisiológica que permite por un lado la inclusión de DNA exógeno, y por otro su integración en el genoma.

Ya que el fenómeno de la transformación puede efectuarse con el material genético mismo (purificado), claramente es de importancia fundamental para la genética. No solamente provee de una herramienta extraordinariamente útil en la investigación científica, sino que además, el descubrimiento de la existencia de la transferencia horizontal de genes ha acarreado todo un avance en los conceptos que se tienen acerca de las variadísimas posibilidades que hay entre los seres vivos para relacionarse unos con otros. Hasta aquí, se podría pensar que la transformación es solo un efecto de técnicas de laboratorio y que no tiene otro significado que el de proporcionar un modelo para la investigación genética. Es cierto que los experimentos de Griffith no fueron completamente "naturales". Sin embargo, experimentos posteriores han demostrado que en ciertos cultivos bacterianos, la lisis de algunas células, la cual lo más probable es que ocurra a su muerte, libera DNA en el medio, que puede entonces ser tomado por las células vivas. Desde entonces se sugirió que la transformación puede ocurrir no solamente en cultivos de laboratorio, sino en condiciones naturales, por ejemplo entre bacterias que infecten a alguna hospedera apropiada, y que es posible que la transformación tipo bacteriana *in vivo*, después de la conjugación o de la transducción, podría darse dentro de organismos perteneciente a otros reinos. Ahora se sabe que esto es verdad, como se verá más adelante.

En las últimas décadas se han logrado grandes avances, en cuanto a técnicas de laboratorio para transformar células, y para obtener organismos transgénicos. En la actualidad, es posible introducir material genético exógeno no solamente en células procariontes, sino también eucariontes. Acerca de la modificación genética que se ha hecho en animales, cabe destacar los experimentos de Ralph Brinster y Richard Palmiter en 1982 (citado en 11). Ellos introdujeron el gen de la somatotropina (hormona de crecimiento) de rata, en cigotos de ratón. Permitieron que el desarrollo embrionario de estos cigotos prosiguiera y que los individuos transgénicos se desarrollaran. Cuando los ratones crecieron, fue claro que el gen de rata se había integrado a su genoma y que se había estado expresando. Los ratones transformados crecieron mucho más que los controles. Sus células tenían alrededor de treinta y cinco copias del gen, y la concentración de la hormona en sangre era cientos de veces superior a la normal. Más recientemente, el gen humano de la somatotropina se introdujo y expresó exitosamente en ratón, creándose lo que se denominó "super-rodente" (una línea de ratones gigantes).

Algunos experimentos similares, en los que se usaron animales domésticos grandes, han fracasado. Por ejemplo, cuando el gen de la somatotropina se insertó en cerdos; este se expresó, pero los cerdos presentaban síntomas de artritis y otros trastornos.

Estos ejemplos sugieren que los efectos de la modificación genética en animales son impredecibles. No basta con que los genes nuevos o modificados se inserten en células somáticas o en gametos, además es

necesario que la inserción sea en lugares específicos de los cromosomas, para que su expresión se regule apropiadamente. Y por añadidura, no debe alterar el funcionamiento de otros genes.

A pesar de los diversos obstáculos, la investigación en animales transgénicos sigue avanzando. Recientemente, se han clonado los genes responsables de varias enfermedades. Se han creado sondas de DNA muy útiles en diagnósticos prenatales de males heredables. Y estas sondas, en combinación con otros avances técnicos, están ya teniendo un fuerte impacto sobre la incidencia de muchas enfermedades, incluyendo la anemia falciforme.

TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS VEGETALES MEDIANTE *Agrobacterium*

Agrobacterium tumefaciens es una bacteria gram negativa del suelo, que puede infectar a una amplia gama de gimnospermas y dentro de las angiospermas, a las dicotiledóneas y al menos algunas monocotiledóneas. La infección se inicia en zonas heridas de la planta, y da como resultado la formación de tumores (“agallas” o “tumores de corona”); hay crecimiento desordenado y dediferenciación de las células vegetales en la región afectada. Existen dos propiedades típicas en los tumores inducidos por *Agrobacterium* que desde que se descubrieron llamaron mucho la atención: una es que su crecimiento es independiente del aporte exógeno de fitohormonas, y la otra, es que generan unos compuestos nitrogenados atípicos, denominados en conjunto opinas, que sirven como fuente de carbono y nitrógeno a las bacterias colonizantes. Ahora se sabe que estas características fenotípicas anormales de las células infectadas son consecuencia de la expresión de un segmento de DNA que la bacteria es capaz de transferirles. Este se puede integrar al genoma de forma estable, heredándose a través de las generaciones subsecuentes. Dicho DNA es conocido como T-DNA (“transferred-DNA”).

Se ha descubierto que las cepas virulentas de *A. tumefaciens* contienen un plásmido de gran tamaño (alrededor de 200 kb), al que se denomina Ti (“Tumor-inducing”). Este plásmido tiene dos regiones, ambas involucradas en la formación de los tumores: la que constituye el segmento de DNA que se transfiere al genoma vegetal (región T), es un fragmento de 23 kb que comprende entre 8 y 13 genes (dependiendo del plásmido Ti particular) y se encuentra delimitada por secuencias repetidas directas, las cuales corresponden a sus bordes; y la región denominada de virulencia (*vir*), que abarca cerca de 35 kb, responsable del procesamiento y transferencia del T-DNA (figura 1 -tomada de 2). En el T-DNA hay dos conjuntos de genes, en uno están los que codifican para las enzimas involucradas en la biosíntesis de citoquininas (como por ejemplo, la isopentenil-adenina) y auxinas (como el ácido indol-acético); hormonas cuya acumulación

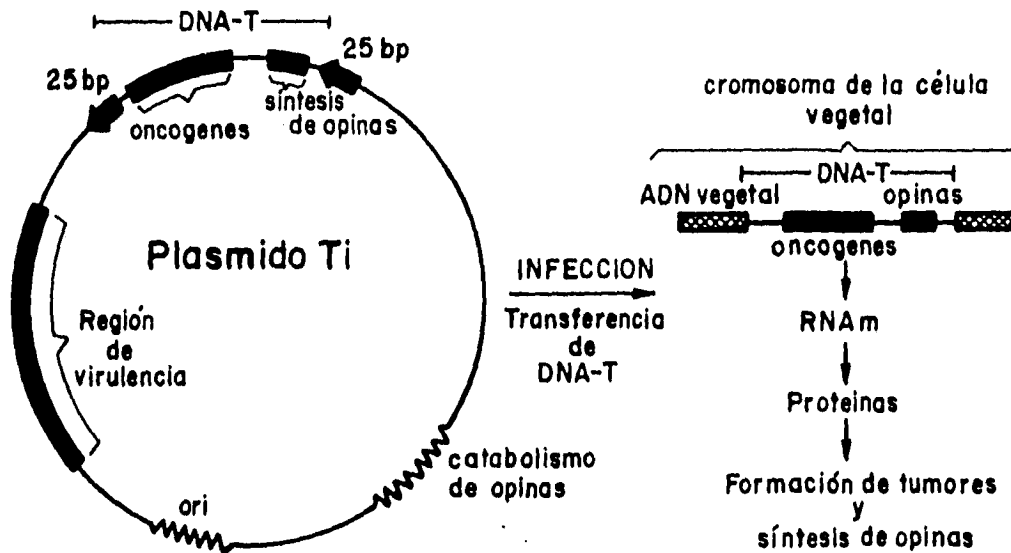


Fig. 1. Descripción esquemática del plásmido Ti y de los sucesos involucrados en la formación de tumores. La región de virulencia codifica las funciones que procesan al segmento flanqueado por las secuencias de 25 pares de bases (T-DNA) para su transferencia a la planta. Una vez que se integra el T-DNA en el genoma de la planta, los genes codificados por este segmento de DNA son transcritos por la maquinaria molecular de la planta, produciendo un grupo de mRNAs que son traducidos en los polipéptidos responsables de la formación de tumores y la síntesis de opinas.

es la causa directa de la proliferación y dediferenciación de las células vegetales durante la formación de los tumores. En el otro se encuentran los responsables de la producción de opinas (como la octopina sintetasa o la nopalina sintetasa, por ejemplo). Por su parte, la región *vir* codifica para enzimas relacionadas con la excisión, transferencia y, probablemente también con la integración del T-DNA al genoma de la célula vegetal receptora. La secuencia de eventos que conducen a la formación de los tumores ocasionados por *A. tumefaciens* pueden dividirse, para efectos de claridad, en cuatro etapas: i) colonización bacteriana y unión a las células de la planta; ii) procesamiento y transferencia del T-DNA; iii) integración de éste al genoma de la célula receptora; y iv), expresión de las funciones codificadas por el DNA transferido.

La interacción entre la bacteria y la célula vegetal muy probablemente está mediada por receptores específicos, localizados tanto en la planta como en el microorganismo. Hay compuestos fenólicos de bajo peso molecular presentes en los exudados vegetales (por ejemplo, la acetosiringona), que son reconocidos por los productos de los genes *virA* y *virG*. Estos últimos actúan a su vez como activadores de la transcripción del resto de los genes *vir*. El gen *virD* codifica una endonucleasa que corta específicamente dentro de la secuencia, altamente conservada, de 25 pb que constituye el borde derecho del T-DNA. A partir de este extremo se genera unidireccionalmente una hebra monocatenaria del T-DNA. Esta se

transporta al interior de la célula vegetal, por un mecanismo aparentemente análogo al de la conjugación bacteriana. El T-DNA transferido va recubierto de proteínas que se unen a DNA de cadena sencilla, productos del gen *virE2*, y lleva covalentemente unida a su extremo 5' la proteína *virD2*; la cual probablemente funciona como "piloto", dirigiendo el complejo nucleoprotéico transferido (complejo T) hacia el núcleo de la célula vegetal. Una vez ahí, el T-DNA se integra covalentemente al genoma de la planta en una o más copias, en sitios distribuidos aleatoriamente en cualesquiera de los cromosomas. La figura 2 (tomada de 2) ofrece una representación esquemática de los eventos moleculares más destacados involucrados en el procesamiento y transferencia del T-DNA. Los genes del DNA transferido se transcriben dentro de la célula transformada por la RNA polimerasa II, y de su expresión depende el fenotipo del tumor.

VECTORES PARA CLONAR GENES EN PLANTAS MEDIANTE *Agrobacterium tumefaciens*

Una vez que se demostró fehacientemente que *A. tumefaciens* es capaz de transferir un segmento del plásmido Ti al genoma de células vegetales, inmediatamente surgió un comprensible interés por conocer las posibilidades de usar a esta bacteria como mediadora, para transferir a plantas los genes que uno eligiera. La demostración de que un transposón bacteriano (Tn7) insertado en la región T del plásmido Ti, podía ser transferido al genoma de células vegetales como parte del T-DNA, puso de manifiesto la potencialidad de este sistema para transformar con cualquier secuencia experimentalmente insertada entre los bordes de la región T.

En estudios orientados a establecer la funcionalidad en plantas, de algunos genes provenientes de otros organismos, se ha visto que los genes procarióticos intactos no son reconocidos por la maquinaria transcripcional de las células vegetales, y por consiguiente no son expresados. Los resultados han sido similares cuando se han probado genes eucarióticos heterólogos, provenientes de levaduras o animales por ejemplo. Esto llevó a la suposición de que solo sería posible expresar genes heterólogos en sistemas vegetales, si se colocaban bajo el control de señales funcionales en plantas; señales involucradas tanto en la generación de los transcritos, como en su procesamiento (por ejemplo, la señal para poliadenilación del mensajero). Hasta ahora, la única excepción que se ha encontrado a este principio, es la expresión en plantas de genes de *Drosophila* que codifican para proteínas de choque térmico ("heat-shock").

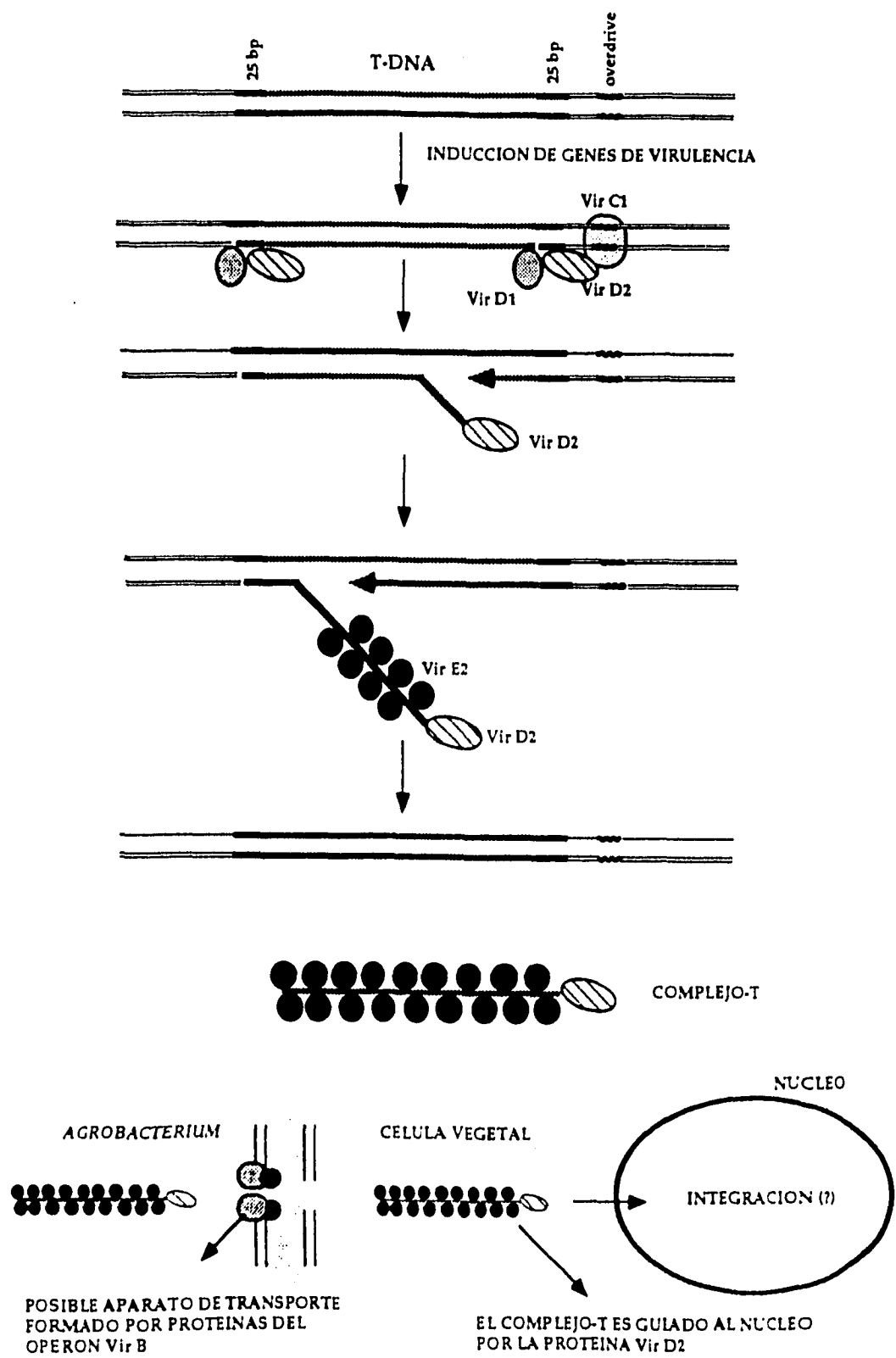


Fig. 2. Eventos moleculares que tienen lugar durante el procesamiento y transferencia del T-DNA de *A. tumefaciens* a células vegetales. (Explicación en el texto.)

