



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA**

**“ESTABLECIMIENTO DE PROTOCOLOS PARA LA
REGENERACIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS DE DOS
ESPECIES DE TABACO *NICOTIANA ALATA* Y *NICOTIANA
PLUMBAGINIFOLIA*”**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUIMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA
JANNELY CRISTAL ALVAREZ MEZA**



MÉXICO, D.F.

2011.



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: RAUL GENARO AGUILAR CABALLERO

VOCAL 1: HOMERO HERNANDEZ MONTES

SECRETARIO: MARIA TERESA DE JESÚS OLIVERA FLORES

1er SUPLENTE: MARÍA AMANDA GÁLVEZ MARISCAL

2do SUPLENTE: FRANCISCO RUIZ TERAN

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 116 cultivo de tejidos vegetales departamento de bioquímica
conjunto E facultad de química.

ASESOR DEL TEMA:

M.en C. MARIA TERESA DE JESÚS OLIVERA FLORES

SUSTENTANTE:

JANNELY CRISTAL ALVAREZ MEZA

AGRADECIMIENTOS

Te agradezco Señor por las bendiciones que me ha dado en el transcurso de mi vida así como de encontrar gente maravillosa que me ha brindado una mano cuando estaba a punto de caer un hombro donde llorar y un jalón de orejas cuando fue necesario tardaría en mencionar a todas aquellas personitas valiosas para mí que entre ellas esta mi familia que ha sido un motor para concluir este ciclo de mi vida.

Agradezco a Mayte por brindarme sus conocimientos, paciencia y amistad de igual forma a los chicos del lab 116 de cultivo de tejidos que siempre trabajamos en equipo. A mis amigos incondicionales no hace falta nombrarlos saben cuánto los quiero, mil gracias por estar siempre a mi lado.

GRACIAS

TANTO ALTO COMO PUEDA LLEGAR

TAN ALTO COMO PUEDA HACER

TODO LO QUE QUIERA LOGRAR

DEPENDE DE MI

ALONSO

INDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. Objetivo General.....	4
2.1 Objetivos Particulares.....	4
III.-Antecedentes generales.....	5
3.1 Clasificación Taxonómica.....	5
3.2 Distribución geográfica.....	6
3.3 Auto incompatibilidad.....	7
IV.- CAPITULO I	
4.1 Antecedentes.....	8
4.1.1 Cultivo <i>in vitro</i> de plantas.....	8
4.1.1.2 Regeración <i>in vitro</i> de <i>N. alata</i> y <i>N. plumbaginifolia</i>	15
4.1.2 Modelos biológicos.....	16
4.1.3 <i>Nicotiana tabacum</i> como modelo biológico.....	17
4.4 Ruta Crítica.....	19
4.5 Materiales y métodos.....	20
4.5.1. Material biológico.....	20
4.5.2. Aspectos básicos.....	20
4.5.3. Primer ensayo. Vitaminas y fitoreguladores.....	21
4.5.4. Segundo ensayo. Vitaminas.....	22
4.5.5. Tercer ensayo. Barrido Hormonal.....	23
4.5.6. Cuarto ensayo. Sacarosa.....	23
4.5.7. Análisis estadístico.....	24
4.6.Resultados.....	24

V CONCLUSIONES.....	43
VI.- CAPITULO II Transformación genética de <i>Nicotiana alata</i> y <i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	
6.1. Antecedentes.....	44
6.1.1 Trasferencia de gen por vector libre.....	44
6.1.2 Transferencia de gen por vector libre.....	44
6.1.3 Métodos químicos.....	45
6.1.4 Métodos eléctricos.....	46
6.1.5 Métodos físicos.....	47
6.2.- Ruta crítica.....	49
6.3. Materiales y métodos.....	50
6.4. Metodología.....	51
VII.- Resultados.....	56
7.1 Análisis de Resultados.....	64
VII.- CONCLUSIONES.....	69
ANEXOS.....	70
BIBLIOGRAFÍA.....	77

ABREVIATURAS

AI	Auto incompatibilidad
AIG	Auto incompatibilidad gametofítica
<i>N. alata</i>	<i>Nicotiana alata</i>
<i>N. plumaginifolia</i>	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>
<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
AIA	Ácido Indol Acético
AG ₃	Ácido Giberélico
ABA	Ácido Abscísico
BAP	6-Bencil Amino Purina
2ip	6 (alfa- dimetilamina) purina
KinCinetina(6-furfulenina purina)	
MES	(Morpholina) ethalensulfónico
MS	Sales del medio Murashige&Skoog
i.a	Ingrediente activo

RESUMEN

En la naturaleza existen varias especies que presentan auto incompatibilidad esto es, no pueden autopolinizarse debido a varias barreras anatómicas, bioquímicas y genéticas. En el género *Nicotiana* se ha reportado a la especie *Nicotiana alata* como un ejemplo de estas plantas autoincompatibles, por lo cual su reproducción se ve limitada y se tiene que hacer uso de distintas técnicas para lograr su multiplicación. En general el género *Nicotiana*, ha sido usado como un buen modelo biológico para estudiar varios procesos fisiológicos, a nivel bioquímico, genético y molecular, por lo que *Nicotiana alata* resulta ser un buen modelo biológico para dilucidar los mecanismos que determinan la auto incompatibilidad, pero para que una planta pueda resultar un buen modelo biológico, es necesario contar con un sistema que permita su propagación en poco tiempo y en condiciones controladas, tener plantas en cualquier temporada y en cantidades suficientes, por lo que el presente trabajo tiene como objetivo principal: "Establecer protocolos de regeneración y transformación de plantas de dos especies de tabaco (*Nicotiana alata* y *Nicotiana plumbaginifolia*)" bajo condiciones *in vitro*. El desarrollo del presente trabajo se llevó a cabo en dos partes; la primera es el capítulo I que consistió en establecer el protocolo para la regeneración de ambas especies (*Nicotiana alata* y *Nicotiana plumbaginifolia*), Cabe señalar que también se desarrolló el protocolo para *Nicotiana plumbaginifolia* debido a que es una especie que no presenta dificultad en su regeneración y que se utilizó como control; en el capítulo II se describe el protocolo para la transformación genética para ambas especies probándose dos métodos diferentes de transformación genética: por biobalística e infección por *Agrobacterium tumefaciens*

En la primera parte se probaron diferentes medios de cultivo reportados para *N. Plumbaginifolia*, se realizaron modificaciones básicamente en los componentes de los medios como son compuestos orgánicos, reguladores de crecimiento y concentración de sacarosa y se probaron en ambas especies.

Los diferentes medios de cultivo se evaluaron con base al número total de brotes generados en un determinado tiempo (45 días). Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente encontrándose diferencias significativas cuando se compararon los diferentes medios en cuanto a los compuestos orgánicos, encontrándose que la regeneración de ambas plantas depende de en gran medida de la composición orgánica de los medios ya que al modificar ésta se obtuvo un rendimiento mayor al 100%.

Para determinar la dependencia a los reguladores de crecimiento en la diferenciación de brotes, en este trabajo se probaron dos tipos de fitohormonas: auxinas y citocininas. La auxina probada fue ANA (ácido 1-naftilacético) y la citocinina fue BAP (6-bencil amino purina), se realizó un ensayo donde se hizo un barrido de reguladores de crecimiento probándose BAP/ANA en las siguientes concentraciones 2/0, 0/0.1, 2/0.25, 2/0.5, 2/0.75 y 2/1.0 mgL⁻¹ con el fin de determinar la concentración y combinación que indujera más brotes adventicios. Al realizar el análisis estadístico se encontraron diferencias significativas entre tratamientos; en el caso de *N. alata* fue más notoria las diferencias. Así mismo se observó que cuando la auxina estaba en mayor proporción se generó más callo y los brotes resultaron más frágiles, mientras que los medios que presentaron la citocinina en mayor proporción que la auxina, se lograron brotes definidos y vigorosos, demostrando así la función de cada hormona como la literatura lo describe (Murashige & Skoog 1962).

En otros ensayos se probaron diferentes concentraciones de sacarosa (20, 25, 30 y 35 g. L⁻¹) estadísticamente no hubo diferencias significativas, sin embargo los brotes obtenidos a una concentración de 35 g L⁻¹ donde se observan mucho más delgados y menos vigorosos.

Finalmente se logró obtener un medio de cultivo capaz de estimular una muy buena cantidad de brotes (35 brotes por explante) en *N. alata* resultado que

supera a lo reportado por Ebert y Clarke, 1990 (único artículo publicado para esta especie) en donde logran una regeneración de 2 a 6 brotes por explante.

En el capítulo II se realizó un barrido de concentración de kanamicina para la concentración de selección; esta fue de 90 mgL^{-1} , debido a que los plásmidos utilizados tienen en su construcción el gen que codifica a la proteína que confiere a la resistencia a este antibiótico. Posteriormente se describe a cada uno de los métodos de transformación genética: método físico (método de bombardeo de microproyectiles), con el vector binario pArt₂₇ construido por la Alumna de doctorado Grethel Busot método transferencia de gen vector libre (infección por *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA 4404) con el vector binario pBIN por el alumno de doctorado Javier

I. INTRODUCCIÓN

A partir de los avances biotecnológicos que se han desarrollado en nuestros días, se han creado diversas técnicas en el área de cultivo de tejidos vegetales principalmente para la regeneración y propagación de diversas especies (ornamentales, frutales o como materia prima) con intereses comerciales y científicos.

Las técnicas del cultivo de tejidos vegetales, se llevan a cabo con la finalidad de producir, a través de ciclos relativamente cortos y bajo condiciones controladas y asépticas, individuos con características superiores tales como alta productividad, resistencia a plagas y condiciones ambientales adversas o bien la producción de alguna sustancia específica, así mismo se busca obtener líneas celulares o plantas homogéneas que sirven como modelos biológicos en donde se puedan estudiar distintos fenómenos fisiológicos (Reinert, Bajaj y Zbell, 1977).

Es por esto que en el presente trabajo se utilizó al cultivo de tejidos como una herramienta para establecer un sistema de regeneración para *N. alata* la cual es autoincompatible, esto es un sistema genético de reconocimiento específico del polen conocido como sistema de autoincompatibilidad (AI). Esta es la incapacidad de las plantas hermafroditas fértiles para producir cigotos después de la autopolinización (de Nettancourt, 1977). Las solanáceas presentan una autoincompatibilidad gametofítica (AIG) en donde el comportamiento del polen está determinado por su propio genotipo. La AIG está controlada por un locus multialélico llamado locus S, que codifica para una ribonucleasa (determinante femenina) y la proteína SLF (determinante masculina), los determinantes deben interactuar en el citoplasma del tubo polínico para que se lleve a cabo el rechazo del polen (McClure et al., 2000).

Dentro del campo de la Biología Molecular se ha logrado introducir genes a diferentes especies vegetales. Las plantas que se han modificado genéticamente han sido en su mayoría las dicotiledóneas; una de las más

estudiadas ha sido sin duda el tabaco (*Nicotiana tabacum*) que ha servido como modelo biológico para diversos estudios.

La transformación genética de la planta ha sido una herramienta invaluable para estudiar la regulación génica de fenómenos fisiológicos a nivel molecular, bioquímico y fisiológico, tal es el caso de la autoincompatibilidad gametofítica, la cual es un mecanismo ampliamente distribuido en el reino vegetal que en la mayoría de los casos se ha determinado que está controlado por un locus multialélico llamado locus-S, el cual es el responsable de la autofecundación provocando así la polinización cruzada. Varias familias presentan este fenómeno, tales como las Solanaceae, Scrophulariaceae y Rosaceae, se ha comprobado que dichas familias contienen en su genoma el locus-S el cual presenta a al menos dos genes ligados, uno codifica a una glicoproteína con actividad ribonucleasa en los pistilos (S-RNasas) y el otro, recientemente identificado, es un gen F-box expresado específicamente en polen (SLF o SFB) (McCubbin, A.G y Kao T-H. 1996)

Aún cuando en los últimos años se han logrado grandes avances en esta materia, el mecanismo subyacente dista de estar completamente dilucidado. Los últimos trabajos realizados han arrojado algo de luz pero simultáneamente han abierto nuevos interrogantes. Es por ello que las plantas transgénicas son un sistema de expresión genética viable y muchas veces preferible para la obtención de mutante o micropropagación de plantas con autoincompatibilidad, el cual resulta el único sistema capaz de mantener clones de un mismo genotipo.