Herrera-Estrella y col. (2) construyeron mediante técnicas de DNA recombinante, un gen quimérico formado por el promotor y el terminador de la transcripción (extremo 3') del gen de la nopalina sintetasa, y la región codificante de un gen bacteriano, el de la cloranfenicol-acetil transferasa del transposón Tn9 (gen *cat*), y lo insertaron en el T-DNA de un plásmido Ti. El gen híbrido se transfirió a células de tabaco mediante *Agrobacterium*. La detección de los mRNAs y la actividad enzimática de CAT en las células transformadas, indicaron que el gen quimérico era transcrito y traducido correctamente. Así se demostró por primera vez que es posible expresar genes de otros organismos en células vegetales.

Vectores cointegrativos

Los primeros experimentos de transferencia de genes a células vegetales se llevaron a cabo utilizando plásmidos Ti oncogénicos, por lo que no era posible regenerar plantas a partir las de células transformadas. Para obtener planta transgénicas a partir de células transformadas, era necesario el diseño y construcción de plásmidos Ti no-oncogénicos, que preservaran sin embargo, su capacidad para movilizar el T-DNA a las células hospederas. El descubrimiento de que el T-DNA no codifica ninguna función para su procesamiento y transferencia al genoma de la planta, y que las secuencias repetidas directas de 25 pb que constituyen los bordes, son los únicos elementos, de esta región, indispensables para que tales procesos ocurran, condujo pronto al desarrollo de este tipo de vehículos moleculares. Zambriski y col. (citado en 2) construyeron un plásmido Ti "desarmado"; de cuyo T-DNA se habían deletado los genes implicados en la biosíntesis de hormonas (los oncogenes), que fueron substituidos por el vector bacteriano pBR322. El T-DNA en este plásmido modificado, denominado pGV3850, solo conserva del original los bordes y el gen de la nopalina sintetasa (gen *nos*), que se emplea como marcador para identificar a la células que adquieran el T-DNA en cuestión. La inserción del pBR322 en la región T de este vector, crea un segmento de homología para que se pueda dar la cointegración (por recombinación homóloga) de cualquier vehículo derivado del pBR322 que porte el DNA de interés (vector intermediario cointegrativo). De esta forma, la información genética que se desea transferir a las plantas queda convenientemente situada entre los bordes del T-DNA.

Para movilizar los vectores intermediarios de *E. coli* a la cepa de *A. tumefaciens* que lleva el pGV3850, se usa un sistema de conjugación bacteriana. Puesto que los vectores relacionados con el pBR322 no pueden replicarse en *Agrobacterium*, y solamente se establecen en esta bacteria si se recombinan con el plásmido Ti, los exconjugantes que contienen cointegrados pueden aislarse fácilmente seleccionando para la resistencia a un antibiótico, presente en el vector intermediario, pero ausente en el plásmido Ti.

El pGV3850 se utilizó para transferir el gen quimérico 5' *nos-nptII-3' nos* a células de tabaco. Los transformantes adquirieron la resistencia a kanamicina y además, lo que también es muy importante, respondieron normalmente a fitohormonas; esto es, pudieron dar origen (*in vitro*) a plantas enteras e inalteradas en apariencia. Más aún, estas plantas transgénicas produjeron semillas, las cuales al ser analizadas, mostraron que el patrón hereditario del gen quimérico correspondía a una distribución mendeliana típica, correspondiente a un carácter monogénico dominante. Este resultado abrió una amplia perspectiva para la generación de plantas transgénicas, e impulsó la creación de otros vehículos derivados del Ti, así como de vectores intermediarios más pequeños, que permitieran insertar fácilmente los genes de interés en la región T (a los que se denomina genéricamente vectores cointegrativos).

Vectores binarios

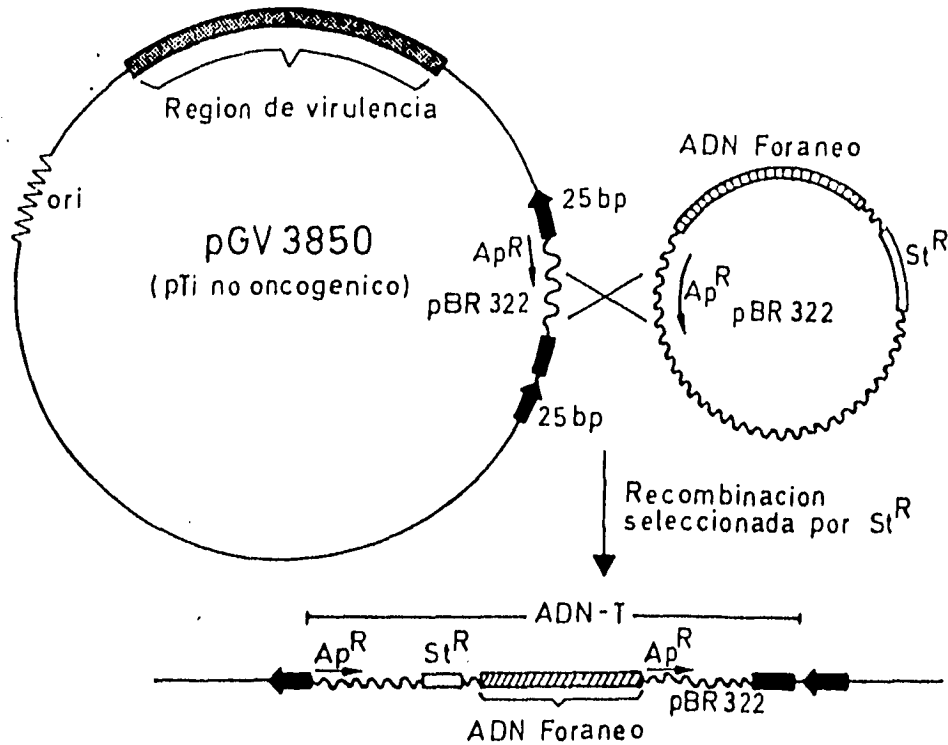
Poco después de la aparición de los vectores cointegrativos, se desarrolló una nueva línea de vehículos no-oncogénicos. En estos, la inserción de secuencias exógenas en el T-DNA no depende de eventos de recombinación homóloga. El sistema se derivó de la observación de que el T-DNA no requiere estar físicamente unido a la región *vir* del plásmido Ti para ser transferido eficientemente a las plantas. Cualquier segmento de DNA flanqueado por los bordes del T-DNA es transferido por *Agrobacterium* a las células vegetales, sin importar si dicha secuencia se localiza en un plásmido Ti o en uno totalmente distinto, e incluso si se encuentra en el cromosoma de la bacteria, siempre y cuando ésta posea genes *vir* funcionales.

Esta serie de vectores, colectivamente denominados binarios, consta de dos elementos: El primero es un plásmido Ti auxiliar, del que se ha eliminado la totalidad del T-DNA, incluidos los bordes; este plásmido aporta los productos de los genes *vir*, los cuales actúan en *trans* sobre el otro elemento. El segundo, es un plásmido de amplia gama de hospederos (el vector de clonación), que lleva genes marcadores para la selección e identificación de las células vegetales transformadas, además de uno o más marcadores de selección para bacterias y un adaptador con sitios de restricción para la inserción de las secuencias exógenas; todos estos elementos flanqueados por los bordes, derecho e izquierdo, del T-DNA dispuestos en la polaridad adecuada (figura 3 -tomada de 2).

En la actualidad, existe una gran variedad de vectores binarios, algunos de ellos diseñados para usos muy específicos. Entre las principales modificaciones que se le han hecho al esquema fundamental, se incluyen construcciones que permiten la transcripción divergente de dos genes de interés, los que se clonan bajo el control de un promotor dual derivado del T-DNA. Otros permiten transferir genotecas a células de plantas, con el fin de aislar clones que por ejemplo, complementen mutaciones específicas (como el

Sistemas derivados del plásmido Ti para la transferencia de genes.

A) RECOMBINACION HOMOLOGA



B) BINARIO Ó POR COMPLEMENTACION

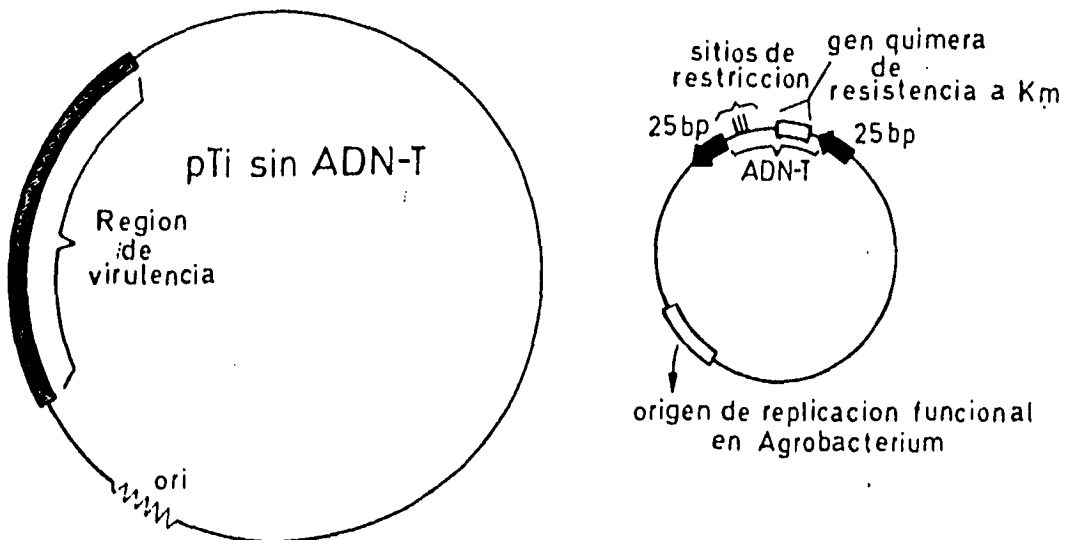


Fig. 3. Sistemas derivados del plásmido Ti para la transferencia de genes a plantas.

A. Vectores cointegrativos. pGV3850 es un derivado del plásmido Ti del cual se eliminaron los genes responsables de la formación de tumores, segmento de DNA que fue reemplazado por las secuencias del plásmido pBR322. El DNA pasajero que se desee transferir es primero clonado en un derivado de pBR322 con un gen de resistencia a antibióticos adicional a los ya presentes en dicho plásmido (St^R). Este vector se transfiere a *Agrobacterium* y los cointegrados en los que el DNA pasajero es parte del T-DNA, se obtienen como producto de la recombinación homóloga entre las secuencias del pBR322 presentes en pGV3850 y en el vector de clonación.

B. Sistema Binario. Este sistema está compuesto de un plásmido pequeño portador del T-DNA y un derivado no oncogénico del plásmido Ti. Al primer plásmido se le inserta el DNA pasajero en *E. coli* y después es transferido a *Agrobacterium*. Una vez en esta bacteria las funciones necesarias para la transferencia del T-DNA son suministradas por un derivado del plásmido Ti que contiene los genes de virulencia y carece del T-DNA.

pOCA18). Algunos más se han creado para el análisis de promotores, colocando adaptadores para clonación adyacentes a genes reporteros que carecen de las señales necesarias para su transcripción.

El sistema de vectores binarios posee varias ventajas sobre el de vectores de cointegración. La primera, tal vez la más importante, es la elevada eficiencia con que se introducen en *Agrobacterium* los plásmidos con las construcciones de interés, lo que contrasta con la baja frecuencia de formación de cointegrados. Otra conveniencia, es que permite construir plásmidos de tamaño relativamente pequeño, facilitando las manipulaciones previas al proceso de transferencia a las células vegetales.

GENES REPORTEROS (GUS)

La caracterización de las secuencias de DNA que determinan las propiedades reguladoras de los genes, se ha basado en la estrategia de construir genes quiméricos. En estos, un gen cuyo producto es fácil de detectar y cuantificar, y que no se encuentra normalmente en la planta (llamado gen "reportero"), se pone bajo el control de la secuencia reguladora que se pretende examinar. Estos genes híbridos son transferidos a células vegetales, de las que eventualmente se obtendrán plantas transgénicas. El patrón de expresión del gen reportero, ya sea acorde con los tejidos o con condiciones ambientales específicas, revela las propiedades reguladoras de las secuencias empleadas para dirigir su expresión.

Los genes de la cloranfenicol-acetil-transferasa de *Tn9*, y de la neomicina-fosfotransferasa de *Tn5*, fueron los genes reporteros que se utilizaron más frecuentemente en los primeros trabajos de este campo. En los últimos años, sin embargo, han sido reemplazados por otros genes cuya detección es técnicamente más sencilla, y su nivel de expresión es susceptible de ser cuantificado de modo muy preciso. Entre estos nuevos genes reporteros destacan el de la β -glucoronidasa de *E. coli* (GUS) y el de la luciferasa, tanto derivada de luciérnagas, como de bacterias (por ejemplo, *Vibrio harveyi*). La expresión de GUS puede ser evaluada cuantitativamente en ensayos fluorométricos, aún con muy poco material vegetal transformado (del orden de miligramos).

GUS tiene un peso monomérico de aproximadamente 68,200 daltons. El comportamiento de la enzima nativa indica que probablemente se trata de un tetramero. Se ha demostrado que es muy estable; tolera por ejemplo, muchos detergentes. Es más activa en presencia de algunos agentes reductivos, como el β -mercaptoetanol o el DTT. No tiene ni cofactores, ni ningún requerimiento iónico, aunque como se inhibe con algunos iones metálicos divalentes pesados (Cu^{2+} y Zn^{2+}) es conveniente incluir EDTA en los

ensayos. Es posible hacer ensayos de glucoronidasa a cualquier pH fisiológico, con un óptimo entre 5.2 y 8.0. La enzima se inactiva en un 50% a un pH de 4.3. Así mismo, GUS es relativamente resistente a la inactivación térmica; tiene una vida media de dos horas a 55 C.

La detección de la actividad de la β -glucoronidasa de *E. coli*, depende de la disponibilidad de sus substratos. Cuando la enzima actúa sobre estos, se libera un producto claramente identificable. Para lograr una sensibilidad máxima en la detección de una enzima, se requiere que su substrato presente varias características: 1) Debe originar un producto que se pueda detectar muy específicamente. 2) El substrato tiene que ser exclusivo de la enzima que se está estudiando. Y 3) El "ruido" que ocasione en el método de detección, debe de ser mínimo. Los substratos que mejor se apegan a estas características en el caso de GUS, son los fluorógenos, como el 4-metilumbeliferil glucoronido (MUG). El uso de medidas de fluorescencia para detectar actividad enzimática, usualmente permite una sensibilidad de dos a cuatro órdenes de magnitud mayor que los procedimientos basados en la determinación espectrofotométrica del producto por absorción.

GAMA DE HOSPEDEROS DE *A. tumefaciens*

El sistema de transformación de células vegetales basado en *A. tumefaciens*, ha sido aplicado con éxito en un gran número de plantas dicotiledóneas, como tomate, papa, petunia, soja, zanahoria, lino, algodón y otras. Sin embargo, los esfuerzos para transformar cereales y otras variedades de importancia agrícola, han tenido poco éxito. Esto se interpretó inicialmente como la consecuencia de una presunta incapacidad de *Agrobacterium* para transferir el T-DNA a especies que no son sus hospederos naturales. Sin embargo, hubo experimentos en los que DNA viral integrado al T-DNA se transfirió eficientemente por *Agrobacterium* a células de maíz (Agroinfección), según se infiere del desarrollo de infección viral sistémica en las plantas regeneradas; lo cual demuestra que la limitación para que este sistema funcione en cereales, no reside en el proceso de transferencia del T-DNA.

Potrykus (9) ha sugerido que el punto crítico para que una especie o variedad se pueda transformar eficientemente mediante *Agrobacterium*, es el tipo de respuesta a herida que presente la planta. Así, algunas monocotiledóneas con respuesta típica (proliferación y desdiferenciación de células en la región dañada), como *Asparagus*, pueden transformarse con *Agrobacterium* de manera similar a las dicotiledóneas que normalmente tienen este tipo de respuesta; e inversamente, las dicotiledóneas que

presentan necrosis celular en la zona herida, como ocurre en el caso de los cereales, son probablemente tan difíciles de transformar como estos últimos. Esta explicación parece plausible, y además plantea la posibilidad de hacer más eficiente la interacción de cereales con *Agrobacterium*, a través de la suplementación o reestructuración de la respuesta a herida de estas plantas.

No obstante las grandes dificultades que se han encontrado para aplicar el sistema basado en *Agrobacterium* a la transformación de algunas variedades importantes, este sigue siendo el método más ampliamente utilizado en la transferencia de información genética exógena a plantas, por la sencillez de los protocolos de transformación y selección que se siguen, y porque las elevadas eficiencias alcanzadas son superiores a las obtenidas con otras técnicas (que se explican más adelante). La capacidad de *Agrobacterium* para transformar explantes vegetales, aunada a una inmediata selección y regeneración de las células modificadas, permite obtener plantas transgénicas en periodos cortos de cultivo. Esto ha favorecido su uso como método estándar en la generación de plantas transgénicas destinadas a estudios de regulación génica. Otra ventaja adicional, y muy importante, de este sistema, es que al transferir un segmento de DNA bien definido (el T-DNA o su equivalente), se garantiza que los genes no seleccionables se integren intactos, lo que no siempre ocurre con otras técnicas de transformación.

MÉTODOS PARA TRANSFORMAR PLANTAS BASADOS EN LA TRANSFERENCIA DIRECTA DE GENES

Las dificultades encontradas para transformar cereales y otras variedades de importancia agrícola mediante *Agrobacterium*, fueron, y siguen siendo, el motivo principal para desarrollar métodos alternativos de transferencia de genes a plantas.

El común denominador de las técnicas de transferencia directa de genes, es que precinden de un sistema biológico (virus, *Agrobacterium*) para introducir información genética exógena a las células vegetales. Esto se logra por medio de procedimientos de naturaleza química o física. Aunque hay estrategias como la fusión de liposomas o protoplastos, la microinyección, y la técnica de transformación por microproyectiles, que son sin duda métodos de transferencia directa de genes, se ha acostumbrado limitar la aplicación de este concepto a los procesos de transformación mediada químicamente y a la electroporación de protoplastos (células vegetales aisladas y desprovistas de pared celular).

Los protoplastos son entidades teóricamente ideales para la transferencia de genes, por varias razones: 1) los procedimientos enzimáticos o mecánicos que se emplean para aislarlos, inducen la

respuesta a herida, lo cual determina un aumento en la proporción de células competentes. 2) las moléculas de DNA exógenas tienen acceso a todas las células, incrementando la posibilidad de que haya más eventos de transformación en una población dada. 3) la incorporación del DNA a los protoplastos es un proceso fundamentalmente físico, y por lo tanto, en principio cualquier especie vegetal puede ser transformada por este método. Pese a estas ventajas, usar protoplastos en experimentos de transformación conlleva varias dificultades, incluida la de su manejo, que resulta normalmente problemático. Destacan las concernientes a la regeneración de plantas a partir de los protoplastos. Esta regeneración exige el establecimiento de un sistema de cultivo *in vitro*, que permita una embriogénesis u organogénesis, para cada variedad vegetal en particular. Esto es, las generalidades y pautas que hay para regenerar plantas en un experimento de transformación de protoplastos, suelen ser insuficientes cuando uno se enfrenta a una variedad nueva.

Biolística o técnica de bombardeo de microproyectiles

La aceleración de micropartículas pesadas cubiertas con DNA, se ha convertido en una técnica que permite introducir genes a virtualmente cualquier tipo de célula o tejido vegetal. No había habido desde los inicios de la transformación por *Agrobacterium*, ningún otro sistema de transferencia de genes que despertara tanto entusiasmo, y en ningún otro se ha invertido tal cantidad de esfuerzos. Hubo quienes supusieron que este método iba a resolver todos los problemas para transformar plantas. En efecto, la biolística tiene múltiples ventajas y potencial para aplicaciones generales. Entre lo más relevante está:

- Los procedimientos de manipulación que involucra son sencillos.
- Un solo disparo puede alcanzar numerosos puntos (introducir genes a muchas células).
- Las células sobreviven a la entrada de partículas.
- La cubierta de DNA de las partículas tiene actividad biológica.
- Las células que se usan como blanco pueden ser muy variadas, como polen, células en cultivo, células de tejidos diferenciados, meristemas, etc. De hecho, el método biolístico podría ser lo más cercano a un mecanismo "universal" de transferencia de genes. Se ha utilizado para introducir DNA exógeno funcional no solamente a plantas, sino a una gran variedad de organismos: bacterias, algas, hongos, células animales, e incluso animales intactos.
- La introducción del DNA puede dirigirse tanto a la superficie, como a las capas internas de los diferentes órganos o tejidos.
- El método depende solamente de parámetros físicos.
- Este mecanismo permite introducir genes en casi cualquier posición que se encuentre la planta, con muy poco esfuerzo manual.

La enorme inversión en esta técnica ha sido recompensada, y se han obtenido plantas transgénicas que difícilmente se hubieran logrado con otros procedimientos. (Cabe preguntarse si con una inversión similar, también los otros métodos hubieran tenido éxito).

Las primeras plantas de soya transgénicas se reportaron simultáneamente obtenidas por *Agrobacterium* y por biolística; sin embargo, ahora la biolística se ha convertido en una técnica más exitosa que el uso de *Agrobacterium* para transformar este cultivo. Lo verdaderamente relevante de la biolística surgió cuando tres laboratorios independientes, lograron obtener plantas de maíz transgénico fértiles por este método. Este triunfo con maíz garantiza que continuarán las inversiones en esta técnica. No obstante, queda una interesante pregunta: ¿Por qué, existiendo todas las ventajas ya mencionadas, este procedimiento es tan ineficiente para producir eventos de integración estables, especialmente en los sistemas experimentales, casi ideales, donde se ha usado (como por ejemplo, suspensiones embriogénicas)? Si se compara el número de plantas de maíz transgénicas fértiles, obtenidas por biolística en experimentos a gran escala usando suspensiones embriogénicas, con aquellas obtenidas a partir de experimentos equivalentes a pequeña escala, basados en transferencia directa de genes a protoplastos aislados de las mismas suspensiones embriogénicas, resulta sorprendente el bajo rendimiento de los experimentos biolísticos. Esto hace pensar que probablemente, las plantas que son difíciles de transformar mediante *Agrobacterium* tienen muy pocas células competentes; las partículas tienen que alcanzar a esas escasas células por impactos aleatorios, y luego el DNA se tiene que integrar al genoma de estas células. Considerando la baja conversión de eventos transitorios (alcances) en eventos de integración estable, es de esperar que la transformación integrativa en plantas recalcitrantes sea más bien rara. Parece ser que la verdadera ventaja de la biolística reside en su aplicación en experimentos donde se desea expresión transitoria (donde, pese a que los genes introducidos no se integran al DNA cromosomal, se expresan específicamente durante un lapso de unos días) en tejidos diferenciados. En este punto la técnica tiene pocos competidores.

Microinyección en proembriones cigóticos y derivados de microsporas

La microinyección consiste en usar microcapilares y recursos de microscopía para introducir DNA en células determinadas, de forma tal, que las células inyectadas puedan sobrevivir y proliferar posteriormente. Esta técnica ha producido clones transgénicos usando protoplastos, y quimeras transgénicas partiendo de proembriones de colza. Así como con la biolística, con la microinyección definitivamente es posible introducir DNA en células vegetales con pared. Si se compara con la biolística, la microinyección presenta desventajas: solo una célula recibe DNA por cada inyección, y la manipulación

requiere de una mayor destreza y equipo. Pero por otro lado, también tiene ventajas:

- La cantidad de DNA introducido puede controlarse.
- Se puede decidir en qué célula depositar el DNA.
- La introducción es precisa y predecible, aún dentro del núcleo celular, y está bajo control visual.
- Las células de estructuras pequeñas (p. ej. microsporas o proembriones de pocas células), de las que no se dispone en las grandes cantidades necesarias para la biolística, pueden ser blancos precisos.
- Las células microinyectadas definidas se pueden microcultivar.
- En combinación con protocolos para cultivo de proembriones cigóticos, la microinyección podría ofrecer una forma de transformación abierta a todas las especies y variedades con propagación sexual.

Asumiendo que los proembriones cigóticos de pocas células contienen células competentes, se ha establecido la regeneración de plantas partiendo de proembriones cigóticos de maíz (*Zea mays*), trigo (*Triticum aestivum*), arroz (*Oryza sativa*), cebada (*Hordeum vulgare*), soja (*Glycine max*), algodón (*Gossypium hybrid*), girasol (*Helianthus annuus*), tabaco (*Nicotiana tabacum*) y *Arabidopsis thaliana*). Después de múltiples microinyecciones con genes marcadores, se analizaron quimeras putativas transgénicas primarias y a su descendencia sexual, para ver si los genes exógenos estaban presentes. Lo único que se encontró fueron indicios de quimeras transgénicas. Y, al no haber pruebas de descendencia transgénica, estos pueden ser artefactos. La transferencia de genes a estructuras consistentes de más de una célula, pueden cuando más, producir quimeras transgénicas. Por lo tanto, hay dos interpretaciones posibles: (a) es necesario hacer experimentos a mayor escala para incrementar la posibilidad de transmitir los genes exógenos a la descendencia (como se vió en el método biolístico), o (b) las células meristemáticas son poco competentes para la transformación integrativa. Para probar la segunda hipótesis, se diseñó y realizó un experimento en el que se usó el ya bien establecido sistema para transferir genes mediante *Agrobacterium* y proembriones cigóticos de *N. tabacum* var. SR1, un modelo bien documentado de transformación por *Agrobacterium*. No se pudo detectar ningún tejido transgénico, ni en los regenerantes primarios, ni en la descendencia sexual. Los datos mencionados acerca de la microinyección en proembriones, los resultados del experimento que se acaba de describir, las dificultades para transformar cultivos embriogénicos y meristemas con el método biolístico (las sojas transgénicas no surgieron de células meristemáticas, sino de células diferenciadas subyacentes a los meristemas donde se desarrollan brotes adventicios), la experiencia negativa al usar *Agrobacterium* con células meristemáticas en general, y el bien conocido fenómeno de exclusión viral de los meristemas, -todo esto- apunta a un problema biológico que bien merece la pena estudiar: ¿Tienen las células meristemáticas (o embrionarias) algún mecanismo que evita la integración de los ácidos nucleicos que les entren?

Cuatro de los métodos que se han presentado han probado poder producir plantas transgénicas (*Agrobacterium*, transferencia directa de genes a protoplastos, biolística y microinyección), y otros dos no lo han hecho (la agroinfección y los vectores virales). Una diferencia clave entre estos dos grupos es la concierne a la pared celular. *Agrobacterium* usa un mecanismo biológico, aún no bien conocido, para superar la barrera de la pared; a los protoplastos se les ha desprovisto de su pared celular; la biolística y la microinyección aplican la fuerza bruta; y los vectores virales emplean la amplificación de eventos raros.

Los siguientes métodos (hasta ahora infructuosos) conflan en que haya un movimiento libre de genes a través de la pared celular.

¿Paso libre de genes a través de la pared celular?

El diseño experimental de los métodos para transferencia génica que se discutirán ahora, requiere el libre movimiento de grandes moléculas de DNA a través de una, varias, o muchas, paredes celulares para lograr la transformación de las células blanco. La factibilidad de este movimiento determina el potencial de la mayoría de las siguientes formas de abordar el problema de la transformación de plantas. De momento, ninguno de estos intentos ha demostrado poder producir ni una sola planta transgénica. En este contexto, hay una publicación sobre expresión transitoria de genes marcadores en tejidos de arroz (*Oryza sativa*), a continuación de una electroporación de rebanadas de tejido de plántulas, que reviste una importancia crucial. Usando los genes de GUS y NPTII bajo señales de expresión constitutivas y tejido-específicas, los autores describen datos de expresión transitoria de genes exógenos dentro del tejido del arroz, que convencen aún a los lectores más críticos. Si la interpretación de los datos en esta publicación es correcta, entonces los genes funcionales son capaces de viajar activamente, sin problemas, a través de muchas paredes celulares. Llama especialmente la atención como, incluso la expresión del gen GUS, se distribuyó sobre todo el corte transversal, y lo bien que encaja la expresión órgano-específica con lo que se esperaba. Se asume que los genes llegan a todas las células del tejido por igual. Sin embargo, debido a (a) cientos de experimentos que han fallado cuando se trata de transportar genes a través de la pared celular, (b) el problema teórico de explicar cómo unos genes enteros pueden cruzar la barrera física que presentan las paredes celulares, (c) el hecho de que las fibrillas de celulosa son adsorbentes eficaces de DNA, (d) que se sabe que la electroporación no mueve el DNA, sino solo abre poros en las membranas, y (e) el hecho de que no hay siquiera un gradiente en los datos experimentales, es difícil entender la interpretación de estos datos; tal vez pueda haber una hipótesis alternativa a la que se adapten mejor.