Entre los modelos más conocidos en la transformación genética es sin duda el tabaco, él cual se ha utilizado ampliamente como modelo biológico. Dicha especie fue transformada por primera vez introduciéndosele el gen de la luciferasa que codifica para la proteína luciferina, la cual al estar en contacto con su sustrato y en presencia de oxígeno y ATP produce bioluminiscencia como lo hacen las luciérnagas. El gen de la luciferasa fue clonado en *E. coli* y luego empalmado en el cromosoma de un virus vegetal, lo cual le suministró una secuencia regulatoria. El cromosoma viral modificado se insertó en

plásmidos de *Agrobacterium tumefaciens* los cuales fueron transferidos a las bacterias y las bacterias se incubaron con células foliares del tabaco, las células formaron una masa de tejido conocido como callo, a partir del cual se obtuvieron nuevas plantas en medio de crecimiento adecuado, las nuevas plantas fueron regadas una solución de luciferina y las plantas resplandecían. Dicho trabajo fue realizado por las Universidades de California y San Diego por Moses, Phyllis B y Nam-Hai Chua; quienes aislaron el gen para la enzima luciferasa de las luciérnagas.

II. OBJETIVO GENERAL

Establecer protocolos de regeneración y transformación de plantas de dos especies de tabaco (*Nicotiana alata* y *Nicotiana plumbaginifolia*) bajo condiciones *in vitro*.

2.1 OBJETIVOS PARTICULARES

DE LA PRIMERA PARTE

1. Establecer los protocolos generales para la regeneración de *Nicotiana alata* y *Nicotiana plumbaginifolia*
2. Determinar el medio de cultivo para la obtención de brotes adventicios para *Nicotiana alata*. Así como de *Nicotiana plumbaginifolia* a través de:
 - a) Probar diferentes medios de cultivo con base a las vitaminas.
 - b) Elegir la mejor concentración y combinación de hormonas a través de un gradiente hormonal.
 - c) Optimizar fuente de carbono (sacarosa) en los medios de cultivo.
 - d) Establecer los protocolos en cuanto a tiempo, medios de cultivo y etapa morfogénica.

DE LA SEGUNDA PARTE

1. Determinar la concentración de kanamicina máxima para la transformación genética de las especies *Nicotiana alata* y *Nicotiana plumbaginifolia*.
2. Determinar el método adecuado para la transformación genética y regeneración de ambas especies.

III. ANTECEDENTES GENERALES

3.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA, CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS Y ORIGEN DE *N. alata* y *N. plumbaginifolia*

Las especies *N. alata* y *N. plumbaginifolia* son plantas que pertenecen al género *Nicotiana* división Magnoliophyta, clase Magnoliopsida, orden Polemoniales de la familia *Solanaceae*, (ver cuadro 1) muchas especies son hierbas nativas de América sin embargo hay muy pocas en América del Norte, la mayoría de las especies se encuentran al sur de Pacífico, Australia y sureste de África. Muchos cultivos producen fragancias al florecer que abren usualmente en la noche. A nivel comercial el tabaco se obtiene principalmente de las hojas de *N. tabacum*. Otras *nicotianas* han sido usadas como insecticidas para la producción de cigarros y recientemente como modelo biológico en investigaciones de bioingeniería y como ornato.

Cuadro No. 1. Clasificación taxonómica de *N. alata* y *N. plumbaginifolia*

Reino Plantae - plantas
Subreino Tracheobionta - plantas vasculares
Superdivisión Spermatophyta - Semillas de plantas
División Magnoliophyta - Plantas con flor
Clase Magnoliopsida - Dicotyledoneas
Subclase Asteridae
Orden Solanales
Familia Solanaceae - Papa familia
Género <i>Nicotiana</i> L. - tabaco
Especie <i>Nicotiana plumbaginifolia</i> - Tex Mex
Especie <i>Nicotiana alata</i> Link & Otto - Jazmín tabaco

El tabaco es una planta dicotiledónea que rebrota al cortarse. Suele cultivarse como planta anual, aunque en los climas de origen puede durar varios años, pudiendo alcanzar el tallo hasta dos metros de altura (ver figura 1).

-Hojas: Son lanceoladas, alternas, sentadas o pecioladas.

-Flores: Hermafroditas, frecuentemente regulares. *Nicotiana alata* Link & Otto - jazmín tabaco.

-Corola: En forma de tubo más o menos hinchado, terminado por un limbo con 5 lóbulos.

-Raíces: El sistema radicular es penetrante, aunque la mayoría de las raíces finas se encuentran en el horizonte más fértil.

-Fruto: Cápsula recubierta por un cáliz persistente, que se abre en su vértice por dos valvas bífidas.

-Semillas: Son numerosas, pequeñas y con tegumentos de relieves sinuosos más o menos acentuados.



Fig. 1. (A) *Nicotiana alata* y (B) *Nicotiana plumbaginifolia*

Las plantas de *N. alata* y *N. plumbaginifolia* llegaron a Europa desde América, al igual que la patata o el maíz. Tras ser condenada por La Inquisición, se puso de moda en el siglo XVI, primero como planta ornamental y después por el uso medicinal y lúdico de sus hojas secas.

3.2 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y IMPORTANCIA ECONÓMICA

Las dos especies, *N. alata* y *N. plumbaginifolia*, presentan una distribución geográfica distinta como se puede apreciar en la figura 2. Estas especies se pueden encontrar principalmente en América de Norte, sin embargo en la actualidad en cualquier país se puede encontrar en forma cultivable ya que su

uso principal es industrial y ornamental; y a últimas fechas, han tomado gran relevancia por ser utilizadas como modelos biológicos en la investigación molecular.

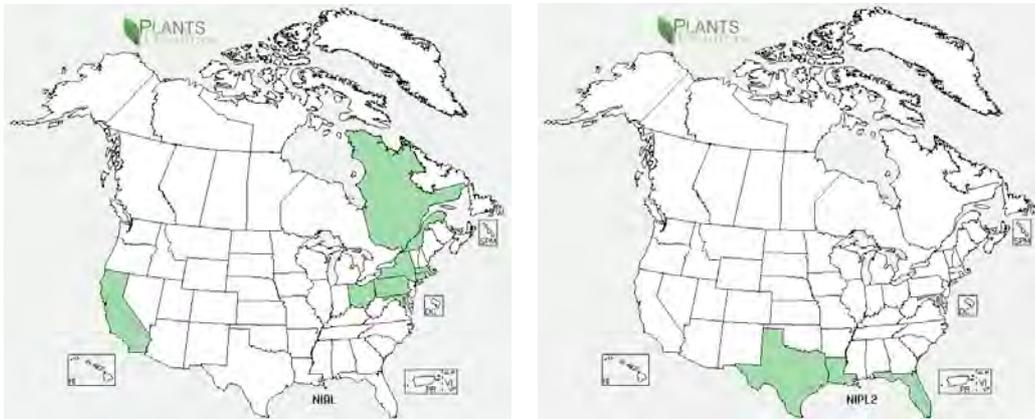


Fig. 2. Distribución geográfica de (A) *N. alata* y (B) *N. plumbaginifolia*

3.3. Autoincompatibilidad

Muchas especies de angiospermas producen flores hermafroditas, esto es que en la misma flor se presentan tanto en el órgano masculino (antera) como el órgano femenino (pistilo) (Kao y Cubbin., 1996). Esta proximidad podría favorecer que en una flor los granos de polen producidos por las anteras lleguen a la superficie estigmática en el pistilo. Para evitar esto las plantas han evolucionado con mecanismos morfológicos, fisiológicos y genéticos que les permiten en muchos casos evitar la autofecundación; ya que si esto ocurriera las poblaciones podrían experimentar una depresión genética.

Uno de los mecanismos genéticos generados para prevenir la autofecundación es la autoincompatibilidad (AI). Este ha sido definido por Nettacourt (1977) como la incapacidad de las plantas hermafroditas fértiles para producir cigotos después de la autopolinización. La AI le permite al pistilo reconocer y rechazar el polen propio o el polen de individuos genéticamente relacionados para así prevenir las cruza “consanguíneas” y promover la polinización cruzada, además de mantener la diversidad genética (McCubbin et al., 2000).

Algunas plantas con AI producen flores con características morfológicas distintas (heteromórficas) en las cuales la posición de los órganos

reproductivos dentro de la misma flor se presenta como una barrera para la autofecundación (Kao y McCubbin, 1996; Ebert et al. 1998).

IV. CAPITULO I

“ESTABLECIMIENTO DE PROTOCOLOS PARA LA REGENERACIÓN DE DOS ESPECIES DE NICOTIANAS *N. alata* Y *N. plumbaginifolia*”

4.1 ANTECEDENTES

4.1.1. CULTIVO IN VITRO DE PLANTAS

El Cultivo de Tejidos Vegetales es un conjunto de técnicas biotecnológicas que ha contribuido importantemente tanto para generar tecnología como para el estudio básico de procesos fisiológicos y celulares. Estas técnicas se basan en la teoría celular de Schwann y Schleiden (1938-39) en donde consideran a la célula como la unidad biológica más pequeña a la que se puede considerar totipotente, y capaz de generar una planta completa.

El Cultivo de tejidos utiliza esta totipotencialidad, la cual se puede definir como la habilidad que tienen las células para generar un individuo genéticamente idéntico al que le dio origen, bajo condiciones asépticas y controladas, tanto ambientales como nutricionales.

Para George y Sherrington (1984) el término de cultivo de tejidos es utilizado generalmente, para describir los protocolos de cultivos *in vitro* de plantas, aunque estrictamente se refieren en exclusiva a los agregados celulares desorganizados, así como a la inducción de algún tipo de órgano. Estos autores George y Sherrington, reconocen tipos de cultivos tales como: callos, en suspensión, de protoplastos, de anteras y de órganos.

4.1.1.1 VÍAS REGENERATIVAS

Dentro del Cultivo de Tejidos, se puede lograr la regeneración de plantas completas a través de dos procesos morfogénéticos: organogénesis y embriogénesis somática. El primero permite la diferenciación de órganos a través de brotes adventicios, formación de hojas, la diferenciación de raíces y

otros órganos. Mientras que la embriogénesis somática es el proceso por el cual se obtiene una planta completa en un mismo momento. La organogénesis se ha reportado en un gran número de especies dicotiledóneas y en un menor porcentaje en especies monocotiledóneas, debido a que las especies dicotiledóneas presentan mayor capacidad morfogénica, esto es tienen mayor plasticidad las células meristemáticas y pueden producir mayor número de brotes en menor tiempo. En el caso de la embriogénesis somática también se ha reportado en especies dicotiledóneas, sin embargo es la ruta morfogénica más utilizada en las monocotiledóneas, en esta división se pueden encontrar un gran número de especies recalcitrantes, lo que significa que es muy difícil su regeneración y, en especial por la vía de la organogénesis.

ORGANOGENESIS

Por definición, la organogénesis es la formación de brotes directamente de una parte de la planta a partir de rudimentos de yemas.

La organogénesis tiene lugar en forma directa como indirecta, en el caso de la vía directa, se dice que existen células predeterminadas en zonas meristemáticas del explante (hojas, tallos, segmentos de flores, meristemas, etc.) que en presencia de una citocinina, se desarrollan brotes adventicios Sherrington (1984).