Se propone la siguiente interpretación: En el sistema experimental que se usó, el DNA se transfirió no a células con pared, sino a protoplastos en células abiertas que habla en la superficie del corte. (El corte

de tejido plasmolisado en células elongadas fué una técnica común a finales del siglo XIX y principios del XX para obtener protoplastos) Si este fuera el caso, la tinción de GUS difundiría hacia las células vecinas y se transportaría grandes distancias a lo largo de los haces vasculares. El examen histológico a diferentes distancias de la superficie tratada, imitaría una expresión constitutiva u órgano-específica. La respuesta de este sistema ante los intentos de mejorar el protocolo de electroporación, sería (y fué) idéntica a la respuesta de una población de protoplastos. De momento, sin más experimentos, no se puede decidir cual interpretación de los datos es la correcta.

Incubación de semillas secas o embriones en DNA

Mientras en el protocolo experimental anterior uno podría imaginar incluso la obtención de clones celulares transgénicos (a partir de los protoplastos en células abiertas), esto es difícil de concebir en los siguientes métodos, a menos que el DNA se mueva libremente intra e intercelularmente. Distintos autores describen experimentos en los cuales tomaron todas las precauciones para evitar los riesgos de los reportes anteriores. La incubación de semillas secas y embriones (de cereales y leguminosas) en DNA viral o no viral, produjo una evidencia interesante acerca de la expresión y recombinación génica. Aunque los experimentos incluyeron controles convincentes y demostraron claramente la presencia y expresión de genes marcadores definidos, así como la replicación del DNA viral modificado, no dan ninguna prueba de transformación integrativa. La conclusión de los autores es que los datos demuestran la inclusión del DNA exógeno dentro de las células del embrión y por lo tanto, este método tiene potencial para la obtención de leguminosas y cereales transgénicos. Probablemente esto es demasiado optimista. Si se presume que la pared celular no plantea problema alguno, estos experimentos deberían (y sin embargo no lo hacen) producir plantas transgénicas. Si se supone que la pared celular es un problema, es difícil imaginar como el DNA podría alcanzar aquellas células meristemáticas que van a formar la nueva planta. Además, los datos se pueden explicar sin la necesidad de un transporte masivo de DNA a través de la pared celular: Los embriones secos fueron escindidos del endospermo, creando una herida gigante a lo largo del escutelo. Como estos tejidos están secos, el contenido celular no se sale. La incubación en soluciones de DNA podría estar creando un microambiente en las células abiertas, que permitiera una transcripción, traducción y replicación *in vitro*. Los experimentos que se hagan en el futuro demostrarán qué hipótesis es la correcta.

Incubación de tejidos turgentes o cultivos celulares en DNA

Durante un periodo de más de veinte años, se han puesto plántulas, órganos, explantes, cultivos celulares y células, en contacto con DNA y genes marcadores definidos, con la esperanza de que haya

transformación. Han sido incluidos diseños experimentales donde los plasmodesmas han estado abiertos o las estructuras de la pared celular han sido aflojadas, así como tratamientos asegurando la presencia de células competentes potenciales a alta frecuencia. Pese a todo esto, aún en los experimentos donde se hubieran podido detectar eventos extremadamente escasos, no se ha demostrado ni un solo caso de transformación integrativa. Los experimentos basados en el paso de genes funcionales a través de las paredes celulares tienen, obviamente, muy pocas oportunidades de tener éxito. Las paredes celulares no constituyen solamente barreras eficaces, también son magníficas trampas para las moléculas de DNA. Sería francamente sorprendente que un DNA pudiera atravesarlas eficientemente.

Transformación de polen

Este método, bajo desafío experimental desde el principio de los 70s, se basa en la esperanza de que el DNA sea tomado por el polen germinando y pueda, ya sea integrarse en el núcleo espermático, o alcanzar la oosfera con el tubo polínico. En efecto, esto sería el método ideal para transferir genes a plantas. Aunque se han obtenido sorprendentes fenotipos, que podrían ser interpretados como una evidencia indicativa de transferencia génica, en ningún caso se han dado pruebas contundentes. Como los numerosos experimentos a gran escala en laboratorios experimentados, y con genes marcadores definidos, solamente han dado resultados negativos, este método no parece ser prometedor. No solamente la pared celular, también las nucleasas externas e internas, y el estado de la heterocromatina en la célula receptora, presentan problemas para esta técnica. Estos últimos problemas se podrían superar con una estrategia para la "maduración *in vitro*"; donde las microsporas inmaduras se trataran con el DNA, madurarán hasta convertirse en polen, y se usaran para la polinización.

Ruta del tubo polínico

Si fuera posible depositar DNA en el cigoto por la vía de tubos polínicos abiertos, esto sería un método muy atractivo. Desafortunadamente, en una publicación donde dan datos fenotípicos y moleculares de plantas de arroz transgénicas, no se presentan las pruebas. Los datos de los Southern no muestran ni una integración en DNA de alto peso molecular, ni fragmentos híbridos definidos, con lo cual, pueden ser entendidos como artefactos; la técnica de "dot-blot" que se usó es propensa a artefactos, y los datos enzimáticos no son confiables porque los cereales tienen un registro rico en falsos positivos con el ensayo que se empleó. Es también difícil entender cómo el DNA aplicado al pistilo cortado, alcanza al cigoto: Los tubos polínicos no son tubos abiertos, sino están sellados con tapones de callosa; el DNA sería atrapado en el material de la pared celular; probablemente hay nucleasas en el tubo polínico y en las sinérgidas. A

pesar de todo, el método es suficientemente atractivo como para que merezca la pena hacerle una prueba rigurosa. Considerar la posibilidad de transformación de endofitos contaminados podría ayudar a excluir esta posible fuente de artefactos en experimentos futuros.

Macroinyección

El uso de agujas para inyectar, con diámetros mayores que el diámetro celular, destruye a las células donde se reparte el DNA. Es por esto, que la integración del DNA a las células, requiere que este se mueva a las células adyacentes a la herida. Esto no es posible mediante los plasmodesmas, dado el tamaño de las moléculas de DNA y porque los plasmodesmas se sellan inmediatamente cuando hay herida; tampoco se puede a través de las paredes celulares. En el experimento que produjo no solamente cambios fenotípicos en la descendencia, sino también emocionantes datos moleculares, el DNA tendría que haber viajado a través de muchas capas de células. Se inyectó un gen marcador en el tallo, debajo del meristemo floral inmaduro de centeno (*Secale cereale*), para alcanzar el tejido esporógeno. La hibridación con el gen marcador y los ensayos enzimáticos con la descendencia sexual que sobrevivió a la selección, produjeron una fuerte evidencia indicativa, pero no hubo prueba de transformación. Desafortunadamente, hasta ahora no ha sido posible ni reproducir estos resultados en varios experimentos a gran escala con otros cereales, ni establecer una prueba con el material original. Este método probablemente tiene pocas oportunidades de éxito.

Electroporación

La descarga de un generador a través de una población celular produce una apertura transitoria en el plasmalema. Esta electroporación facilita la entrada de moléculas de DNA en las células, si el DNA está en contacto con las membranas. Para sistemas de protoplastos, la electroporación es una de las varias técnicas estándar para transformar rutinaria y eficientemente. Como en muchas especies de plantas es posible obtener regeneración de cultivos celulares y explantes de tejidos, pero no (aún) de protoplastos, ha sido importante probar si la electroporación puede transferir genes a células con pared. Una gran variedad de sistemas experimentales han sido desafiados, incluyendo tubos polínicos germinando, cultivos en suspensión y explantes. Hubo cambios fenotípicos interesantes, pero no se obtuvo ninguna prueba de transformación.

Electroforesis

En contraste con la electroporación, en la electroforesis se puede esperar transporte de DNA. Se

realizó una serie de experimentos usando meristemos de la parte aérea de semillas de cebada, para probar si la electroforesis a través del tejido podría transportar genes dentro de las células. Los datos obtenidos incluyeron paredes celulares radiactivas (cuando se había usado DNA marcado), análisis de GUS positivos, y una banda de proteína en "SDS-PAGE" con movilidad de GUS. No hubo prueba de transformación integrativa y los datos pueden interpretarse como artefactos. Merecería la pena probar esta idea con un sistema experimental más simple, que pudiera dar respuestas bien claras. Uno asume, sin embargo, que incluso la electroforesis no puede salvar la barrera de la pared celular.

Fusión de liposomas

La fusión de liposomas conteniendo DNA es una técnica conocida para producir plantas transgénicas. No tiene una ventaja obvia sobre los métodos más simples de transferencia génica directa, y no se usa mucho. Los liposomas conteniendo DNA también se han aplicado a varios tejidos, cultivos celulares, y tubos polínicos, con la suposición de que los liposomas pueden ayudar a transportar el DNA vía plasmodesmas o directamente a través de las paredes celulares. Se ha mostrado que los liposomas pueden acarrear pequeñas moléculas teñidas dentro de las células en los tejidos mediante la fusión con los plasmodesmas, pero no hay pruebas de transporte e integración de genes marcadores. Como los plasmodesmas se sellan inmediatamente ante una herida, esta ruta no está abierta incluso a los liposomas más pequeños; impregnar las paredes celulares con fosfolípidos tampoco parece cambiar su función como barreras.

Inyección de liposomas

La microinyección en células diferenciadas puede fácilmente depositar el DNA en la vacuola, donde es degradado. La microinyección de liposomas en la vacuola, sin embargo, puede conducir a su fusión con el tonoplasto, y así liberar el contenido del liposoma en el citoplasma, como se demostró con tinciones fluorescentes que activaban el citoplasma. Explorar esta situación para transformar células vacuoladas fue una idea elegante. Desafortunadamente, la actividad del DNA depositado con este método todavía no se ha mostrado. Por lo que a pesar de su elegancia, este mecanismo probablemente no tenga ventajas sobre la microinyección directa, especialmente para la transformación de plantas recalcitrantes, porque estas probablemente tengan que ser regeneradas de células meristemáticas, las cuales no contienen grandes vacuolas centrales.

Microlaser

Un haz de microlaser enfocado en el campo de un microscopio, puede usarse para hacer hoyos en paredes y membranas celulares. Se esperaba que la incubación de las células perforadas en soluciones de DNA pudiera servir como una base para la transferencia de genes independientes de vectores, al interior de células con pared. No hay datos conclusivos disponibles acerca de la introducción del DNA, y hay problemas con la absorción del DNA en el material de la pared celular, aún antes de que pudiera ser introducido. Como la microinyección y la biolística definitivamente transportan DNA al interior de las células vegetales con pared, el microlaser ofrecería ventajas solo en casos muy específicos donde estas otras técnicas no fueran aplicables.

EL FRIJOL

El frijol común que se consume en México lleva por nombre científico *Phaseolus vulgaris L.* (Fabaceae).

El género *Phaseolus* tiene más de 180 especies, de las cuales 126 se originaron en América, 54 en Asia y el este de África, 2 en Australia, y una en Europa. México es el centro de la diversidad con 70 especies. El área de mayor diversidad es un cinturón que recorre el oeste de México y de Guatemala. En esta región, las plantas de frijol crecen espontáneamente como especies silvestres (*P. vulgaris ssp aborigineus*). Frecuentemente utilizan Teosinte como soporte natural. En cuanto a su consumo por humanos, se han encontrado restos arqueológicos de frijol cerca de un asentamiento de hace aproximadamente 7000 años. Mientras hay evidencia documentada acerca de cambios evolutivos naturales en maíz, para frijol no existe ninguna. Las variedades domésticas tienen semillas más grandes, vainas más largas, tallos más gruesos, y hábitos tanto arbustivos como trepadores (Kaplan, 1965).

El frijol común fue introducido en Europa durante el siglo XVI, por españoles y portugueses. No llegó a Inglaterra sino hasta 1954. Los españoles también lo llevaron a África y otros lugares de "Viejo Mundo". Actualmente, se cultiva ampliamente en muchos países. Hay al menos nueve especies de importancia económica. Las naciones en vías de desarrollo son las principales productoras de frijol seco, mientras que los países desarrollados producen más bien ejotes. Los frijoles se suelen diferenciar entre sí por las características de la semilla, como su color, tamaño y forma.

La semilla de frijol es una excelente fuente de proteínas; tiene un 22-23% de contenido protéico, y ya

se han desarrollado algunos hasta con un 30%. El porcentaje de proteínas varía con el cultivar, el tiempo de siembra y cosecha, la disponibilidad de nitrógeno en el suelo, e incluso la cosecha específica. Sin embargo, la proteína de frijol generalmente tiene un bajo contenido de metionina y cisteína, por lo que las dietas basadas en este cultivo tienen que complementarse con otros productos (como carne, leche, huevos y cereales) para proveer una alimentación balanceada. Además, los frijoles secos contienen sustancias tóxicas que se inactivan solo parcialmente durante la cocción, y otros de sus compuestos ocasionan flatulencia y reducen la digestibilidad de proteínas. Una de las metas principales en los programas de mejoramiento es justamente evitar estos efectos. Otros de los compuestos principales de la semilla de frijol son: carbohidratos (58%), grasa (1.6%), fibra (4%) y ceniza (3.5%). Los frijoles además, son una buena fuente de tiamina y niacina, pero son bajos en riboflavina y muy bajos en vitamina A, C y B12.

En varios países de América y Europa se han hecho grandes esfuerzos en el mejoramiento del frijol, tanto como semilla, como ejote. *P. vulgaris* es una planta autofértil, autógama, con menos de 1% de entrecruzamiento, por lo que la mayoría de los programas pretenden obtener líneas puras. Esto no es tan difícil, si se considera que su ciclo reproductivo es relativamente corto. En solo un año se pueden evaluar hasta cuatro generaciones. Sin embargo, tiene un bajo coeficiente de multiplicación, lo que ha conducido a los mejoradores a trabajar con progenies pequeñas; un factor que retrasa el desarrollo de nuevas variedades. Algo interesante es que, a pesar de las barreras de hibridación, se han reportado crecimiento y fertilidad normales en las progenies de híbridos interespecíficos; incluso entre especies de *Phaseolus* del Viejo y Nuevo Mundo. Mediante técnicas de mutagénesis se han conseguido algunos logros para mejorar el frijol. Usando rayos gamma se aislaron líneas con mayor rendimiento de semillas y de proteínas. Usando neutrones se ha incrementado el tamaño de la semilla. También por irradiación se han obtenido mutantes enanos, variantes en el color de la testa, vainas con más granos, mutantes de hojas, y mutantes con resistencia a virus.