Para la organogénesis indirecta se requiere de un proceso previo, la formación de callo, el cual es una masa amorfa de células que crecen en forma desorganizada, sin tener polaridad definida. Se ha encontrado que las células son desorganizadas porque no siguen un patrón de división celular, inician su organización a partir de células competentes, las cuales darán origen a brotes, los cuales tendrán se individualizan y se transfieren a un nuevo medio para su desarrollo y establecimiento, todo esto se logra en presencia de citocininas en combinación con una auxina débil, así mismo se ha visto que los niveles de sacarosa y algunos aminoácidos contribuyen a la organización de dichas

células. El origen de los órganos es pluricelular (Su, 2002; George y Sherrington, 1984; Butcher and Ingram, 1990).

Las etapas de la organogénesis son: inducción de brotes, proliferación, alargamiento y enraizado de brotes Dimitri, M. 1987.

Factores que influyen en la organogénesis

1) Medios de cultivo y reguladores de crecimiento

Los callos son generalmente más capaces de regenerar raíces, que vástagos adventicios. La inducción de raíces generalmente tiene lugar en medios con concentraciones de auxinas relativamente altas y bajas concentraciones de citocininas.

El nombre auxina significa en griego 'crecer' y es dado a un grupo de compuestos que estimulan el alargamiento celular; la auxina se encuentra en toda la planta, la más altas concentraciones se localizan en las regiones meristemáticas en crecimiento activo. Se le encuentra tanto como molécula libre o en formas conjugadas inactivas. Cuando se encuentran conjugadas, la auxina se encuentra metabólicamente unida a otros compuestos de bajo peso molecular; este proceso parece ser reversible.

La concentración de auxina libre en plantas varía de 1 a 100 mg/kg peso fresco. En contraste, la concentración de auxina conjugada ha sido demostrada en ocasiones que es sustancialmente más elevada.

Una característica sorprendente de la auxina es la fuerte polaridad exhibida en su transporte a través de la planta. La auxina es transportada por medio de un mecanismo dependiente de energía. Este flujo de auxina reprime el desarrollo de brotes axilares laterales a lo largo del tallo, manteniendo de esta forma la dominancia.

El movimiento de la auxina fuera de la lámina foliar hacia la base del pecíolo parece también prevenir la abscisión.

La auxina ha sido implicada en la regulación de un número de procesos fisiológicos.

- Promueve el crecimiento y diferenciación celular, y por lo tanto en el crecimiento en longitud de la planta.
- Estimulan el crecimiento y maduración de frutas.
- Floración
- Senectud
- Geotropismo
- La auxina se dirige a la zona oscura de la planta, produciendo que las células de esa zona crezcan más que las correspondientes células que se encuentran en la zona clara de la planta. Esto produce una curvatura de la punta de la planta hacia la luz, movimiento que se conoce como fototropismo.
- Retardan la caída de hojas, flores y frutos jóvenes.
- Dominancia apical.

El efecto inicial preciso de la hormona que subsecuentemente regula este arreglo diverso de eventos fisiológicos no es aún conocido. Durante la elongación celular inducida por la auxina se piensa que actúa por medio de un efecto rápido sobre el mecanismo de la bomba de protones *ATPasa* en la membrana plasmática, y un efecto secundario mediado por la síntesis de enzimas (Sherrington 1984).

Las citocininas son hormonas vegetales naturales que estimulan la división celular en tejidos no meristemáticos. Inicialmente fueron llamadas quininas, sin embargo, debido al uso anterior del nombre para un grupo de compuestos de la fisiología animal, se adaptó el término citocinina (citocinesis o división celular). Son producidas en las zonas de crecimiento, como los meristemas en la punta de las raíces. La zeatina es una hormona de esta clase y se encuentra en el maíz (*Zea*). Las mayores concentraciones de citocininas se encuentran en embriones y frutas jóvenes en desarrollo, ambos sufriendo una rápida división celular. La presencia de altos niveles de citocininas puede facilitar su habilidad de actuar como una fuente demandante de nutrientes. Las citocininas también

se sintetizan en las raíces y son translocadas a través del xilema hasta el brote. Sin embargo, cuando los compuestos se encuentran en las hojas son relativamente inmóviles.

Otros efectos generales de las citocininas en plantas incluyen:

- Estimulación de la germinación de semillas.
- Estimulación de la formación de frutas sin semillas.
- Ruptura de letargo de semillas.
- Inducción de la formación de brotes.
- Mejora de la floración.
- Alteración en el crecimiento de frutos.
- Ruptura de la dominancia apical

La formación de vástagos puede producirse, si existe una baja concentración de auxinas y una alta concentración de citocininas.

2) Luz

El requerimiento de luz para la inducción de brotes es elevado (Pierik, 1990). Este factor estimula el desarrollo en la mayoría de los casos, aunque existen especies que en condiciones de oscuridad se favorece la formación de vástagos. En la inducción de raíces la presencia de luz puede disminuir su aparición ya que las condiciones de oscuridad podrían semejar a las condiciones de suelo en las que se desarrolla la planta en forma natural (Herman, 1995; Razdan 2003).

3) Temperatura

Al igual que la luz, las temperaturas elevadas estimulan la formación de brotes (Pierik, 1990), la misma que requiera la planta en su hábitat natural, aproximadamente 30° C (Herman, 1995).

4) Explantes a utilizar

En la mayoría de los casos la formación de órganos se induce con mayor facilidad en plantas jóvenes que en plantas adultas (Su 2002; Pierik 1990; Lindsey y Jones 1989; George y Sherrington 1984).

En las plantas cualquier segmento tiene capacidad regenerativa; se pueden presentar ciertos factores que pueden influenciar en esta regeneración tales como: la edad de la planta donadora, la zona donde se obtenga, el tamaño y el tipo de órgano (Scwarz y Beaty , 2000).

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

La embriogénesis somática es el proceso mediante el cual las células somáticas se desarrollan y dan origen a plantas completas a través de estados embriogénicos característicos (globular, corazón y torpedo), sin que ocurra la fusión de gametos (Williams & Maheswaran, 1986. citados por Fransz & Aschel, 1991a).

Este fenómeno ha sido observado de manera frecuente, en muchas especies y familias lo que demostrar que no es un proceso fisiológico restringido a unos cuantos “grupos”. Por lo tanto, existe la posibilidad de que las células de cualquier planta bajo el estímulo y las condiciones adecuadas puedan ser inducidas a manifestar un patrón embriogénico (Ammirato 1983).

De hecho son más numerosos los fenotipos celulares que presentan embriogénesis somática *in vitro* que aquellos que la presentan *in vivo*.

Al igual que en la organogénesis, la embriogénesis puede presentarse en forma directa o indirecta. En el primer caso, los embriones tienen origen directamente de las zonas meristemáticas del explante. En el caso de la embriogénesis somática indirecta, es necesario la proliferación de una masa amorfa de células que, en estadios tempranos tenga lugar la predeterminación de ciertas células que cambiarán su patrón de división celular para que se establezcan los dos polos, esto es que una célula se dividirá de forma que sus células hijas den origen a las zonas meristemáticas tanto de radícula como del hipocótilo.

Las principales etapas que se reconocen en la embriogénesis somática son: inducción, crecimiento temprano, maduración y germinación. El desarrollo normal de una planta depende de la interacción de varios factores.

Factores que influyen en la embriogénesis somática

1) Medios de cultivo y reguladores de crecimiento

La inducción de la embriogénesis somática depende de las auxinas usualmente 2,4-D (Su, 2002). Con frecuencia se requiere una elevada concentración de auxinas; sin embargo para el desarrollo del embrión se debe bajar la concentración y en algunos casos retirar el regulador del medio. Por otro lado, las sales inorgánicas tienen un efecto sobre la embriogénesis somática, en especial se ha demostrado que el nitrógeno reducido, en forma de iones amonio, puede ser un factor importante en la embriogénesis (Pierik, 1990; Razdan, 2003).

2) Luz

En estudios previos se ha observado que en cultivos *in vitro* de algunos cereales, cítricos y tabaco, la luz no es un factor determinante para la iniciación de embriones asexuales. Sin embargo con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad es posible la obtención de callos embriogénicos, a menos que se requiera de más hora en oscuridad de acuerdo al protocolo que se esté manejando.

3) Temperatura

Las condiciones óptimas para los cultivos *in vitro* no son necesariamente las mismas que requiere las plantas en su hábitat natural. La temperatura no es un factor crítico para la embriogénesis, aunque ésta no debe exceder los límites de 20 a 30 °C para cultivo de tejidos en general (Razdan, 2003).

4) Explantes a utilizar

La longevidad de los tejidos influye en gran medida a que estos pierden su potencial con el tiempo, posiblemente a causa de cambios cariotípicos y de

ploidías en respuestas a la presencia de auxinas, además de probables cambios epigenéticos (Pierik, 1990)

4.1.1.2 Regeneración *in vitro* de *Nicotiana alata* y *Nicotiana plumbaginifolia*

El género *Nicotiana* tiene una gran importancia en el desarrollo de nuevos fármacos, la producción de biomasa y su nivel de expresión de proteínas, ha tenido lugar principalmente en la especie *Nicotiana tabacum*, esto debido a su fácil regeneración *in vitro* con altos porcentajes de brotes por explantes, así como su fácil transformación genética. Li y Bass 2003 realizaron un estudio donde se evaluó la capacidad regenerativa de 15 especies de las 66 que están documentadas; en tal estudio se encontró que *Nicotiana alata* y *Nicotiana plumbaginifolia* presentan una diferencia en la regeneración de acuerdo al número de brotes obtenidos por organogénesis.

Se utilizaron medios de cultivo con sales inorgánicas, vitaminas B5, una auxina que es AIA (ácido indol 3- acético) y una citocinina BAP (6-Bencilamino purina), sacarosa y agar se incubaron con un fotoperiodo de 16 horas luz 8 oscuridad cada tres semanas se pasaron a medios nuevos. Obteniendo resultados no muy satisfactorios en el caso de *N. alata* se obtuvo únicamente el 6% de los explantes sembrados, en tanto que *N. plumbaginifolia* fue 96% (Li, Huang y Bass, 2003).

Ebert y Clarke 1990 utilizaron la misma combinación de reguladores de crecimiento para esta especie *N. alata*, y el medio MS (Murashige & Skoog 1962), se observó un incremento en la formación de brotes adventicios en ausencia de ANA, únicamente usando BAP a una concentración de 0.3mg/L, en tanto que para la formación de callos ANA actúa generando a este.

Para Berry y Patriak 1982 utilizan de igual manera el medio MS y ambas hormonas pero las utilizan en la cantidad de 2 mg/L de ANA y 0.5 mg/L de BAP logrando solamente un 33% de regeneración *in vitro*.

Mediante este protocolo de regeneración se obtuvieron un porcentaje de 90% de esta especie en el medio propuesto con cada uno de los compuestos que lo conforman tanto de sales, vitaminas, compuestos orgánicos y los reguladores de crecimiento.

4.1.2 MODELOS BIOLÓGICOS

El cultivo *in vitro* de cultivo de células vegetales y su rediferenciación para formar plantas completas, ha abierto un sinnúmero de posibilidades experimentales a la investigación genética en las plantas (Robert,1986); convirtiéndose en una herramienta, que se puede aplicar en botánica, genética química, resultando una técnica biotecnológica óptima para generar y caracterizar modelos biológicos en demanda de nuevos métodos que permiten cruzar las barreras impuestas por la fisiología de las especies (Sánchez, 1986).

Un modelo biológico tiene como por objetivo dar una descripción formal de la respuesta de una planta a las condiciones de su entorno, permite hacer predicciones y puede usarse para aproximar la respuesta de plantas semejantes.

Para que una planta pueda ser tomada en cuenta como un modelo biológico, debe cumplir o poseer con ciertos requisitos como son:

- Ciclo de vida corto.
- Crecimiento rápido y controlado.
- Un genoma pequeño
- Células totipotenciales.
- Capacidad para proporcionar abundante biomasa
- Importancia económica.

La utilidad que se conoce a los modelos biológicos es la de brindar conocimientos tanto en aspectos químicos y fisiológicos como las de estudiar las condiciones de inducción y producción de metabolitos, producción de

fitofármacos y transgénicos, regeneración de plantas como son las medicinales, las que están en peligro y de interés agrícola, además del económico. Ejemplo de modelos biológicos son: zanahoria (*Daucus carota L.*) como modelo para el desarrollo de embriogénesis somática; el tabaco (*Nicotiana tabacum*, *Nicotiana alata*, *Nicotiana plumbaginifolia*) para el desarrollo de plantas libres de virus y elaboración de protocolos para regeneración y transformación genética, la papa (*Solanum tuberosum*) modelo de pruebas de resistencia a *Phytophthora*, el jitomate (*Lycopersicon esculentum*); el maíz (*Zea mays*) como modelos de transformación en monocotiledóneas y dicotiledóneas y resistencia contra herbicidas. (Hernández, 2003).

4.1.3 *Nicotiana tabacum* COMO MODELO BIOLÓGICO

Nicotiana tabacum o planta de tabaco es utilizada experimentalmente como planta modelo para la transformación genética y cultivo in vitro por ser fácilmente transformable y tener una morfología y fisiología más semejante a la de cultivos agronómicos como el tomate y otras dicotiledóneas. Muchas proteínas recombinantes que se quieren expresar en plantas superiores, como así también las proteínas recombinantes de interés farmacológico (para obtener las llamadas plantas transgénicas fig.3 de tercera generación, utilizadas como fábricas de moléculas) son primero ensayadas en tabaco.

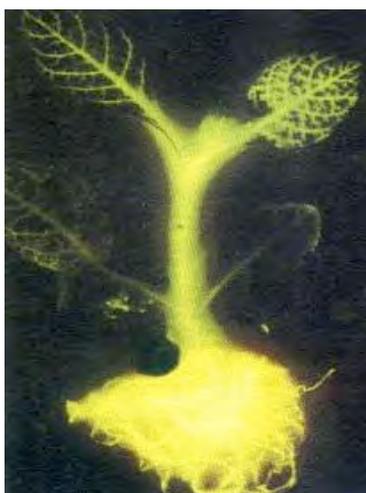
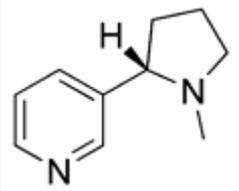


Figura 3. Planta transgénica de tabaco que expresa el gen de la luciferasa de la luciérnaga. Fuente. Science (1986) 234: 856-859

La importancia industrial de la planta de tabaco es la obtención de la **nicotina** es un compuesto orgánico, un alcaloide encontrado en la planta del tabaco (*Nicotiana tabacum*), con alta concentración en sus hojas. Constituye cerca del 5% del peso de la planta. La nicotina debe su nombre a Jean Nicot, quien introdujo el tabaco en Francia en 1560. Se sintetiza en las zonas de mayor actividad de las raíces de las plantas del tabaco, transportada por la savia a las hojas verdes. El depósito se realiza en forma de sales de ácidos orgánicos.

Es un potente veneno e incluso se usa en múltiples insecticidas (fumigantes para invernaderos). En bajas concentraciones, la sustancia es un estimulante y es uno de los principales factores de adicción al tabaco. Es soluble en agua.

Nicotina	
Nombre químico	<i>(S)</i> -3-(1-metilpirrolidin-2-il) piridina
Fórmula química	C ₁₀ H ₁₄ N ₂
Masa molecular	162.23 g/mol
Densidad	1.01 g/ml
Punto de fusión	-7.9 °C
Punto de ebullición	247 °C
Número CAS	54-555-5
Código ATC	N07B A01
	

4.4 RUTA CRÍTICA

Para el cumplimiento de los objetivos del presente trabajo se diseñó la ruta crítica mostrada en la figura 4.1.

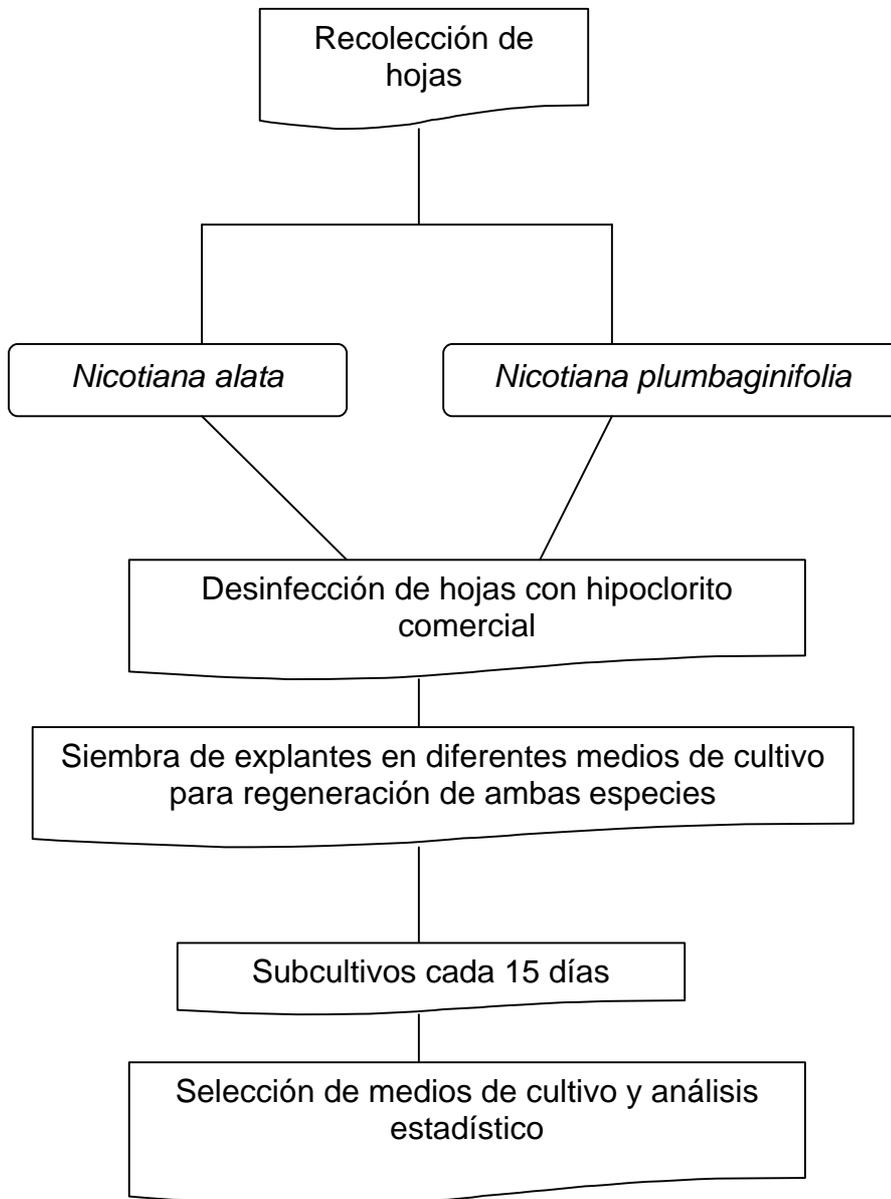


Fig. 4.1. Ruta crítica seguida para la obtención de protocolos para la regeneración de dos especies de *Nicotiana*, *N. alata* y *N. plumbaginifolia*

4.5. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron cuatro ensayos para determinar las condiciones para la regeneración de estas especies (*N. alata* y *N. plumbaginifolia*), dichos ensayos se describirán posteriormente.

4.5.1. Material biológico

La planta objeto de estudio fue *N. alata* ya que es auto incompatible y se utilizó a *N. plumbaginifolia* como control positivo ya que es una especie que no presenta dificultades para ser regenerada bajo condiciones *in vitro*.

El material biológico que se utilizó fueron hojas de tabaco *Nicotiana alata* y *Nicotiana plumbaginifolia*, provenientes de plantas de tres a ocho meses de edad, las cuales fueron crecidas bajo condiciones de invernadero.

4.5.2 Aspectos básicos

Preparación de medios de cultivo

La preparación de los medios de cultivo se realizó a partir de sales inorgánicas concentradas 100X del medio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementados con compuestos orgánicos y reguladores de crecimiento (ver anexo). Los medios se esterilizaron en una autoclave vertical a una presión de 1.2 Kg/cm², y a una temperatura 120° C, durante 18 min.

Método de desinfección de hojas y siembra de explante

El método de desinfección utilizado consistió de los siguientes pasos:

1. Cortar hojas jóvenes de plantas de tabaco (*N. alata* y *N. plumbaginifolia*) de 3 a ocho meses de edad.
2. Lavar las hojas con jabón y agua corriente durante 5 minutos.
3. Preparar una solución de hipoclorito de sodio comercial (6% de i.a) en una concentración de 6% (v/v).
4. Colocar hojas en recipientes estériles y adicionar la mezcla hipoclorito de sodio y agua.
5. Mantener en agitación por 8 minutos.
6. Lavar con agua desionizada estéril 5 veces.

7. Ya desinfectadas las hojas, se les elimina la nervadura central, así como los márgenes y se cortan fragmentos de 1cm² aproximadamente.
8. Los fragmentos se colocan en el medio de regeneración con el haz en contacto al medio y el envés hacia arriba.

Este procedimiento se lleva a cabo en condiciones asépticas dentro de una campana de flujo laminar para evitar cualquier contaminación.

Condiciones de incubación

Los cultivos se incubaron en un cuarto de incubación con ambiente controlado teniendo un fotoperiodo de 16 horas luz / 8 horas de oscuridad y a una temperatura de 25 ± 2° C.

Subcultivos

Los subcultivos se llevaron a cabo cada quince días, pasando los brotes a medio fresco. Durante el subcultivo se eliminaron los tejidos oxidados y en caso de que los brotes presentaran la altura requerida se separaban del tejido madre.

4.5.3 Primer ensayo: Vitaminas y fitoreguladores de crecimiento

En el primer ensayo se probaron diferentes medios de cultivo teniendo como base las sales del medio MS (Murashige & Skoog. 1962) y suplementados con diferentes vitaminas, y fitoreguladores de crecimiento (ver cuadro No. 3.1).

TABLA 4.1 Composición de los medios de cultivo probados para la inducción de brotes de *N. alata* y *N. plumbaginifolia*.

COMPUESTO	Medios de Cultivo (mg.L ⁻¹)			
	MEDIONAP-1	MEDIO NAP-2	MEDIO NAP-3	MEDIO NAP-4
Sales inorgánicas MS	X	X	X	X
Vitaminas	Cock-20	Nich	R ₂	B ₅

BAP	-----	-----	2.0	2.0
AIA	1.5	-----	-----	-----
Zip	-----	2.0	-----	-----
Kinetina	6.0	-----		
ANA	-----	-----	1.0	0.1

x: elementos que contienen los medios probados

4.5.4 Segundo ensayo: Vitaminas

Para el segundo ensayo se tomaron los medios donde se obtuvo la mayor regeneración de ambas especies a partir de la cuantificación de brotes y la calidad de ellos tomando a estos como control con respecto a otros medios, donde la variante fueron los componentes orgánicos, esto es las vitaminas utilizadas (ver cuadro 4. 2)

CUADRO No. 4.2 Medios utilizados en la inducción de brotes probando diferentes vitaminas.

SALES	Medios de Cultivo (mg.L ⁻¹)			
	NAP3	NAP4	NAP5	NAP6
MS	+	+	+	+
Vit R2	+	-	-	+
Vit B5	-	+	+	-
ANA	1.0	0.1	1.0	0.1
BAP	2	2	2	2
Antioxidante	+	+	+	+
sacarosa	+	+	+	+
Gellan	+	+	+	+

4.5.5 Tercer Ensayo: Barrido hormonal

Teniendo seleccionado el medio de acuerdo de sus componentes orgánicos se realizó como tercer ensayo un barrido hormonal (ver cuadro No. 4.3) para determinar la influencia de los fitoreguladores en la inducción y alargamiento de brotes adventicios de ambas plantas.