Algunos de los objetivos principales en los programas de mejoramiento son:

- Mejorar el rendimiento en el campo.- Los mejores rendimientos obtenidos con los cultivares actuales, son relativamente bajos cuando se comparan con los de la mayoría de las otras plantas cultivables. Se cree que en esto intervienen múltiples características tanto fisiológicas como morfológicas de la planta.
- Incrementar la cantidad y calidad de proteína.- Hay tres aspectos relacionados con las proteínas que se pueden mejorar: contenido por semilla (si se combinara un alto rendimiento en campo con un alto contenido proteico en la semilla, como consecuencia también mejoraría la producción de proteína por unidad de área), perfil de aminoácidos, y digestibilidad. No existe una sola proteína de un solo vegetal, que sea capaz de suministrar todos los aminoácidos en la concentración adecuada para la dieta humana.

Afortunadamente no todas las plantas son deficientes para los mismos aminoácidos, por lo que la mezcla de distintas plantas si puede alcanzar una composición balanceada. En las culturas vegetarianas, o donde la carne es muy escasa, predominan las mezclas de cereales y leguminosas. Bressani (1975 -citado en 1) creció ratas con unas dietas que contenían proteína derivada de maíz y de frijol, en distintas proporciones. Y encontró que el valor protéico máximo se alcanzaba cuando el 50% de la proteína de la dieta se derivaba de frijol, y el 50% de maíz; correspondiendo a una proporción maíz-frijol de 2.6:1. La lisina es el aminoácido limitante en el maíz, así como la metionina lo es en el frijol. Se estima que los frijoles necesitarían el doble de su contenido de triptofano y tres veces más el de aminoácidos sulfurados para poder suministrar hasta un 24% de la proteína necesaria en una dieta.

- Reducir los factores antinutricionales.- Los frijoles contienen un gran número de factores antinutricionales, como hemaglutininas, inhibidores de tripsina, inhibidores de proteasas, inhibidores de amilasas, constituyentes que unen metales, factores de flatulencia insolubles en alcohol, glicósidos cianogénicos, factores antivitaminicos y otros inhibidores del crecimiento no identificados. La cocción y otros procedimientos destruyen efectivamente la mayoría de los compuestos tóxicos. Sin embargo, los programas para mejorar el valor nutritivo deben de tomar en cuenta algunos factores que afectan la digestibilidad y los constituyentes tóxicos. A menudo no toda la hemaglutinina presente en frijoles y harina de cereales se destruye con el calor. Esto puede ocasionar diarreas y otros síntomas de toxicidad en algunas de las personas que los consumen. Todas las hemaglutininas del frijol son glicoproteínas, de diferentes pesos moleculares y componentes de azúcar. Hamblin y Kent (1973 -citado en 1) sugieren que juegan un papel en la unión de *Rhizobium* a la raíz, en los sitios donde se da la infección por esta bacteria. Respecto a los constituyentes que se unen a metales, estos ocasionan una reducción en algunos metales traza, como zinc, manganeso, cobre y hierro. Por ejemplo, el ácido fítico, que puede interferir con la absorción de hierro y el factor que produce flatulencia, no se destruye con el calentamiento. Se cree que algunos frijoles crudos contienen un antagonista de la vitamina E, un exceso del cual ocasiona necrosis de hígado en ratas, y distrofia muscular en pollos. Esta acción antivitaminica E se elimina solo parcialmente en la cocción. De hecho, aún cuando los frijoles estén bien cocidos, se dan casos de intoxicación en personas sensibles que los comen. A pesar de los grandes esfuerzos que se han hecho en la investigación, muy poco es lo que se sabe respecto a los factores de flatulencia del frijol. Lo único claro es que están bajo control genético, luego existe la posibilidad de reducirlos mediante mejoramiento genético.

- Aumentar la resistencia a enfermedades e insectos.- Zaumeyer y Thomas (1957 -citado en 1) describen 38 enfermedades que atacan al frijol, tanto al grano como a la planta. De estas, 21 son causadas por hongos, 8 por bacterias, y 9 por virus. También las plagas (por nemátodos, insectos y arañas) que lo

afectan son numerosas. La gravedad de algunas patologías y el costo e ineficiencia de los controles químicos, han estimulado a los mejoradores a desarrollar variedades resistentes. Actualmente, para muchas de las enfermedades más importantes que afectan al frijol, se han encontrado especies no cultivadas e identificado colecciones resistentes; lo cual ofrece posibilidades de estudio desde numerosas perspectivas y con diversas estrategias.

LA RAÍZ- MERISTEMOS

A lo largo de la evolución natural las plantas se han desarrollado de tal forma que necesitan absorber suficiente agua y minerales disueltos en ella para poder sustentar sus funciones vitales. Para esto, en una gran parte de ellas se ha generado una superficie que crece bajo el substrato, denominada sistema radicular. Normalmente este sistema abarca un área considerable. Si uno midiera por ejemplo, el sistema radicular de una planta joven de centeno, de solo cuatro meses de edad, descubriría que tiene una superficie de más de 620 metros cuadrados - cerca de 130 veces más extensa que su parte aérea-. El sistema radicular penetra y se extiende bajo el suelo afianzando así a los órganos que crecen en la superficie. Las raíces de la zanahoria, de la remolacha, y muchas otras plantas, además son órganos de almacenamiento de nutrientes producidos en la fotosíntesis; algunos de los cuales se consumen ahí mismo, y otros pueden ser transportados posteriormente a otros sitios.

Durante su desarrollo, tanto en la raíz como en la parte aérea, el crecimiento de las plantas no se distribuye uniformemente a lo largo de todo su cuerpo, sino que se restringe a ciertas zonas que contienen células recientemente producidas por división celular. A estas zonas se les denomina meristemos. Es común confundir lo que es el crecimiento (en el sentido de un agrandamiento del tamaño) con lo que es la división celular en los meristemos. La división celular por sí misma no produce un incremento de la talla, son las células producidas por la división, las que se elongan y ocasionan el aumento de volumen. Hay dos zonas meristemáticas principales que se encuentran cerca de la punta de la raíz y de la de la parte aérea (ápices) respectivamente, otra en el cambium vascular, y otra justo por encima de los nodos en las plantas monocotiledoneas (meristemos intercalares). Los meristemos, tanto de la raíz como de la parte aérea, se forman durante el desarrollo embrionario, conforme se va formando la semilla, y se denominan meristemos primarios. El cambium vascular y las zonas meristemáticas de las hojas de los pastos no se distinguen sino hasta después de la germinación, por lo que se les llama meristemos secundarios.

Algunas estructuras vegetales son determinadas y otras indeterminadas. Una estructura determinada

crece hasta tener un cierto tamaño y luego se detiene, sobreviniendo eventualmente su senescencia y muerte. Las hojas, las flores y los frutos son buenos ejemplos de estructuras determinadas. La inmensa mayoría de los animales también crecen de manera determinada. Por otro lado, el tallo vegetativo y la raíz son estructuras indeterminadas. Estas crecen por medio de meristemas que continuamente se reponen a sí mismos, permaneciendo jóvenes. A un pino por ejemplo, que ha crecido durante 4000 años, puede cortársele un pedazo que contenga al meristemo; este trozo es capaz de echar raíces y producir otro árbol que a su vez viva otros 4000 años, y así sucesivamente. Esto es, las plantas se pueden clonar a partir de algunas de sus partes por separado. Algunos árboles frutales han sido propagados durante siglos, mediante fragmentos de sus tallos. Aunque los meristemas se pueden destruir, estos son potencialmente inmortales puesto que son indeterminados.

Una característica especial en las raíces, es que su crecimiento puede continuar mientras haya agua y nutrientes disponibles y la temperatura del suelo sea suficientemente alta. Hasta ahora no se conocen casos donde haya una dormancia tal y como se da en las partes aéreas.

En la gran mayoría de las especies, la germinación de las semillas empieza con la salida de la radícula (raíz embrionaria), no con la del epicotilo (parte aérea), a través de la cubierta. En algunas especies (por ejemplo *Pinus lambertiana*) hay citoquinesis en la radícula antes de que se complete la germinación. En otras (como maíz, cebada y lechuga) prácticamente no hay mitosis antes de que emerja la radícula. El crecimiento se origina por la elongación de las células que se formaron cuando se constituyó el embrión dentro de la planta madre. La continuación del crecimiento tanto de la raíz primaria de las plántulas, como de las raíces secundarias que se derivan de ella, requieren de la actividad de los meristemas apicales.

La figura 4 (tomada de 10) es un diagrama que muestra la estructura de una punta típica de raíz. Las células más viejas de la coña son las de su parte distal (la que se encuentra más lejos del punto de unión al resto de la planta). En una posición más proximal (más cercana al meristemo) están las células jóvenes, pues éstas están siendo formadas justo en el meristemo apical. La coña protege al meristemo mientras es “empujado” contra el suelo, a la vez que actúa como un punto de percepción de la gravedad. Además, secreta un “mucigel” rico en polisacáridos sobre la superficie externa, que puede servir para lubricar la raíz y que ésta se pueda deslizar a través del suelo. Esto requiere la actividad de las vesículas de Golgi. Conforme la raíz crece, el mucigel continúa cubriendo su superficie mientras madura. Este mucigel da abrigo a varios microorganismos y probablemente tiene influencia en la formación de micorrizas, nódulos y absorción de iones, mediante un mecanismo que aún se desconoce.

Las células producidas por la división en el meristemo apical, se desarrollan convirtiéndose en la

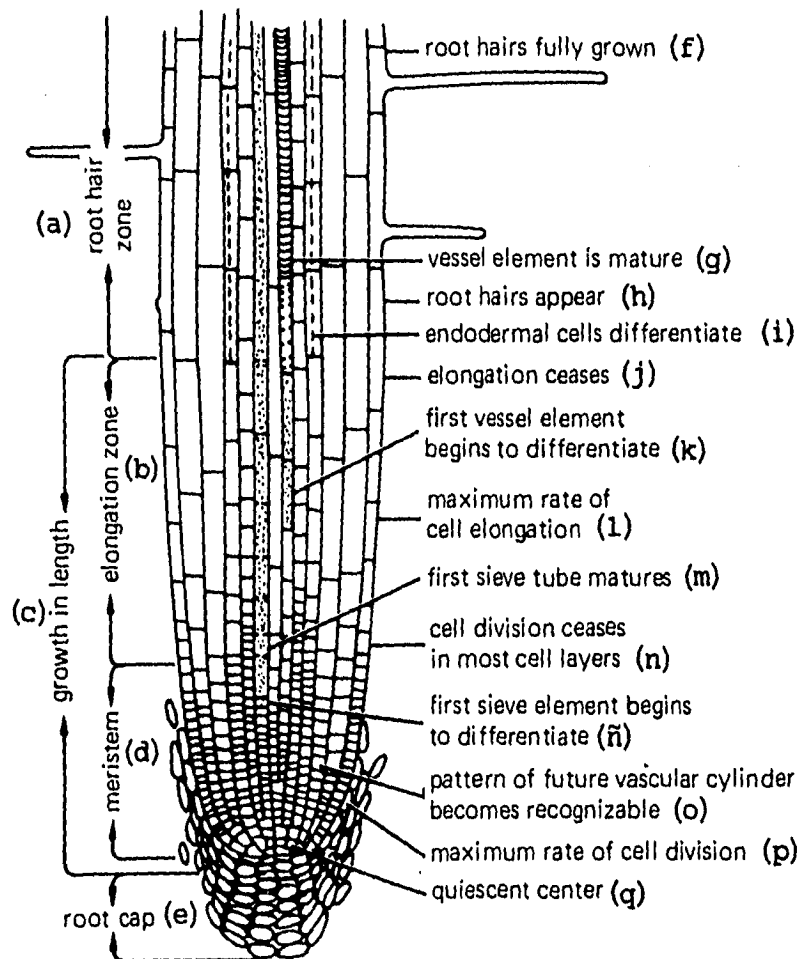


Fig. 4. Diagrama simplificado de un corte longitudinal de la zona de crecimiento de una raíz. El número de células en una raíz viva, es normalmente mucho mayor que el que muestra este diagrama. a: zona de pelos radiculares. b: zona de elongación. c: región donde se produce el aumento de longitud en la raíz. d: meristemo. e: cofia. f: el pelo radicular alcanza su tamaño final. g: los elementos de vaso están maduros. h: aparecen los pelos radiculares. i: las células del endodermio se diferencian. j: la elongación se detiene. k: los primeros elementos de vaso empiezan a diferenciarse. l: máxima tasa de elongación celular. m: los primeros tubos del floema en madurar. n: la división celular cesa en la mayoría de las capas celulares. ñ: se empiezan a diferenciar elementos del floema. o: es posible empezar a identificar el patrón de lo que será en cilindro vascular. p: máxima tasa de división celular. q: centro quiescente.

epidermis, el cortex, la endodermis, el periciclo, el floema y el xilema. Mediante técnicas de microscopía se ha visto dónde ocurre la división (dónde está el meristemo), ya que se observan células en cualquiera de los estados mitóticos. Otro método ingenioso es determinar en dónde se está sintetizando DNA, porque una duplicación del contenido de este normalmente significa que va a haber mitosis y citoquinesis.

Colindando con la cofia hay típicamente una pequeña zona llamada "centro quiescente", donde muy rara vez hay división celular. Si el meristemo o la cofia se dañan, el centro quiescente se vuelve activo y puede regenerar cualquiera de estas dos partes.

En cuanto a la formación de raíces laterales, estas se originan en el periciclo, usualmente opuestas a puntos de protóxilema, creciendo hacia fuera a través del cortex y la epidermis. Este crecimiento

probablemente involucra la secreción, por parte de la raíz lateral, de enzimas hidrolíticas que digieren las paredes del cortex y de la epidermis, aunque aparentemente, ninguna de las enzimas hidrolíticas postuladas ha sido identificada. Se sabe muy poco acerca de la formación de raíces laterales.

FIJACIÓN DEL NITRÓGENO

Hay temas de investigación en biología molecular de plantas que se verían altamente beneficiados si fuera posible transformar raíces de frijol. Uno de los más importantes es el de la relación entre esta planta y bacterias del género *Rhizobium*.

El nitrógeno es el cuarto elemento más abundante en la composición de los seres vivos, después del carbón, el oxígeno y el hidrógeno; es indispensable para la formación de proteínas, ácidos nucleicos y otras biomoléculas básicas. En la atmósfera el nitrógeno molecular (N_2) es el elemento más abundante (80%), sin embargo, no puede ser utilizado así por las plantas; es necesario que se reduzca a amonio (NH_4) o a nitratos (NO_3) para que se pueda aprovechar. Este tipo de compuestos se encuentran en el suelo solamente en pequeñas cantidades; fueron originados principalmente en la primitiva atmósfera reductora de la tierra, y en la actualidad solo se pueden producir por fenómenos naturales, como incendios, actividad volcánica o relámpagos. La mayor parte del nitrógeno que existe en los seres vivos proviene de un proceso de fijación de N_2 atmosférico en NH_4 , realizado por algunos organismos procariontes, que son los únicos capaces de llevarlo a cabo.

Entre los microorganismos denominados "fijadores de nitrógeno", se encuentran bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*, las cuales además, han desarrollado una estrategia evolutiva en que se asocian con plantas, en una relación simbiótica mutualista. Esto es, ambos miembros resultan beneficiados. La planta provee a la bacteria de nutrientes y de un microambiente adecuado, para su desarrollo y para una eficiente fijación del nitrógeno. A su vez, en este nicho la bacteria prolifera y reduce o fija nitrógeno atmosférico generando amonio, que es asimilado por la planta durante la formación de compuestos orgánicos.

El fenómeno de simbiosis mutualista entre bacterias fijadoras de nitrógeno y plantas de la familia Leguminosae, ha dado como resultado la creación de unas estructuras características, llamadas nódulos. Hay quienes consideran a estos, de hecho, como un órgano particular de la planta. Su desarrollo es un proceso altamente complejo; implica una diferenciación de las células involucradas. Tanto en la planta, como en la bacteria, se induce una expresión diferencial de genes, y como consecuencia hay cambios en el

patrón de las proteínas que se producen. Las nuevas proteínas que crea la planta se conocen como nodulinas, y las que sintetiza la bacteria, como bacteroidinas. Las nodulinas son, por definición, proteínas codificadas por la planta que se expresan solamente en los nódulos, y no en raíces no infectadas o en otras partes de la planta huésped.

Como consecuencia de la nodulación, las plantas que la presentan dejan de depender del nitrógeno presente en el suelo. Esto constituye una gran ventaja selectiva. Estas especies son las pioneras típicas en suelos con deficiencia de nitrógeno. Desde el punto de vista agrícola, son cultivos que no necesitan fertilizantes, y es más, pueden ser utilizados como “fertilizadores” naturales, en terrenos donde se practica la rotación de cultivos,

El desarrollo de los nódulos es un proceso que se caracteriza por un complejo intercambio de señales moleculares entre la bacteria y la planta. Ha sido descrito como “una secuencia en múltiples etapas de eventos interdependientes”. Se ha dedicado mucho esfuerzo a su estudio. El mecanismo fundamental se divide, a grandes rasgos, en tres pasos: i) preinfección o reconocimiento, ii) infección y organogénesis, y iii) funcionamiento del nódulo. Ya se ha logrado conocer varias características acerca de estos procesos, sin embargo aún quedan innumerables preguntas. Además de las consideraciones de tipo práctico, el estudio de la nodulación resulta muy atractivo en la investigación básica. En el proceso se dan varios fenómenos interesantes, entre los que destacan:

- a) El nódulo es un órgano que se origina en un meristemo completamente nuevo, inducido por *Rhizobium*. Es uno de los pocos eventos naturales de diferenciación celular en vegetales cuya inducción se puede controlar en condiciones experimentales.
- b) La relación simbiótica particular plantea mecanismos muy finos de regulación metabólica, tanto a nivel fisiológico como molecular, en las células bacterianas y en sus contrapartes vegetales.
- c) Hay una especificidad bacteria-hospedero. De hecho, previamente a la nodulación, ya se da una cierta comunicación entre ambos organismos. El microsimbionte reconoce a su huésped específico y viceversa. Ya han sido identificados algunos de los genes de *Rhizobium* que intervienen en este reconocimiento. Sin embargo, todavía no se sabe con precisión cómo es que la planta reconoce estas señales, y cómo se traducen en la modificación de su expresión genética.

JUSTIFICACIÓN

La transformación genética de plantas es una de las técnicas más útiles empleadas por los biólogos moleculares para el estudio de los organismos vegetales. Desde los proyectos con claras miras a una aplicación práctica, hasta aquellos en los que se incluyen objetivos puramente básicos, las ventajas para avanzar aumentan drásticamente si se cuenta con la posibilidad de modificar el genoma. Muchos han sido los métodos con que se ha intentado lograr una buena eficiencia de transformación de tejidos vegetales. De momento, el sistema en que *Agrobacterium* media la transferencia de genes se mantiene a la delantera como el más exitoso en plantas dicotiledóneas. En la naturaleza, esta bacteria infecta varias especies de plantas transfiriendo un segmento de DNA llamado T-DNA. Se ha demostrado que la transferencia solamente se da en partes del vegetal donde hay heridas; se presume que ante una herida la planta produce y/o expone sustancias que inducen la movilización del T-DNA. Normalmente, en los laboratorios de investigación se añaden técnicas de cultivo de tejidos *in vitro* a la infección vía *Agrobacterium* para conseguir callos, tejidos u organismos enteros transgénicos. Hay especies para las que se han logrado protocolos de transformación y selección sumamente fáciles y eficientes. Sin embargo, queda una gran lista de plantas, denominadas "recalcitrantes", que a pesar de su enorme importancia no se han podido transformar de forma razonablemente práctica. Una de ellas es el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), cuya importancia en México y otros países es de sobra conocida, no solamente por pertenecer a la dieta y a la agricultura más tradicionales, sino por ser uno de los sistemas modelo en el estudio de la simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno. Hay varios grupos que han abordado el problema de la transformación de frijol, pero ninguno ha publicado un protocolo reproducible con las variedades y en los laboratorios mexicanos. Todos los intentos conocidos hechos hasta ahora incluyen tecnología de cultivo de tejidos *in vitro*; condiciones en las cuales los explantes presentan dos serios problemas: primero, una marcada oxidación en las zonas de corte, y segundo, una susceptibilidad incontrolable a la infección de *Agrobacterium*, que acaba por necrosar la mayor parte de los tejidos. Ambas cosas, sumadas a que de por sí, los protocolos de regeneración de brotes dejan mucho que desear, han hecho que hasta la fecha no existan laboratorios donde se creen y se empleen plantas de frijol transgénicas, por más útil que esto pudiera resultar. Pese a todo, hay varias razones por las que no hay que darse por vencidos, y seguir buscando caminos y estrategias para lograr métodos alternativos. En el caso específico de la planta de frijol por ejemplo, una de las características que inhibe el desaliento, es su conocida proclividad a la formación de tumores o agallas, producidas por la transformación de *Agrobacterium* en condiciones *in vivo*.

En 1993 apareció un artículo (3) donde se logra obtener plantas transgénicas del género *Arabidopsis*,

después de haber embebido a la generación parental en medio con *Agrobacterium*, haberle hecho vacío para sacar el gas de los espacios intersticiales, y haberle quitado el vacío bruscamente para que la solución penetrara en los tejidos (a estos dos últimos pasos se les llama “infiltración”); a continuación se les dejó que florecieran, se hicieron autocruzamientos, y se seleccionó la F1 para resistencia a los marcadores. Tanto el pequeñísimo tamaño de *Arabidopsis* (adecuado para su fácil manejo en el laboratorio), como lo reducido del espacio que necesitan estas plantas en los fitotrones, hacen pensar que es poco factible extender el método a cualquier especie. Sin embargo, esta publicación abre horizontes y perspectivas. ¿Por qué no idear procedimientos de transformación *in vivo*?, ya en todo caso después se puede esterilizar el material transgénico y ponerlo *in vitro*. ¿Por qué no probar qué tanto puede substituir la infiltración a las heridas, en cuanto a lograr que *Agrobacterium* transfiera el T-DNA a las células vegetales?, quizá incluso aumente la eficiencia. Una de los principales problemas es cómo detectar a las células transformadas; no se pueden usar métodos de selección en una quimera *in vivo*. Pero ¿y si se tuviera una eficiencia tan alta, que aun el tejido quimérico sirviera como herramienta para hacer estudios?. Además, como ya se dijo antes, una vez ya transformado se puede llevar a condiciones *in vitro*, donde habría la posibilidad de seguir con las técnicas clásicas para manipularlo, obteniendo callos o intentando embriogénesis u organogénesis ya con selección; pero habiendo superado la barrera del cocultivo. Un atractivo añadido es que los experimentos *in vivo*, suelen ser por órdenes de magnitud menos costosos que los experimentos *in vitro*.

OBJETIVOS

Tomando como base todos los datos y preguntas anteriores, se buscó hacer un diseño experimental que ayudara a encontrar nuevas metodologías para enfrentar los obstáculos que han impuesto las plantas recalcitrantes. Hubo varios experimentos preliminares, entre los cuales merece la pena destacar uno hecho con plantas de pimiento (*Capsicum annuum L.*), donde de una transformación nula usando métodos clásicos *in vitro*, se llegó a obtener una eficiencia de aproximadamente una hoja cotiledonaria con transformación de cada veinte infiltradas *in vivo*. Para esta tesis se decidió tomar como planta modelo al frijol. Se escogió la variedad "Negro Jamapa" porque además de ser muy consumida en varios estados de la República (habría miras de aplicación), ya se han hecho en ella numerosos estudios de nodulación. El órgano que se fijó como blanco principal a transformar fue la raíz: ya que por un lado, la radícula es lo primero en aflorar durante la germinación, haciendo posible el fácil manejo del organismo, más con dimensiones y características de semilla que como planta; por otro, tiene células que se dividen continuamente, no como el resto del embrión, donde durante la germinación casi únicamente hay elongación; y por otro más, obtener raíces con grandes zonas transgénicas beneficiaría varios estudios de nodulación, aun cuando éstas fueran quiméricas. Como control o marco de referencia se optó por hacer una herida en la punta, porque en esa zona es donde se lleva a cabo la proliferación celular. Se sabe que es muy improbable, si no imposible, transformar células meristemáticas, pero normalmente cuando el meristemo se daña, hay células adyacentes que toman su lugar y funciones. Puesto que es en esta región donde se producen todas las células que van constituyendo los tejidos de la raíz, si hubiera transformación allí, se mantendría como estirpe transgénica, dando origen a un continuo a lo largo de este órgano. Las condiciones de infiltración se determinaron en experimentos preliminares, el tiempo de su duración por ejemplo, es justo el requerido para que ya no salgan burbujitas del tejido. El plásmido que se eligió es el p35SGUSint (12), que no solo ofrece las ventajas de tener el gene reportero GUS bajo el control del promotor constitutivo 35S, sino la de que este gene contiene un intrón, cuya presencia garantiza que no existirá ruido de fondo ocasionado por las bacterias en las mediciones. Y ya que se iba a infiltrar por un lado y a herir por otro, se consideró conveniente tratar a un tercer grupo experimental con ambos procedimientos. Así tal vez se obtuviera un máximo de células transgénicas.

Concretando, se puede decir que los objetivos de esta tesis son: (1) Explorar la infiltración de tejidos vegetales *in vivo*, como un método alternativo a la técnica de cocultivo de explantes y *Agrobacterium in vitro*, para obtener células transformadas mediante esta bacteria. (2) Contrastar el papel que juega la herida con el de la infiltración, en el proceso de transformación de radículas de frijol. (3) Encontrar una forma de

obtener raíces de frijol *in vivo*, con un área tal de tejido transgénico que permita usarlas como herramienta en estudios que involucren a este órgano, o bien como materia prima para experimentos de organogénesis y/o dediferenciación en condiciones selectivas de cultivo *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODO EXPERIMENTAL

- * Se esterilizó la superficie de aproximadamente 800 semillas de frijol, var. "Negro Jamapa" (PRONASE). Para lo cual se embebieron en una solución de cloro comercial al 15% durante 20 minutos. Posteriormente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril.
- * Se desechó el agua del último lavado y las semillas se repartieron en cuatro charolas, que habían sido cubiertas previamente con dos capas de papel secante húmedo.
- * Las charolas conteniendo las semillas se cubrieron con papel aluminio y se dejaron dos días a 25°C. Después de este tiempo la mayor parte de los frijoles ya estaba germinando.
- * Se seleccionaron las semillas cuya radícula ya sobresalía al menos un par de milímetros, y se les denominó germinados. La mayoría de estos tenían una radícula de aproximadamente medio centímetro.
- * Los germinados se dividieron aleatoriamente en ocho grupos. A cada grupo se le aplicó un tratamiento distinto.

Los tratamientos que se usaron son:

A1.- se hirieron

se pusieron en contacto con *Agrobacterium*

se infiltraron

A2.- no se hirieron

se pusieron en contacto con *Agrobacterium*

se infiltraron

A3.- se hirieron

se pusieron en contacto con *Agrobacterium*

no se infiltraron

A4.- no se hirieron

se pusieron en contacto con *Agrobacterium*
no se infiltraron

B5.- se hirieron

no se pusieron en contacto con *Agrobacterium*
se infiltraron

B6.- no se hirieron

no se pusieron en contacto con *Agrobacterium*
se infiltraron

B7.- se hirieron

no se pusieron en contacto con *Agrobacterium*
no se infiltraron

B8.- no se hirieron

no se pusieron en contacto con *Agrobacterium*
no se infiltraron

La cepa de *Agrobacterium* que se empleó es la C58Rif/ pRi15834/ p35SGUSint (12).

Para ponerlos en contacto con *Agrobacterium*, los germinados se embebieron en una solución de MS 0.5X líquido - pH 5.6, a la que se agregó 1ml de un cultivo en fase logarítmica tardía de la bacteria (crecido en medio YEB - Rif, Km). Este cultivo había sido previamente "inducido", una hora antes de iniciar el experimento, poniéndole trocitos de hojas de plantas de tabaco o frijol.

Para infiltrar, los germinados en la solución que se acaba de señalar (sin *Agrobacterium* en los casos B) se colocaron en un matraz Kitasato de 1l y se les hizo vacío con una bomba durante 20 minutos.

Para herir, se utilizó un papel de lija. A mano, y frijol por frijol, se hizo rozar ligeramente la punta de la radícula.

* Una vez que se había aplicado cada uno de los tratamientos, las semillas de cada grupo se distribuyeron en tres charolas de 17cm de largo, por 12cm de ancho, por 6.5cm de altura. A estas charolas

primero se les puso una capa, de aproximadamente tres centímetros, de tierra húmeda, a continuación las semillas ya sin líquido, y finalmente otra capa de tierra. Se humedeció esta última capa, y las charolas se colocaron de seis en seis, dentro de bandejas de 53cm de largo por 26cm de ancho por 13cm de altura. Se cubrió todo con papel plástico y se dejó que prosiguiera la germinación por cinco días más. Las condiciones de cultivo fueron: 25°C de temperatura y un fotoperiodo de 16hr luz (con aproximadamente 6000 lux) x 8hr oscuridad.

* A las raíces provenientes de las semillas tratadas con *Agrobacterium* (grupos A) se les hizo la prueba de GUS. Para esto se procuró identificar la raíz central (no siempre era posible), y de esta se cortaron tres fragmentos de aproximadamente 0.5cm, uno de la parte más distal, uno de la parte media, y uno de la región proximal. Para hacer la reacción se colocaron los explantes en los pocitos de una placa "multi-tittle" (una planta por pocito), y se cubrieron con medio de reacción(6). Las placas se cubrieron con sus respectivas tapas y se dejaron durante 24hr a 37°C. Después de este tiempo, se evaluó la transformación buscando las zonas de color azul con ayuda de un microscopio óptico.