CUADRO No. 4.3 Medios utilizados para la inducción de brotes probando diferentes concentración y combinación de los reguladores de crecimiento.

SALES	Medios de Cultivo (mg.L ⁻¹)						
	NAP6-1	NAP6-2	NAP6-3	NAP6-4	NAP6-5	NAP6-6	NAP6-7
MS	+	+	+	+	+	+	+
Vit R2	+	+	+	+	+	+	+
ANA	-	0.1	0.1	0.25	0.5	0.75	1
BAP	2	-	2	2	2	2	2
Antioxidante	+	+	+	+	+	+	+
sacarosa	+	+	+	+	+	+	+
Gellan	+	+	+	+	+	+	+

4.5.6 Cuarto ensayo: Sacarosa

En el cuarto y último ensayo de esta primera parte se determinó la cantidad de sacarosa adecuada ya que es la principal fuente de carbono para las plantas (ver cuadro 4.4).

CUADRO No. 4.4 Medios probados en la inducción de brotes variando la concentración de azúcar.

SALES	Medios de Cultivo (mg.L ⁻¹)				
	NAP6-3-1	NAP6-3-2	NAP6-3-3	NAP6-3-4	NAP6-3-5
MS	+	+	+	+	+
Vit R2	+	+	+	+	+
ANA	0.1 ¹	0.1 ¹	0.1 ¹	0.1 ¹	0.1 ¹
BAP	2 ¹	2 ¹	2 ¹	2 ¹	2 ¹
Antioxidante	+	+	+	+	+
Sacarosa*	15	20	25	30	35
Gellan	+	+	+	+	+

*g.L⁻¹

4.5.7 Análisis Estadístico

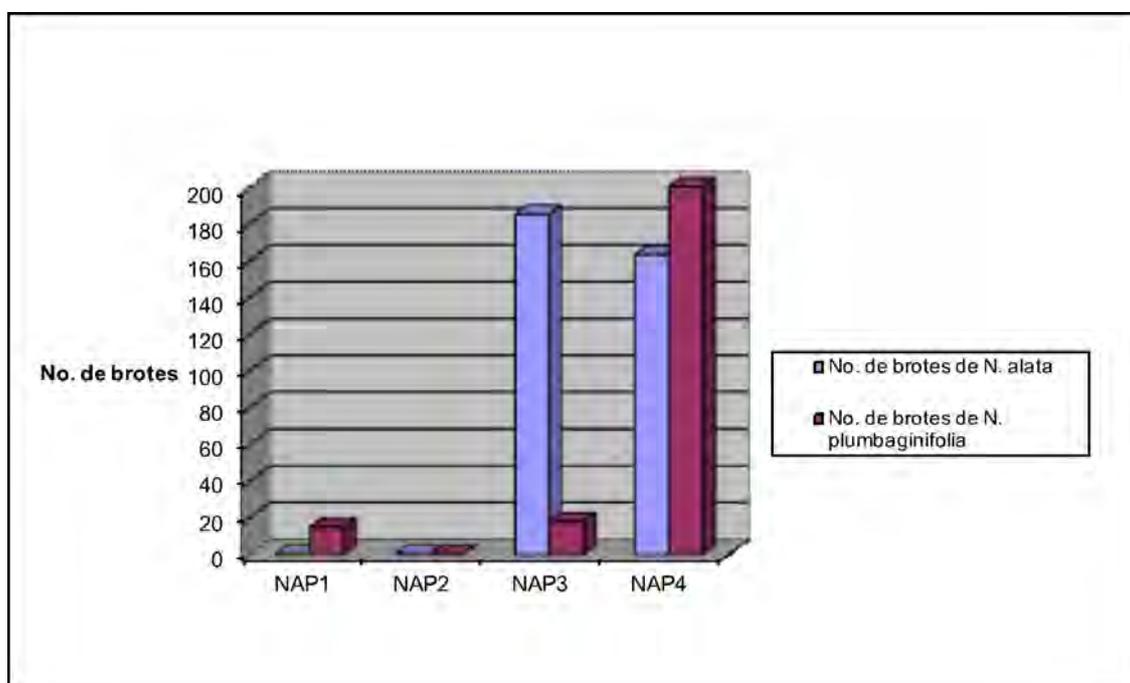
Después de los 45 días de incubación de los explantes (cuando se hicieron evidentes los brotes) se llevaron a cabo observaciones determinándose el número de brotes totales, para tener este resultado fue necesario realizar observaciones cada 15 días y con los datos obtenidos se realizó un análisis estadístico de dichos datos, a través de una prueba de ANOVA y t modificada (Duncan).

4.6 RESULTADOS

Primer ensayo: Vitaminas y fitoreguladores de crecimiento

Los resultados obtenidos en el primer ensayo se pueden observar en la gráfica No. 4.1 en donde se aprecia que hubo una respuesta diferencial al comparar los medios y las especies. En el caso de los medios NAP1 y NAP2 la respuesta fue muy pobre para ambas especies. En el primer medio sólo se logró obtener un total de 15 brotes para *N. plumbaginifolia* mientras que para *N. alata* no se logró la regeneración de ningún brote. En el caso del medio NAP2 la oxidación fue el factor limitante pues todos los explantes sembrados murieron en ambas especies. En los medios NAP3 y NAP4 se registró una respuesta en la inducción de brotes ya que en el primero se obtuvo un total de 185 brotes en

Nicotiana alata mientras que en *Nicotiana plumbaginifolia* el estímulo fue menor al registrarse sólo un total de 18 brotes. El medio NAP4 fue el de mejor respuesta en ambas especies aún cuando entre ellas presentaron diferencias; para *Nicotiana plumbaginifolia* el número de brotes obtenidos fue incontable y en *Nicotiana alata*, se registró un total de 158 brotes. En el primer ensayo se logró observar diferencias significativas entre las especies pero estadísticamente entre los medios NAP3 y NAP4 no se observa diferencia significativa.



Gráfica No 4.1 Número de brotes totales obtenidos en los medios NAP1, NAP2, NAP3 y NAP4 de ambas especies.

En la figura No. 4.1 se puede observar la respuesta diferencial en *N. plumbaginifolia* en los tres medios de cultivo. En el medio NAP1 se aprecia que el explante sólo se hidrata e hincha poco. En el caso del medio NAP3 se logran diferenciar algunos brotes, pero éstos tienen una apariencia cristalina, esto debido a la hiperhidratación que presentan. En el medio NAP4 los brotes, que son un número mucho mayor que los otros medios, no presentan una vitrificación, y logran un desarrollo normal.



Figura No. 4.1 Brotes de *N. plumbaginifolia* obtenidos de medios NAP1, NAP3 y NAP4

En la figura No.4.2 se puede observar el desarrollo de los brotes que fue normal también en el medio NAP3 pero en menor cantidad que los registrados en NAP4.



Figura No. 4.2 Brotes de *N. alata* obtenidos del medio NAP3

Debido a que solamente se registraron brotes adventicios en los medios NAP3 y NAP4 el análisis estadístico (análisis de varianza) se realizó para estos medios. En el cuadro 4.5 se presentan los componentes del Análisis de Varianza prueba de Fisher para *N. alata*, observándose que no hay diferencias significativas por lo que el medio NAP3 y NAP4 son iguales en cuanto a su respuesta morfogénicas; en el caso de *N. plumbaginifolia* no hubo necesidad de hacer un Análisis de Varianza ya que los brotes obtenidos fueron incontables en ambos medios de cultivo.

Cuadro No. 4.5 Componentes del análisis de Varianza de prueba de Fisher para los medios NAP3 y NAP4

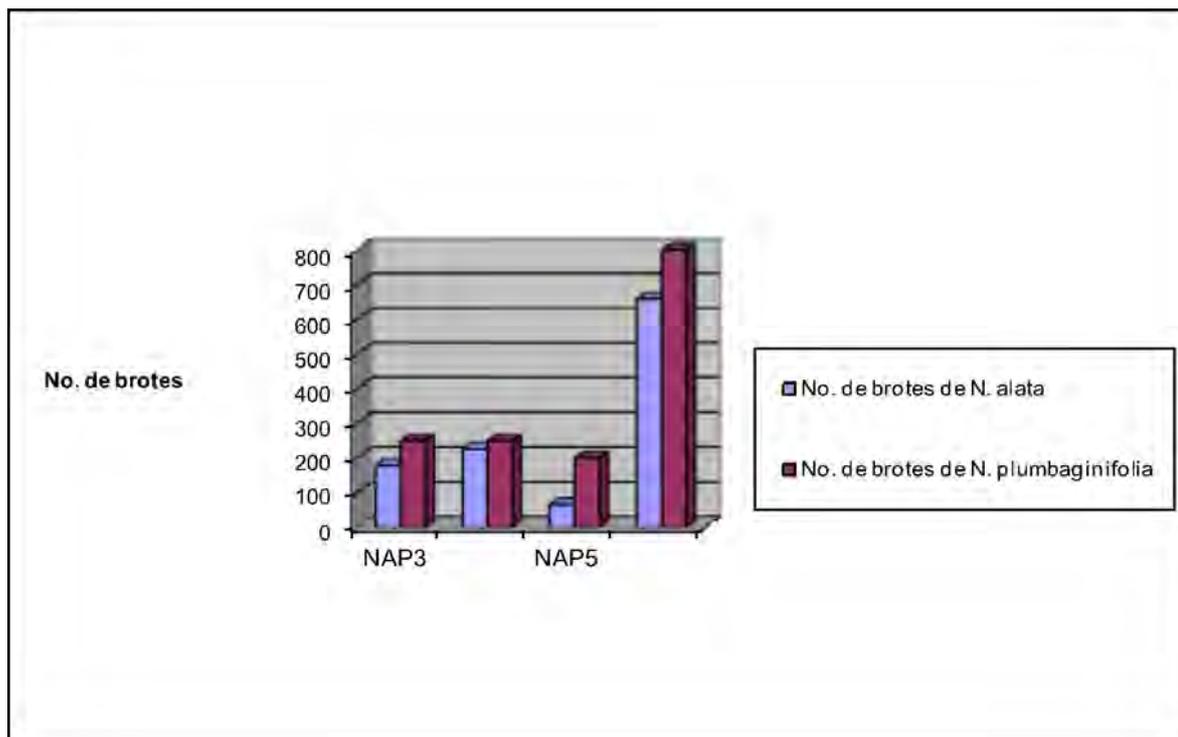
Efectos significativos	Con $p < 0.05$							
	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	S.C medios	g.l del error	CM del error	F	p
Entre medios	60.5	1	60.5	1985.5	6	330.9	0.18	5.9

H_0 = medio NAP4 es igual NAP3;

H_1 = medio NAP4 es diferente NAP3

Segundo ensayo: Vitaminas y concentración de ANA

En el segundo ensayo se realizaron las modificaciones de acuerdo a su composición orgánica, específicamente en vitaminas (tabla 4.2). En este ensayo los resultados obtenidos se presentan en la gráfica No. 4.2 de acuerdo a los dos medios seleccionados del primer ensayo NAP3 y NAP4 y los medios probados NAP5 y NAP6 donde éste último supera en número de brotes de ambas especies a los demás medios, ya que para *N. alata* se obtuvieron 658 brotes adventicios e incontables en *N. plumbaginifolia*, superando la producción de brotes en un margen mayor al 300%. En cuanto a los medios restantes, para *N. alata* sólo se obtuvieron 179 en el medio NAP3, cantidad menor que la registrada para NAP4 que fueron 226 y para NAP5 tan sólo se contabilizaron 66. En el caso de *N. plumbaginifolia* fueron incontables los brotes obtenidos en todos los medios, por lo que el análisis estadístico sólo se realizó para *N. alata*.



Gráfica No. 4.2 Número de brotes totales obtenidos en los medios NAP3, NAP4, NAP5 y NAP6

En la figura 4.3 se observa que los explante presenta crecimiento y la formación de callo el medio NAP6 destacándose el tamaño obtenido en la parte inferior y una coloración más intensa. En el caso del medio NAP 3 los explantes son un poco más pequeños y presentan una ligera oxidación en los bordes.