* En cuanto a las plantas provenientes de tratamientos donde no hubo contacto con *Agrobacterium*, cinco de ellas (tomadas al azar) se usaron como controles negativos para la prueba de GUS. En el resto se cuantificó la longitud que habían alcanzado las raíces al final del experimento, como un indicio del daño originado por la herida y/o por la infiltración.

RESULTADOS

SOBREVIVENCIA AL TRATAMIENTO

Para cada uno de los tratamientos se utilizó un grupo de ochenta germinados. Después de cinco días, se contó el número de plantas que siguieron su desarrollo normal, esto es, en las cuales emergieron las estructuras aéreas al igual que en los controles. El resultado se resume en la siguiente tabla (R1):

Trat.	N0	N1	%
A1 (I,A,H)	80	60	75
A2 (A,I)	80	60	75
A3 (H,A)	80	78	97.5
A4 (A)	80	80	100

Tabla R1. Porcentaje de sobrevivencia. N0 número de germinados a los que se aplicó cada tratamiento. N1 número de plantas que habían seguido su desarrollo normal después de cinco días. %: porcentaje de N0 que es N1. I: infiltrados. A: con *Agrobacterium*. H: heridos.

Para los grupos B no se hizo esta evaluación.

LONGITUD ALCANZADA POR LAS RAÍCES

Los datos se tomaron en centímetros, contados a partir de la base del hipocotilo, hasta el punto más distal de la raíz. Debe mencionarse que las partes más jóvenes de las raíces se rompen con mucha facilidad al desenterrarlas; algunas veces dicha ruptura es tan inevitable como imperceptible. En este experimento se actuó con sumo cuidado y se consideraron en los resultados los datos de todas las mediciones.

A1 (H,A,I)	1) 7.5	16) 9.5	31) 16.5	46) 15.5
	2) 2.5	17) 7.0	32) 10.5	47) 5.5
	3) 3.0	18) 7.5	33) 4.0	48) 3.5
	4) 4.5	19) 13.5	34) 2.0	49) 9.0
	5) 4.5	20) 11.0	35) 9.0	50) 8.5
	6) 5.5	21) 3.0	36) 11.5	51) 6.0
	7) 8.0	22) 2.0	37) 17.5	52) 13.5
	8) 5.0	23) 1.5	38) 16.5	53) 4.0
	9) 6.0	24) 11.5	39) 3.5	54) 12.0
	10) 8.0	25) 10.0	40) 9.0	55) 11.5
	11) 9.0	26) 6.5	41) 5.0	56) 11.0
	12) 10.0	27) 12.0	42) 5.5	57) 10.0
	13) 4.0	28) 4.0	43) 4.0	58) 10.5
	14) 4.0	29) 11.0	44) 10.5	59) 22.5
	15) 5.0	30) 17.0	45) 4.0	60) 5.5

Promedio 8.5

A2 (A,I)	1) 1.5	16) 11.5	31) 9.0	46) 12.0
	2) 0.5	17) 2.5	32) 15.0	47) 15.0
	3) 11.5	18) 7.5	33) 4.0	48) 12.0
	4) 4.5	19) 15.5	34) 10.5	49) 13.0
	5) 10.0	20) 12.5	35) 14.5	50) 3.0
	6) 12.0	21) 4.0	36) 12.5	51) 7.0
	7) 11.0	22) 15.0	37) 3.5	52) 16.5
	8) 7.5	23) 11.0	38) 15.0	53) 9.5
	9) 16.5	24) 12.0	39) 17.5	54) 4.0
	10) 16.5	25) 10.5	40) 4.5	55) 17.5
	11) 17.0	26) 4.5	41) 9.5	56) 12.0
	12) 9.0	27) 13.0	42) 7.0	57) 19.0
	13) 15.0	28) 14.5	43) 9.0	58) 18.5
	14) 8.0	29) 13.0	44) 4.0	59) 11.5
	15) 21.0	30) 0.5	45) 2.0	60) 15.0

Promedio 10.5

A3	1) 10.0	16) 9.5	31) 4.0	46) 16.5
	(H,A) 2) 10.0	17) 20.0	32) 13.0	47) 10.0
	3) 11.5	18) 14.5	33) 10.5	48) 12.0
	4) 11.5	19) 13.5	34) 9.5	49) 12.5
	5) 12.0	20) 13.5	35) 9.5	50) 18.5
	6) 4.5	21) 10.0	36) 12.0	51) 15.0
	7) 10.0	22) 16.0	37) 11.0	52) 12.0
	8) 11.0	23) 6.0	38) 15.0	53) 19.0
	9) 9.0	24) 12.0	39) 8.5	54) 14.0
	10) 11.0	25) 13.0	40) 2.5	55) 12.5
	11) 17.0	26) 10.0	41) 14.5	56) 14.5
	12) 22.5	27) 16.0	42) 12.5	57) 15.5
	13) 11.5	28) 3.0	43) 17.0	58) 17.0
	14) 13.5	29) 12.5	44) 14.0	59) 13.0
	15) 13.0	30) 9.0	45) 19.0	60) 9.0
	61) 9.5	76) 10.0		
	62) 13.0	77) 13.0		
	63) 14.0	78) 13.5		
	64) 17.0			
	65) 10.5			
	66) 8.5			
	67) 10.0			
	68) 22.0			
	69) 7.5			
	70) 5.0			
	71) 13.5			
	72) 8.0			
	73) 13.0			
	74) 21.5			
	75) 14.0			

Promedio 12.5

A4	1) 20.0	16) 20.0	31) 18.0	46) 16.5
(A)	2) 14.0	17) 18.5	32) 16.0	47) 16.0
	3) 11.0	18) 13.0	33) 18.0	48) 15.5
	4) 12.5	19) 13.0	34) 12.5	49) 20.5
	5) 11.0	20) 20.0	35) 9.5	50) 11.5
	6) 11.0	21) 13.0	36) 19.0	51) 13.5
	7) 15.0	22) 16.5	37) 14.0	52) 16.5
	8) 10.5	23) 15.0	38) 10.0	53) 14.0
	9) 12.5	24) 13.0	39) 12.5	54) 10.0
	10) 18.0	25) 10.5	40) 11.0	55) 12.0
	11) 13.0	26) 20.0	41) 11.0	56) 9.5
	12) 9.5	27) 11.0	42) 17.0	57) 14.5
	13) 16.0	28) 12.5	43) 12.5	58) 21.0
	14) 18.0	29) 13.5	44) 10.5	59) 15.0
	15) 13.5	30) 18.5	45) 13.0	60) 16.5
	61) 14.0	76) 18.5		
	62) 15.0	77) 14.0		
	63) 11.5	78) 18.0		
	64) 20.5	79) 17.0		
	65) 15.5	80) 12.5		
	66) 15.0			
	67) 19.0			
	68) 15.0			
	69) 14.0			
	70) 21.0			
	71) 15.0			
	72) 11.0			
	73) 15.0			
	74) 19.5			
	75) 21.0			

Promedio 15.0

B1 (H,D)	1) 6.5	16) 6.0	31) 3.0
	2) 12.0	17) 3.0	32) 2.0
	3) 8.5	18) 1.0	33) 2.0
	4) 3.5	19) 2.0	34) 1.0
	5) 7.5	20) 7.0	35) 0.5
	6) 12.5	21) 6.0	36) 8.0
	7) 17.0	22) 1.0	37) 11.0
	8) 18.5	23) 19.0	38) 5.0
	9) 13.5	24) 9.0	39) 0.5
	10) 2.0	25) 5.0	40) 4.5
	11) 2.5	26) 5.0	
	12) 1.0	27) 3.0	
	13) 0.5	28) 3.0	
	14) 7.0	29) 2.0	
	15) 5.0	30) 2.0	

Promedio 5.5

B2 (I)	1) 16.0	16) 4.0	31) 18.0
	2) 18.0	17) 4.0	32) 12.0
	3) 12.0	18) 1.0	33) 20.0
	4) 15.0	19) 2.0	34) 18.0
	5) 13.5	20) 8.0	35) 15.0
	6) 17.0	21) 3.0	36) 17.0
	7) 19.0	22) 3.0	37) 18.0
	8) 20.0	23) 14.0	38) 12.0
	9) 11.0	24) 14.0	39) 11.0
	10) 4.0	25) 16.0	40) 2.0
	11) 13.0	26) 15.0	
	12) 1.0	27) 17.0	
	13) 9.0	28) 13.0	
	14) 11.0	29) 16.0	
	15) 4.0	30) 16.0	

Promedio 12.0

B3	1) 8.0	16) 14.0	31) 8.0
(H)	2) 11.0	17) 17.5	32) 11.5
	3) 14.5	18) 19.0	33) 13.0
	4) 13.0	19) 10.0	34) 15.0
	5) 14.0	20) 11.5	35) 14.5
	6) 16.0	21) 13.5	36) 10.0
	7) 13.5	22) 16.5	37) 19.5
	8) 11.0	23) 9.0	38) 11.0
	9) 19.0	24) 12.5	39) 9.0
	10) 18.0	25) 13.5	40) 13.0
	11) 7.5	26) 12.5	
	12) 12.0	27) 12.5	
	13) 13.0	28) 16.5	
	14) 14.0	29) 11.5	
	15) 12.5	30) 13.0	

Promedio 13.0

B4	1) 9.5	16) 17.5	31) 18.5
(--)	2) 13.0	17) 11.0	32) 12.5
	3) 13.0	18) 18.5	33) 15.0
	4) 11.5	19) 18.0	34) 12.0
	5) 13.5	20) 14.5	35) 21.0
	6) 15.0	21) 12.5	36) 20.0
	7) 18.5	22) 17.5	37) 18.5
	8) 20.0	23) 14.0	38) 6.0
	9) 22.5	24) 15.0	39) 21.5
	10) 17.5	25) 8.5	40) 19.5
	11) 13.0	26) 14.0	
	12) 11.0	27) 17.0	
	13) 21.5	28) 11.0	
	14) 21.0	29) 20.5	
	15) 16.5	30) 12.5	

Promedio 15.5

Para poder comparar los promedios con mayor facilidad, se pueden agrupar de la siguiente forma (tabla R2):

	<i>con Agrobacterium</i>	<i>sin Agrobacterium</i>
infiltrados y heridos	(A1) 8.5	(B1) 5.5
solo infiltrados	(A2) 10.5	(B2) 12.0
solo heridos	(A3) 12.5	(B3) 13.0
no infiltrados, no heridos	(A4) 15.0	(B4) 15.5

Tabla R2. Promedio de la longitud alcanzada por las raíces en cada grupo, a los cinco días de haberles aplicado el tratamiento. Datos en cm. I: infiltrados. A: con *Agrobacterium*. H: heridos.

PRUEBA DE GUS

Se le hizo la prueba de GUS a 48 muestras de cada uno de los tratamientos. En la tabla R3 se resume el numero de positivas y negativas obtenido en cada caso. En las positivas se incluyen desde las que presentaban un pequeño punto azul, hasta las que tenían varias regiones grandes teñidas.

	A1 (H,A,I)	A2 (A,I)	A3 (H,A)	A4 (A)
POSITIVAS	28 (60%)	31 (65%)	17 (35%)	6 (12%)
NEGATIVAS	19 (40%)	17 (35%)	31 (65%)	42 (88%)
TOTAL	48 (100%)	48 (100%)	48 (100%)	48 (100%)

Tabla R3. Número de muestras positivas y negativas a la prueba de GUS en cada tratamiento. (): porcentaje de ellas respecto al total. I: infiltradas. A: con *Agrobacterium*. H: heridas

Si se toman las positivas y se desglosan en grupos, de acuerdo al número y amplitud de las zonas azules que presentaban, se puede tener la siguiente tabla (R4):

	A1 (H,A,I)	A2 (A,I)	A3 (H,A)	A4 (A)
UNO A CUATRO PUNTOS AZULES	7 (25%)	6 (19%)	4 (24%)	4 (67%)
CINCO O MÁS PUNTOS, O BIEN AL MENOS UN MANCHÓN AZUL	21 (75%)	25 (81%)	13 (76%)	2 (33%)

Tabla R4. Número y amplitud de las zonas azules que presentaban las muestras positivas. (): porcentaje respecto al total en cada tratamiento. I: infiltradas. A: con *Agrobacterium*. H: heridas

DISCUSIÓN, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Puesto que una de las intenciones de este trabajo es contrastar el papel que juega la herida con el de la infiltración en el proceso de transformación de radículas de frijol mediante *Agrobacterium*, es importante incluir alguna forma de evaluación acerca de la medida en que afectó a la planta cada uno de estos tratamientos, para así tener una idea del daño que le ocasionaron.

En la tabla R1, donde se muestra la sobrevivencia diferencial a los tratamientos, se pueden hacer varias observaciones. La primera es que los germinados de frijol que se usaron, cuando se desarrollaron en presencia de *Agrobacterium*, sin haber sido ni heridos, ni infiltrados, siguieron, al menos en el aspecto cuantitativo, el curso de su crecimiento normalmente. Esto, aunado a experimentos (no presentados en este trabajo) donde se ha visto que los germinados puestos en contacto con *Agrobacterium* son capaces de crecer hasta llegar a la madurez sexual, indica que la presencia de la bacteria en la planta *in vivo* no es nociva.

La tabla R1 también muestra que en este experimento la herida producida no fue significativamente letal. Esto se infiere al comparar el grupo A3 con el A4 y el grupo A1 con el A2. Ya que cuando la única variable es la existencia de herida, la sobrevivencia es prácticamente igual. Muy probablemente esto se deba a la capacidad que tienen las plantas para desarrollar raíces secundarias. Cabe mencionar que aun cuando no se hicieron mediciones al respecto, era muy evidente que la masa radicular total en todos los casos era proporcional a la longitud de este órgano.

Otro punto que destaca en la misma tabla, es que el tratamiento de infiltración aplicado si llegó a ser letal para una parte de la población. El 25% de los germinados que fueron infiltrados, no resistió el proceso y acabó muriendo (grupos A1 y A2).

Al comparar el efecto en la sobrevivencia que tuvo el infiltrar sumado al herir, los datos refuerzan las observaciones anteriores: la herida no resulta letal, mientras que la infiltración lo es en un 25%. También es interesante que ambos procesos aunados no presenten un impacto sinérgico.

De una manera un tanto más fina, al comparar la longitud promedio alcanzada por las raíces en cada uno de los grupos, también se puede tener una idea del daño ocasionado por cada uno de los tratamientos. Aún cuando, como ya se dijo anteriormente, las raíces son muy frágiles y algunas veces se rompen al desenterrarlas, si se asume que este factor afecta en igual proporción a todos los grupos, se pueden notar diferencias respecto a este parámetro.

En la tabla R2 es posible hacer varias observaciones que concuerdan bien con los resultados de sobrevivencia diferencial. En primer lugar, al comparar el grupo A4 con el B4, se ve nuevamente que la mera presencia de *Agrobacterium* en la planta no parece originarle un daño. En el control, donde los germinados solamente se embebieron en medio durante 20min, sin haber sido heridos y sin infiltración (grupo B4), la medida promedio de la longitud alcanzada por las raíces fue de 15.5 cm. Prácticamente la misma que cuando hubo bacteria en el medio (grupo A4), caso en que el promedio fue de 15.0 cm. Otra similitud es que el tratamiento de infiltración parece ser más dañino que las heridas practicadas. Al comparar los grupos A2 y B2 con los A4 y B4 respectivamente, se aprecia que la diferencia en la talla promedio es mayor que cuando se contrastan los grupos A3 y B3, donde solo hubo herida, con los mismos controles. Sin embargo, a diferencia de los resultados en la sobrevivencia, cuando se compara la inhibición del desarrollo radicular en los grupos A1 y B1, que fueron tanto heridos, como infiltrados, con la de todos los otros grupos, se ve que es notoriamente mayor. Lo cual habla de un cierto efecto sinérgico, que si bien no llega a ser letal, si está claramente presente.

Todas estas mediciones y comparaciones no tendrían ningún sentido si se pretendiera contrastar la herida y la infiltración como términos absolutos. Esto es, tanto el tratamiento usado para herir, como el que se empleó para infiltrar, seguramente se podrían variar de distintas formas hasta conseguir que ambos produjeran un daño muy similar; o incluso que los resultados aquí obtenidos se invirtieran. Por ejemplo, una de las grandes diferencias que hay entre los dos procesos, es que la herida provocada afectó únicamente a las células de la punta de la radícula, mientras que la infiltración actuó sobre la totalidad del organismo. La finalidad de esta parte del trabajo es otra. Por un lado, se sabe que en principio es imprescindible que haya una herida en la planta para que el T-DNA del plásmido Ti de *Agrobacterium* sea transferido a las células vegetales. Si se quiere llegar a conocer en qué grado es posible substituir el procedimiento convencional de herir un órgano, por el de infiltrarlo, y qué ventajas y desventajas relativas conlleva cada método en un caso preciso, una de las primeras preguntas lógicas es ¿qué tanto simula la infiltración una herida?. Se pudo elegir entre una multitud de formas de herir y casi tantas otras de infiltrar. Prácticamente no importaba qué método se seleccionara. Lo único esencial era poder comparar una herida, en el sentido de daño físico cualquiera, con un procedimiento de infiltración dado. Una vez revisados los resultados, se puede concluir que en el aspecto en que cada uno de los procesos escogidos ocasionan un perjuicio en el desarrollo del organismo, notorio al menos durante los cinco días posteriores a su aplicación, los dos tratamientos pudieran llegar a tener alguna equivalencia en cuanto a volver competentes a las células vegetales para ser transformadas por *Agrobacterium*. Por otra parte, también es

conveniente tener una idea del daño relativo generado en los distintos tratamientos usados, para apreciar su posible relación con la eficiencia de transformación una vez hecha la prueba de GUS. Además, para plantear cualquier experimento futuro, es determinante hacer un balance, entre el deterioro que ocasiona en la planta la magnitud de la fuerza o severidad del tratamiento usado, y el beneficio que se obtiene en términos de eficiencia de transformación. Los experimentos hechos aquí pretenden ser una referencia en la cual basarse, de la cual partir, en el diseño de otros futuros.

Los resultados de la prueba de GUS (tabla R3) muestran claramente la certeza de la hipótesis planteada en los objetivos de esta tesis.

(Al margen de este trabajo hay que ver lo bien que se procesa el intrón del plásmido p35SGUSint; esta es la primera vez que se prueba con la familia Fabaceae).

Si se compara el tratamiento A4, en donde a los germinados se les colocó en medio con bacterias, sin herir y sin infiltrar, con el grupo A3, donde se les había practicado una herida, se ve que la eficiencia de transformación (que aquí se define como la proporción de muestras positivas en un grupo dado) sube de un 12% a un 35%. Esto es, pese a que las bacterias habían sido inducidas, como se explica en la parte de metodología, previamente a ponerlas en contacto con los germinados, el hecho de que haya una herida en la planta incrementa la eficiencia prácticamente tres veces.

Al contrastar los grupos A4 y A3 con el grupo A2, no queda duda de que un proceso de infiltración puede llegar a substituir a uno de herida, en el sentido de que incrementa significativamente la eficiencia con que el plásmido T-DNA es transferido a las células vegetales. En el caso específico de los tratamientos que aquí se aplicaron, mediante el procedimiento de infiltración se aumentó la eficiencia de 12% a 65% (más de cinco veces) respecto al control, y de 35% a 65% (casi el doble) respecto al grupo en que se habían practicado solamente heridas.

Si se ve la diferencia que hay entre el grupo A1, que fue tanto herido como infiltrado, y los grupos A2 y A3, que fueron solamente infiltrados o heridos respectivamente, se nota que el resultado obtenido al usar juntos los dos procesos, es muy similar al que se logra con solo la infiltración.

Pasando a los resultados expuestos en la tabla R4, antes que nada hay que recordar que el método de infiltración expone por igual a todas las células de la superficie de la radícula, mientras que el de la herida únicamente incluye a las de la zona apical. Sería pues de esperar, que con el tratamiento de infiltración se produjesen más eventos de transformación en células proximales (que con el de herida), las cuales si bien están aún en una etapa de elongación, ya han perdido mucho la frecuencia de división con respecto a las

que se encuentran muy cercanas al meristemo. En el tratamiento de herida por el contrario, hay solo un grupo de células expuestas, pero estas mantienen una frecuencia relativamente alta de replicación. Es desde luego importante ver si con alguno de los métodos se obtiene, por un lado un mayor número de eventos de transformación (indicado por un mayor número de puntos azules) y por otro, si en alguno se observan más manchones, no alargados en el eje longitudinal (lo cual denotaría simplemente elongación) sino con una silueta un tanto irregular (que implica divisiones de células transformadas). Lo relevante al final de cuentas, es si uno de los procesos conduce a lograr un mayor número de células transformadas que el otro.

Para poder hablar de qué tan amplia es el área transformada en cada muestra, hay que señalar dos cuestiones importantes: La primera es que como no se mide de forma totalmente cuantitativa, hay un factor de subjetividad al evaluarla. La otra, es que los valores que se le asignen pueden constituir un gradiente casi continuo, y por lo tanto las clasificaciones que se hagan son forzosamente arbitrarias. Sin embargo, como a simple vista las diferencias en esta área de transformación eran tan conspicuas, se decidió plasmarlas en los resultados de alguna manera.

Se optó por dividir las muestras positivas en solo dos grupos. En uno se incluyen las que tienen de uno hasta cuatro pequeños puntos azules (cabe recordar que cada muestra consta de tres fragmentos, uno de la punta de la raíz, uno de la región media, y uno de la parte proximal) y en el otro las que presentaban cinco o más de estos puntos, o bien, al menos un manchón azul (fotografías a y b).

En el tratamiento control (grupo A4) el número de muestras es tan pequeño, que no se puede considerar que las proporciones de eficiencia deban ser tomadas en cuenta para un análisis de resultados. En los otros grupos, pese a que los porcentajes son muy similares entre sí, parece haber una mayor eficiencia de transformación cuando únicamente se aplicó el procedimiento de infiltración. Como ya se dijo anteriormente, es muy difícil cuantificar esta eficiencia; no obstante, se juzga adecuado enfatizar que cuando los explantes se vieron bajo el microscopio, una vez hecha la prueba de GUS, era muy notorio que en el grupo A2 la magnitud de áreas azules era mucho mayor. Sin embargo, por otro lado, no parecería haber un motivo para que cuando se hiere además de infiltrar (grupo A1) la eficiencia baje.

Todos estos datos referentes a los resultados de la tabla R4, hacen pensar que la probabilidad de que se transforme una célula aún capaz de dividirse es, si no significativamente superior cuando solamente se infiltra, cuando menos muy semejante para todos los tratamientos. No parece que inclusive en este aspecto el procedimiento de herida ofrezca una ventaja.

Es interesante que en casi ninguno de los cientos de puntos y manchas que se observaron se detectó una continuidad que pudiera denotar la transformación de una célula meristemática. Lo cual calza muy bien con las apreciaciones de Potrikus expuestas en la introducción de este trabajo. Sin embargo, cabe



b



d



c

ESTA TESIS NO PUEDE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Página anterior; fotografías de algunas muestras, después de haberles practicado la prueba de GUS. a: ejemplo del tipo de muestras que fue incluido en el grupo "cinco o más puntos o bien, al menos un manchón azul". b: ejemplo del tipo de muestras que fue incluido en el grupo "uno a cuatro puntos azules". c: muestra con una franja positiva a lo largo del eje central. d: corte transversal de la misma muestra

cabe mencionar que en uno de los varios experimentos preeliminares que se realizaron para esta tesis, se encontró una muestra con una zona lineal azul que se continuaba como un hilo a todo lo largo del eje longitudinal del explante (Fotografías c y d). Por su forma y dimensiones es muy difícil suponer que se trate de una sola célula elongada. Más bien, parece que aunque extremadamente raros, si hay casos en que se llegan a transformar células del meristemo, o al menos algunas que todavía están proliferando muy activamente. Tal vez no tenga importancia, pero hay que señalar que en el experimento preliminar donde se encontró esta muestra, los germinados no eran de dos días sino de cuatro; en este caso particular se había cortado con una navaja un trocito menor a un milímetro de la punta de la raíz, y posteriormente infiltrado (las características del método de infiltración fueron las mismas que en este trabajo). De todos modos, exceptuando los casos en que se trabaje con plantas de semillas muy pequeñas, abundantes y baratas (como *Arabidopsis*), donde además sea fácil hacer una selección o detección a gran escala de las zonas transformadas, no se puede plantear el uso de estas técnicas como un método rutinario para conseguir la transformación de células con alta proliferación y obtener *in vivo* secciones continuas de tejidos transformados.

Al examinar si hay una relación directamente proporcional entre la magnitud del daño ocasionado a las plantas por los tratamientos, y la eficiencia de transformación, se observa que al comparar los grupos A2, A3 y A4 entre sí, en efecto, sí la hay. El único tratamiento que no concuerda con esta relación es el A1, donde al haberse herido e infiltrado, era de esperar que la eficiencia fuera mayor a la de los otros tratamientos. Probablemente, lo que ocurre es que tan solo con el proceso de infiltración utilizado ya se alcance un grado de competencia "tope" en las células vegetales. Al igual que sucede *in vitro*, puede haber un punto en que si se hiere más a la planta, ya no se incrementa la eficiencia de transformación, y simplemente se deteriora cada vez más el posterior desarrollo del organismo.

CONCLUSIONES

En esta tesis hay cosas fundamentales que quedan demostradas, pero también es claro que se originan varias preguntas que habrá que buscar contestar en trabajos futuros. De las demostraciones, las conclusiones más relevantes que se pueden sacar son: (1) El procedimiento de infiltración tiene la capacidad de substituir, e incluso superar en eficiencia, al de herida, en cuanto a volver competentes células vegetales *in vivo* a la transformación por *Agrobacterium*. (2) Más de la mitad de las raíces muestreadas tienen más de cuatro eventos individuales de transformación, o bien al menos un “manchón” de células transgénicas, por cada 1.5 cm de longitud; esto es una eficiencia comparable con las más altas logradas *in vitro* con plantas no recalcitrantes. Sin duda podrán usarse como materia prima en experimentos de regeneración o desdiferenciación selectivas, y muy probablemente sean de ayuda en estudios de nodulación y otros que involucran al sistema radicular. Entre las preguntas que surgen se puede destacar las siguientes: ¿Con el proceso de infiltración se puede llegar a transformar células más eficientemente que con el de herida porque no solamente las vuelve competentes, sino que al penetrar en los tejidos, la superficie de contacto entre bacterias y paredes vegetales es mucho mayor?. ¿Hay células de algún tejido o parte de la radícula, que se transforme preferencialmente?. Relacionado con las anteriores, ¿infiltrando se pueden tener tejidos transgénicos que no es posible lograr hiriendo?. ¿Qué tan exitoso sería el sistema de infiltración si se usaran estructuras aéreas?. ¿Se pueden generar nódulos transgénicos en raíces con zonas transformadas?. Y (la cuestión más importante) ¿qué procede hacer teniendo como base los resultados de esta tesis, si la finalidad es conseguir plantas enteras transgénicas (que puedan heredar los transgenes)?.

Probablemente tres de las soluciones inmediatas más factibles para enfrentar algunas de estas dudas y plantear experimentos más ambiciosos, sean: (1) Llevar a cabo un estudio histológico que permita conocer qué tejidos o secciones son las transformadas. (2) Tratar de nodular raíces que fueron infiltradas con *Agrobacterium*. (3) Infiltrar plantas donde las estructuras aéreas ya hayan emergido y evaluar la potencialidad de los resultados, sobre todo en cuanto a la obtención de estirpes transgénicas se refiere. Y (4) Intentar, de las diversas formas conocidas, la regeneración de brotes a partir de las células transformadas por infiltración.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Allavena A. Beans (*Phaseolus*). Handbook of Plant Cell Culture. pp 137-168
- 2 Argüello Astorga G y Herrera Estrella L (1993) Avances en Ingeniería Genética. Serie Nuevas Tendencias. Ed. Centro Superior de Investigaciones Científicas, España. pp 41-60
- 3 Bechtold N, Ellis J y Pelletier G (1993) *In planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. Cr Acad Sci. Paris. Sciences de la vie -life sciences. 316: in press October issue
- 4 Carsolio Mata C (1992) Caracterización de la región de control del gene de la nodulina 30 de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en plantas transgénicas. Tesis de Maestría en Biotecnología-UNAM
- 5 Franklin ChI, Trieu TN, Cassidy BG, Dixon RA y Nelson RS (1993) Genetic transformation of green bean callus via *Agrobacterium* mediated DNA transfer. Plant Cell Rep 12:74-79
- 6 Jefferson RA (1987) Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. Plant Mol Biol Rep 5:387-405
- 7 Levine RP (1978) Genética. 2a ed. Compañía Editorial Continental S.A. México. pp 20-24
- 8 Mc Clean P, Chee P, Held B, Simental J, Drong RF y Slightom J (1991) Susceptibility of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to *Agrobacterium* infection: Transformation of cotyledonary and hypocotyl tissues. Plant Cell Tiss Org Cult 24:131-138
- 9 Potrykus I (1991) Gene transfer to plants: Assessment of published approaches and results. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 42:205-225
- 10 Salisbury FB (1985) Plant Physiology. Ross CW ed. Wadsworth Pub Co, Belmont CA

- 11 Starr C, Taggart R (1992) *Biology, the unity and diversity of life*. Wadsworth Pub Co, Belmont, CA
- 12 Vancanneyt G, Schmidt R, O'Connor-Sánchez A, Willmitzer L y Rocha-Sosa M (1990) Construction of an intron-containing marker gene: Splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium* mediated plant transformation. *Mol Gen Genet* 220:245-250
- 13 Willmitzer L (1988) The use of transgenic plants to study plant gene expression. *Trends Genet* 4:13-18