Figura No.4.3 Explantes de *N. alata* de medio NAP6 y NAP3

En la figura No. 4.4 se observan los explantes sembrados en el medio NAP4 los cuales se encuentran ligeramente más grandes y sin oxidación evidente en

las hojas, así mismo se presenta un crecimiento de callo en los bordes de los explantes, en tanto que en el medio NAP 5 no hay crecimiento del explante y presenta una ligera oxidación en los bordes.



Figura No. 4.4 Explantes de *N. alata* de medio NAP4 y NAP5

En la figura No.4.5 se muestra una planta de *N. alata* regenerada en el medio NAP4. Las plantas regeneradas en este medio se caracterizaron por ser vigorosas, sin vitrificación y con raíces vigorosas y abundantes.



Figura No. 4.5 planta de *N. alata* obtenida de medio NAP4

De acuerdo al análisis estadístico (cuadro No. 4.6) los medios NAP3, NAP4, NAP5 presentan diferencias significativas con respecto al medio NAP6 el cual contiene en su composición las vitamina MS modificadas y la misma concentración de sales y reguladores de crecimiento que NAP4 mostrando así que hay un efecto sinérgico entre los compuestos de la vitamina MS modificadas (ver anexos) y la concentración hormonal ya que se obtiene mayor número de brotes diferenciados.

Cuadro No. 4.6 Componentes del Análisis de Varianza prueba de Fisher para los medios NAP3, NAP4, NAP5 y NAP6

Efectos significativos	Con $p < 0.05000$								
	Medios	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	S.C medios	g.l del error	CM del error	F	p
Entre medios	25222.01	3	8407.36	16010.38	28	571.79	14.03	2	.95

$H_0 = \text{medio NAP3} = \text{NAP4} = \text{NAP5} = \text{NAP6}$;

$H_1 = \text{medio NAP3 diferente NAP4 diferente NAP5 diferente NAP6}$

Ya que el análisis de varianza demostró que hay diferencias significativas entre los medios, entonces se procedió a realizar una prueba de Duncan.

Promedios:

$T_1 = 22.37$ $T_2 = 28.25$ $T_3 = 8.25$ $T_4 = 82.25$

$S_y = 8.45$

$r_{0.05}(2,28) = 2.90$

$r_{0.05}(3,28) = 3.04$

$r_{0.05}(4,28) = 3.13$

$R_{p2} = 2.90 * 8.45 = 24.505$

$R_{p3} = 3.04 * 8.45 = 25.688$

$R_{p4} = 3.15 * 8.45 = 26.617$

Matriz diferencial

	T3	T1	T2	T4
T3		14.2	20	74
T1			5.88	59.4
T2				54
T4				

Los valores de cada matriz se comparan con los valores obtenidos de R_p
 R_{p4} {T4 es diferente a T3}

R_{p3} T2 = T3

T4 es diferente a T1

R_{p2} T4 es diferente a T2

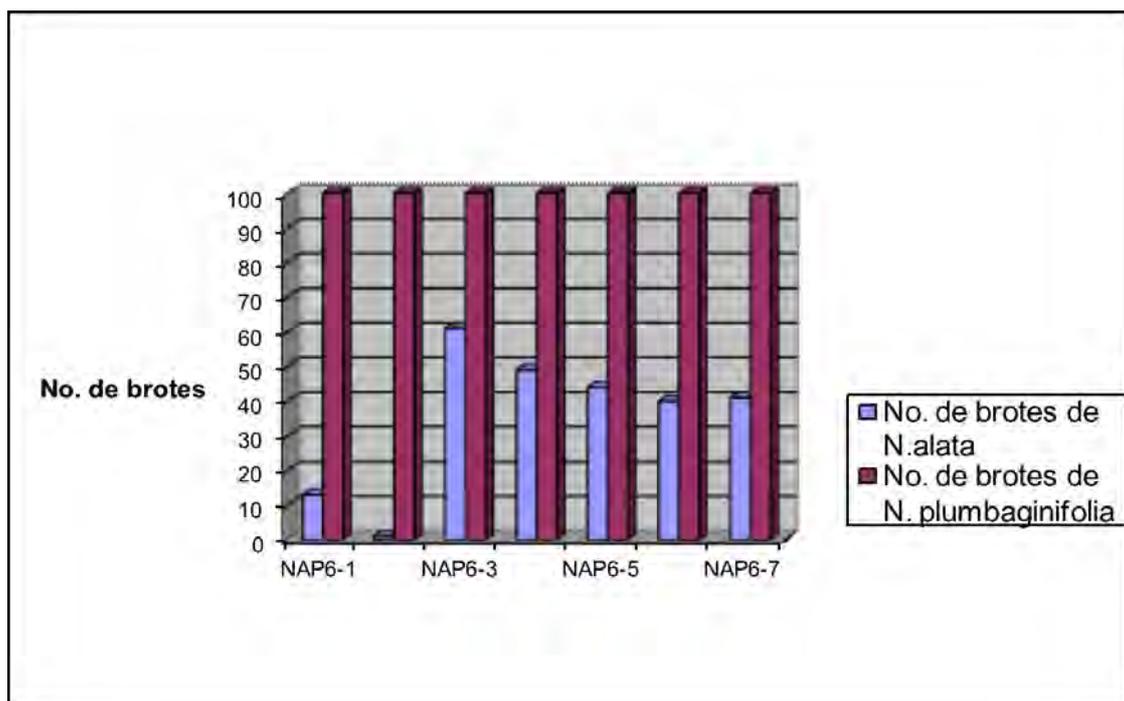
$$T2 = T1$$
$$T1 = T3$$

Tercer ensayo: Barrido hormonal

En el tercer ensayo se observa que el medio más adecuado fue el NAP6-3 donde se observa un mayor número de brotes como se observa en la gráfica No. 3 donde el medio más adecuado para *N. alata* fue el medio NAP6-3 de acuerdo la cantidad de brotes obtenidos que fueron 61 con el medio NAP6-2 donde sólo se obtuvo un brote y el medio NAP6-1 13 brotes, en tanto para *N. plumbaginifolia* no hay cambios, es una especie que no tiene problemas para la regeneración in vitro; se esperaba este resultado porque estos medios carecen de reguladores exógenos que tienen funciones específicas para el desarrollo de las plantas in vitro.

La formación de brotes o callo se debe a la cantidad de fitoreguladores endógenos presentes en la planta, en tanto para *N.alata* en el medio NAP6-4 se obtuvieron 49 brotes muy similares al medio NAP6-3, para NAP6-5 se obtuvieron 44 brotes, para NAP6-6, 40 brotes y para NAP6-7, 41 brotes observando que no hay variación de brotes obtenidos en los tres medios; la diferencia es entre los brotes, cada brote de estos medios presentan una morfología no distinta pero sí algunos cambios en el tamaño de la hoja, como el color, el tiempo de crecimiento de raíz y la rigidez de la estructura del tallo, observando esto en *N. alata* ya que para *N. plumbaginifolia* fueron incontables.

En el análisis estadístico no fue significativo ya que solamente se observan diferencias significativas de los medios con respecto a NAP6-1 y NAP6-2 los cuales carecen de uno de los reguladores (citocinina y auxina respectivamente) en tanto en los otros medios no hay diferencia, se decidió por el medio NAP6-3 por la regeneración de los brotes no en cuantificación sino en la capacidad de diferenciación de éstos dando una cantidad adecuada y hojas bien formadas.



Gráfica No. 4.3 Cuantificación de brotes provenientes de medios de cultivo con variaciones de concentración de reguladores de crecimiento

Cuadro No. 4.7 Componentes del Análisis de Varianza prueba de Fisher para los medios NAP6-1, NAP6-2, NAP6-3, NAP6-4, NAP6-5, NAP6-7

Efectos significativos	Con $p < 0.05000$							
	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	S.C medios	g.l del error	CM del error	F	p
Entre medios	937.28	6	156.21	476.72	15	31.78	4.91	2.79

H0 =medios NAP6-1 NAP6-2 = NAP6-3 = NAP6-4 NAP6-5 = NAP6-6 = NAP6-7
H1 =medios NAP6-1, NAP6-2, NAP6-3, NAP6-4, NAP6-5, NAP6-6, NAP6-7 son diferentes.

La hipótesis nula se rechaza esto indica que hay diferencia significativa entre los medios para comprobar la diferencia se realiza la prueba de Duncán.

Promedios:

T1= 4.3 T2=0.33 T3=14.66 T4=16.33 T5= 21.33 T6=13.33 T7=13.66

Sy= 3.25

$r_{0.05}(2, 15) = 3.01$
 $r_{0.05}(3, 15) = 3.16$
 $r_{0.05}(4, 15) = 3.25$
 $r_{0.05}(5, 15) = 3.31$
 $r_{0.05}(6, 15) = 3.36$
 $r_{0.05}(7, 15) = 3.38$

$Rp_2 = 3.01 * 3.25 = 9.78$
 $Rp_3 = 3.16 * 3.25 = 10.27$
 $Rp_4 = 3.25 * 3.25 = 10.56$
 $Rp_5 = 3.31 * 3.25 = 10.75$
 $Rp_6 = 3.36 * 3.25 = 10.92$
 $Rp_7 = 3.38 * 3.25 = 10.98$

Matriz diferencial

	T2	T1	T6	T7	T3	T4	T5
T2		3.97	13	13.33	14.33	16	21
T1			9.03	9.36	10.36	12.03	17.03
T6				0.33	1.33	3	8
T7					1	2.67	7.67
T3						1.67	6.67
T4							5
T5							

Los valores de cada matriz se comparan con los valores obtenidos de Rp:

Rp 7 T5 es diferente a T2

Rp 6 T5 es diferente a T1
 T4 es diferente a T2

Rp 5 T5 = T6
 T4 es diferente a T1
 T3 es diferente a T2

Rp4 T5 = T7
 T4 = T6
 T3 = T1
 T7 es diferente a T2

Rp3 T5 = T3
 T4 = T7
 T3 = T6
 T7 = T1
 T6 es diferente a T2

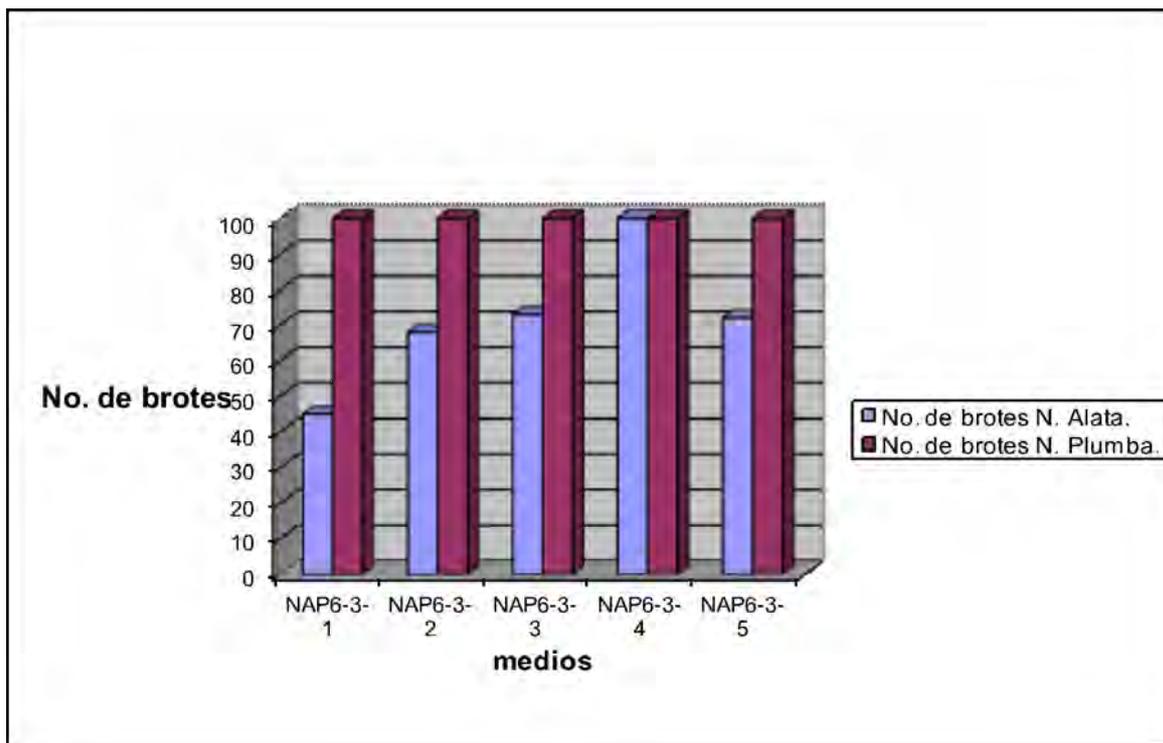
Rp2 T5 = T4
 T4 = T3
 T3 = T7

T7 = T6
T6 = T1
T1 = T2

Ensayo cuatro: Sacarosa

En el cuarto ensayo se probaron diferentes concentraciones de sacarosa, los resultados obtenidos de ambas especies se pueden observar en la gráfica No. 4.4, en donde se aprecia que la cantidad de brotes adventicios obtenidos en *N.alata* fue mayor en el medio NAP6-3-4, ya que se obtuvieron 100 brotes en total mientras que en medio NAP6-3-5 se generaron 72 brotes; el número total obtenido en el medio NAP6-3-2 fue de 68 y en NAP6-3-1 sólo se obtuvieron 45 brotes. En cuanto al desarrollo de las plantas se observó que las plantas generadas en el medio NAP6-3-2 presentaron tallos débiles mientras que las plantas provenientes del medio NAP6-3-5 tuvieron vitrificación tanto en tallos como en hojas, las plantas obtenidas en el medio NAP6-3-1 se caracterizaron por presentar una talla pequeña y de bajo crecimiento. Las mejores plantas se obtuvieron en el medio NAP6-3-4, ya que tuvieron un buen desarrollo morfológico, así como un sistema radicular bueno.

En tanto que en *Nicotiana plumbaginifolia* fueron incontables los brotes en todos los medios, así mismo las plantas no presentaron cambios en su morfología con buen desarrollo de brotes adventicios. Para poder realizar las gráficas se puso como valor mínimo de 100.



Gráfica No. 4.4 Cuantificación de brotes provenientes de medios de cultivo con variaciones de concentración de sacarosa (fuente de carbono).

En cuanto al análisis estadístico, éste no presentó diferencias significativas, esto se debió a que los intervalos son pequeños entre cada medio teniendo la cantidad suficiente para poder cubrir sus necesidades básicas de la planta; en tanto al realizar las observaciones durante cada subcultivo se observó que los explantes presentaron mayor oxidación en el medio NAP6-3-5.

TABLA 4. 8 Componentes del Análisis de Varianza prueba de Fisher par los medios NAP6-3-1, NAP6-3-2, NAP6-3-3, NAP6-3-4 y NAP6-3-5

Efectos significativos	Con $p < 0.05000$							
	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	S.C medios	g.l del error	CM del error	F	p
Entre medios	382.3	4	95.57	1291.1	15	80.60	1.18	3.01

H0 =medios NAP6-3-1 NAP6-3-2 = NAP6-3-3 = NAP6-3-4= NAP6-3-5

H1=medios NAP6-3-1, NAP6-3-2, NAP6-3-3, NAP6-3-4, NAP6-3-5 son diferentes.

En la figura No.4.6 en el inciso A) se observan los explantes sembrados en el medio NAP6-3-4, éstos presentan callo en las zonas de corte o heridas y puntos de regeneración con brotes, así mismo se observa no hay oxidación en los explantes. En el inciso B) se observan brotes bien definidos, no hay vitrificación con una tonalidad muy verde en el medio NAP6-3-4.

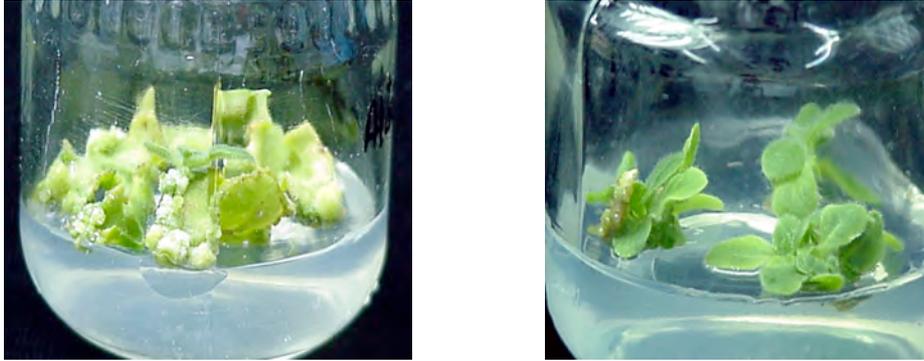


Figura No. 4.6 A) Brotes y callos de *N. alata*. B) brotes de *N. alata* provenientes de NAP6-3-4.

En la figura No. 4.7 se observan explantes con los medios NAP6-3-2 no presentan oxidación, mientras que en el medio NAP6-3-3 hay oxidación y no hay brotes en comparación con el medio NAP6-3-4 donde se observan brotes bien definidos y no hay oxidación en tanto el medio NAP6-3-5 el explante se encuentra muy hidratado de la misma forma el callo que se encuentra en su borde se observa con una coloración intensa pero muy húmedos.



Figura No. 4.7 Comparación de medios de acuerdo a la concentración de azúcar de derecha a izquierda 20g/l, 25 g/l, 30g/l y 35 g/l de *N. alata*

4.7 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Cada uno de los componentes del medio de cultivo juegan un papel muy importante para la regeneración de especies *in vitro*, como se demostró en este trabajo.

En el caso del primer ensayo donde se estudió la influencia de los componentes orgánicos tales como vitaminas y los reguladores de crecimiento; se observó una dependencia de estos componentes para la regeneración de plantas ya que se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos.

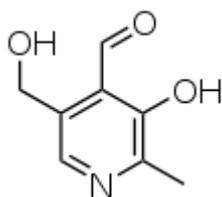
Se ha demostrado en varios estudios que cada planta tiene diferentes requerimientos nutricionales para su desarrollo así como para la formación de diferentes tejidos u órganos como es la inducción de callos, formación de órganos y multiplicación de embriones. Hay algunas especies y variedades que son recalcitrantes (especies de difícil regeneración bajo condiciones *in vitro*) dificultando así la propagación. Investigaciones realizadas para determinar la respuesta morfogénica de varias especies de *Nicotiana*, han sido limitadas, de hecho sólo Li, Hang y Bass (2003) realizaron una investigación en donde probaron 115 diferentes especies del género *Nicotiana*, en este trabajo se utilizó un mismo medio de cultivo para todas las especies, el cual consistió de las sales inorgánicas del medio MS suplementado con las vitaminas B5, así como los reguladores de crecimiento BAP del cual se utilizaron 11.1 μM y 5.5 μM ANA, suplementando los medios con 3% de sacarosa. En este trabajo se demostró que la respuesta de cada especie fue diferente, siendo *N. alata* la de menor respuesta ya que tan sólo el 6% de los explantes sembrados tuvieron una respuesta de 2 brotes por explante. Así mismo pone de manifiesto que, en el caso del género de *Nicotiana*, las especies responden de forma distintas a los reguladores de crecimiento.

En el presente trabajo se utilizaron las sales inorgánicas del medio MS, y se probaron diferentes combinaciones de aminoácidos y vitaminas: Cóctel 20, vitaminas Nich y vitaminas R2 (MS modificados) y B5, los medio se suplementaron con los reguladores de crecimiento BAP a razón de 8.87 μM y ANA 5.37 μM . Se observó que no se requiere una gran cantidad de acuerdo al

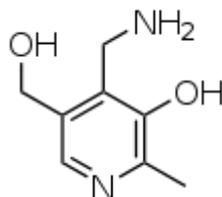
medio NAP1 de vitaminas y aminoácidos (cóctel 20) para la regeneración ya que los explantes crecidos en este medio se oxidaron rápidamente y en el medio NAP2 con vitaminas en pequeñas cantidades también no favorecieron la formación de brotes, en cambio en los medio NAP3 y NAP4 que presentaron un balance mayor de vitaminas solamente, sin gran cantidad de éstas y sin aminoácidos dieron una respuesta de seis brotes en promedio por explante de un total de 60 explantes en el caso de las vitaminas R2, y con vitaminas del medio Gamborg que son B5 se obtuvo un promedio de ocho brotes por explante, obteniendo valores más altos en comparación a los reportados por Li, Hang y Bass (2003).

Cabe señalar que, según George y Sherrington, 1984 mencionan que las vitaminas más frecuentemente utilizadas son la tiamina (B1), ácido nicotínico (niacina) y piridoxina (B6), y participan en diferentes funciones tales como formación de brotes así como enraizamiento. En este trabajos se probaron dos concentraciones diferentes de estas vitaminas (R2 y B5), y fueron en estos medios donde se reportó el número mayor de brotes por explante.

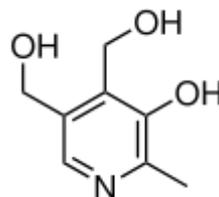
La diferencia entre ambas vitaminas es la concentración en la que se presenta el ácido nicotínico y la piridoxina, esto es en la vitamina B5 estos compuestos se presentan en 1.0 mg/L, en tanto que en la vitamina R2 es de 0.5mg/L es una vitamina hidrosoluble, La vitamina B6 es en realidad un grupo de tres compuestos químicos llamados piridoxina (o piridoxol), piridoxal y piridoxamina:



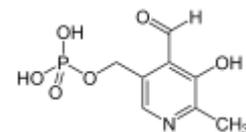
Estructura del piridoxal



Estructura de la piridoxamina



Estructura de la piridoxina

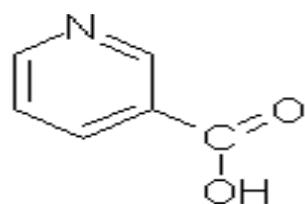


Estructura del fosfato de piridoxal

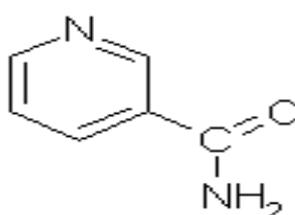
Los derivados fosforilados del piridoxal y piridoxina (fosfato de piridoxal (PLP) y fosfato de piridoxamina (PMP) respectivamente) desempeñan funciones de coenzima. Participan en muchas reacciones enzimáticas del metabolismo de los aminoácidos y su función principal es la transferencia de grupos amino; son

coenzimas de las transaminasas, enzimas que catalizan la transferencia de grupos amino entre aminoácidos; que actúan como transportadores temporales de grupos amino interviene en la síntesis de ADN y ARN

La vitamina B3, niacina, ácido nicotínico o vitamina PP es una vitamina hidrosoluble cuyos derivados, NADH y NAD⁺, y NADPH y NADP⁺, juegan roles esenciales en el metabolismo energético de la célula y de la reparación de ADN. La designación *vitamina B₃* también incluye a la correspondiente amida, la nicotinamida, o niacinamida, con fórmula química C₆H₆NO₂.



Nicotinic Acid



Nicotinamide

En el siguiente ensayo se probaron las dos concentraciones de vitaminas utilizadas en el anterior experimento y también dos concentraciones diferentes de ANA. Los resultados mostraron que no por mayor concentración de regulador de crecimiento habrá una mejor respuesta, ya que en una concentración de tan sólo 0.1 mg de ANA se tiene una respuesta superior a mayores concentraciones del mismo regulador; así mismo las vitaminas que dieron un mejor resultado fueron las R2, lo cual demostró también que no a mayor concentración de vitaminas será mejor la respuesta. Li, Hang y Bass (2003) coinciden con los componentes utilizados en el medio de cultivo con los reportados por Ebert y Clarke (1990), pero del mismo modo las concentraciones son diferentes; estos autores y utilizan las sales MS, vitaminas B5 y los reguladores ANA y BAP a unas concentraciones en un rango de 0 a 3 mg/l. Las plantas no responden a la actuación de una hormona en concreto sino en la interacción de varias. Las hormonas como ANA actúan a bajas concentraciones ya que en mayor proporción actúa como herbicida. La función biológica principal es la regulación de crecimiento y desarrollo de las plantas ya que actúan en la división celular y se desencadenan diversos fenómenos o procesos como son la dominancia del brote principal e inhibición de los brotes de ramificación lateral, estimulación del crecimiento apical, diferenciación de los

vasos conductores, inhibición de la caída de las hojas y frutos, estimulación de la formación de raíces adventicias y tropismos, esta fitohormona se sintetiza en las partes áreas jóvenes Hill, T.A, (1984), menciona que en conjugación con las citocininas en este caso de BAP, esta hormona actúa a nivel de ácidos nucléicos en la zona meristemática de la raíz de la planta. Desde la raíz son transportadas en una forma conjugada a través del xilema a toda la planta. Dando como resultado diversos procesos como el retardo de algunos procesos como es el caso del retraso de envejecimiento de las hojas, la estimulación de la pérdida de agua por transpiración, transporte de sustancias a nivel floema, activación del crecimiento de las yemas laterales, eliminación de la dormancia que presentan las yemas y semillas de algunas especies, inducción de la partenocarpia de algunos frutos.

Como ya se mencionó estas dos hormonas se conjuntan para estimular la proliferación celular en el proceso de regeneración *in vitro* de toda una planta a partir de un pequeño fragmento de hoja, tallo, etc., que recibe el nombre de callo. Nickell, L.G. (1982).

El tercer ensayo se realizó un barrido hormonal de ANA, para determinar su efecto, demostrándose que para la diferenciación, crecimiento y desarrollo de brotes es necesario la combinación de una auxina y una citocinina, pero la respuesta está modulada no sólo por la combinación sino también por la concentración de ambos reguladores, de esta forma se demostró nuevamente que la concentración idónea de ANA es de 0.1 mg. L y de BAP es de 2.0 mg. L.

Respuesta sinérgica de dos reguladores de crecimiento va a depender de las características y necesidades de la planta para la selección de los reguladores de crecimiento así como de las concentraciones óptimas para su desarrollo como en el caso del ANA y BAP donde se observó que a menor concentración de ANA hay una mejor respuesta y la obtención de brotes adventicios y el desarrollo de la órganos que conforman a la planta (Roberts, J.A. y Hooley, R. 1989). Esta combinación es un factor importante para la generación de órganos y su multiplicación con las concentraciones de ambos reguladores de crecimiento ya que es menor la concentración de ambas hormonas dando

como resultado un bajo rendimiento en la inducción de brotes adventicios, de igual forma lo mencionan Berry y Patnaik (1982) pero de forma inversa presenta la cantidad de la auxina es mayor que la citocinina obteniendo como resultados de uno a dos brotes por explante mientras que en este trabajo se obtuvieron de 8 a 10 brotes por explante cada quince días.

En el caso del cuarto ensayo donde se varió la concentración de sacarosa, se obtuvieron resultados no estadísticamente diferenciados pero si visualmente determinando la concentración adecuada es de 30g/L de medio de cultivo ya que en menor concentración la planta se observa ligeramente frágil en tanto con una concentración más alta se presenta el fenómeno de vitrificación de las plantas; con esto se demostró que es necesario tener un equilibrio con los compuestos de medio de cultivo; este compuesto es importante porque es la fuente de carbono que proporciona la energía para llevar a cabo los procesos metabólicos de las plantas como lo menciona Ramage y Williams (2002), así mismo de otros nutrientes como las sales es el caso de la composición mineral del medio de cultivo que se encuentra en una mayor proporción esto es en una combinación de minerales para una planta o especie en particular. Este componente juega un rol primario como de soporte en los procesos fundamentales como crecimiento, desarrollo y diferenciación.

Los macro nutrientes como el nitrógeno, fósforo y sulfuro son componentes importantes de macromoléculas como proteínas y ácidos nucleicos, como constituyentes muy pequeños.

Los micro nutrientes son requeridos en menor proporción que los macro nutrientes y función en varios roles como cofactores de enzimas o componentes en el transporte de electrones.

En el cultivo de tejidos vegetales la base del medio de cultivo es la mezcla de sales de minerales combinando micro y macro nutrientes complementado con una fuente de carbono que es la sacarosa. Otros complementos como vitaminas, aminoácidos y reguladores de crecimiento.

La concentración y tipo de agente gelificante usado puede traer efectos dramáticos en el crecimiento y desarrollo de la planta. El agar contribuye a la matriz potencial, ya que en ella guarda la humedad necesaria para la planta y es donde se disuelven los demás componentes. La cantidad de citocininas inducen la cantidad de raíz como lo menciona Ramage & Williams 2002; como también efecto de la combinación de sales, de hormonas de crecimiento y concentraciones de azúcar que son utilizadas para diferentes finalidades como en el ámbito de investigación, venta de plantas ornamentales, de interés agrícola-

V. CONCLUSIONES:

De acuerdo con estos resultados el medio más adecuado fue el medio NAP6-3-4 esto es, el medio para *Nicotiana alata* y *Nicotiana plumbaginifolia* con una combinación de ANA y BAP con la vitamina R₂ y con una concentración de sacarosa de 30g/L obteniendo brotes adventicios vigorosos y bien definidos en un tiempo aproximado entre 30 y 45 días.

Observando así que estos factores influyen para el desarrollo de la planta y el efecto sinérgico de los reguladores de crecimiento, que van a determinar la calidad de los brotes adventicio.

VI. CAPITULO II “TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE *NICOTIANA ALATA* Y *NICOTIANA PLUMBAGINIFOLIA*”

6.1 ANTECEDENTES GENERALES

La habilidad de introducir genes extraños dentro de plantas, como lograr la estabilidad de su expresión genética y la capacidad de heredar dicha información genética a sus descendientes son las claves para lograr el éxito en la transformación genética en plantas. Estas técnicas biotecnológicas han permitido estudiar por ejemplo el rol que juegan ciertos genes en diferentes vías del metabolismo, crecimiento y desarrollo de las plantas y han abierto nuevas posibilidades de uso de plantas para incrementar la producción de diversos productos de interés comercial así como dilucidar los mecanismos que controla fenómenos fisiológicos (Lindsey, Keith 1992).

Las estrategias de transformación ha sido muy diferente según las especies a utilizar como modelo biológico, es por ello que los protocolos utilizados para algunas semillas de cereales son muy diferentes en comparación con los probados para el *tabaco* o *Arabidopsis*, aún así éstos pueden ser también muy diferentes si se trata de procesos morfogenéticos distintos tales como la organogénesis directa o indirecta y la embriogénesis somática. Es necesario marcar las diferencias ya que éstas serán las responsables de establecer los requerimientos para la selección de proceso de transformación genética para cada especie. Estos procesos se pueden clasificar en: (1) método de liberación de DNA, (2) el método de selección de tejido y (3) expresión del gen en la planta.

6.1.1 Transferencia de genes mediante un vector

El sistema más utilizado en tabaco ha sido el de transformación utilizando *Agrobacterium* como vector. Dos especies de esta bacteria se han utilizado en particular: *A. tumefaciens* que es el agente causante de tumores, y *A. rhizogenes* el agente causante de enfermedades de la raíz.

El más importante ha sido *A. tumefaciens* al trabajar con esta bacteria usando su mecanismo de infección y el desarrollo de la enfermedad se descubrió que hay una interacción entre el gen que transfiere el patógeno y el hospedero, con esto se han desarrollado nuevas técnicas (Lindsey, Keith 1992).

Un segundo tipo de sistema de transformación genética es por medio de virus de plantas donde la diferencia de utilizar estos virus con respecto a la infección con *A. tumefaciens* es la estabilidad de la integración del transgene dentro del genoma de hospedero. La bacteria *A. tumefaciens* ha sido estudiado por mucho tiempo. Trabajos recientes en el campo de la biología en el desarrollo de tumores, la cual se caracteriza en la formación de éstos en las áreas de infección. La bacteria Gram negativa comúnmente se encuentra en suelo e infecta a las plantas en sitios específicos. El proceso de infección envuelve quimotaxis donde la bacteria produce heridas por medio de metabolitos fenólicos, como la acetosiringona realizando un daño a la célula, en los sitios donde se produce la herida la agrobacteria ataca las paredes celulares de la planta (Meins F, Lutz 1980).

6.1.2 Transferencia de gene por Vector libre

Los sistemas de transferencia de genes directos o de vector libre ha sido desarrollado como una respuesta a los problemas generados en la estabilidad de cereales transformados por sistema *A. tumefaciens*. el principio de este sistema es esencialmente el mismo que la transformación mediada por *Agrobacterium*; se introduce el DNA dentro de la célula o tejido de las plantas a transformar y se lleva a una inducción de regeneración.

La única diferencia es que es que el DNA extraño es introducido como una molécula expuesta sin un vector biológico para este método se han desarrollado diversas técnicas bioquímicas como son: técnicas químicas, eléctricas y físicas, donde cada una designa la preparación de DNA para traspasar la pared células y entrar en la membrana plasmática (Draper J. 1982).

6.1.3 Métodos Químicos

Estos métodos son utilizados para la transferencia de genes al interior de la planta; en los protoplastos se usa polietilenglicol (PEG), descrito por Draper et al. (1982) y Krens et al. (1982). El objetivo del uso de PEG es remover el agua de la superficie del protoplasto y como un puente molecular entre las proteínas y los lípidos creando así un dominio lipídico que es inestable (Hahn-Hägerdahl et al. 1986).

6.1.4. Métodos Eléctricos

Recientemente se ha utilizado la electroporación (electropermeabilización) es el más usado para introducir el DNA en el interior de los protoplastos, esto es por efecto de permeabilización de la membrana.

Cuando las células o protoplastos se someten a pequeñas pulsos eléctricos (DC) hay un incremento en la permeabilidad de la membrana plasmática a moléculas hidrofílicas como DNA, sin embargo un incremento de voltaje produce daños irreversibles en la estructura de la membrana produciendo así la muerte. Los efectos de los campos eléctricos en la permeabilidad de la membrana es relativamente largo (minutos) comparado con la duración de pulsos (Sower 1986).

6.1.5 Métodos Físicos

Estos métodos se distinguen de los métodos químicos y eléctricos por el uso de técnicas físicas o mecánicas para la introducción de transgenes directamente dentro del protoplasto o célula. Son tres métodos que se han considerado, microinyección, transfección mediada carbida silicona, y bombardeo de microproyectiles.

Microinyección

Es uno de los métodos más utilizados para introducir DNA extraño dentro del núcleo por inyección. Este es realizado por procesos electromecánicos controlando la inserción por un fino cristal al interior del núcleo de la célula individual (Nomura y Komamine 1986), con cultivos inducidos de embriones jóvenes (Neuhaus et al. 1987) o de forma más convencional protoplastos son

inmovilizados por succión en una pipeta o en geles o en una superficie con poli-L-lisina y el núcleo es visualizado por marcadores DNA DAPI o Hoecsht 33258. Este proceso es intensivo y muy lento pero la frecuencia de transformación es alta, este método se utiliza para la obtención de planta transgénicas de especies que es muy difícil la transformación por *A. tumefaciens* como alfalfa (Reich et al. 1986^a).

Carbida silicona

Se forman cristales muy largos de forma de bigotes de carbida silicona en una solución, se coloca en un vórtex con las células vegetales y el DNA, el DNA puede introducirse dentro de la célula siguiendo la penetración de los bigotes (Kappler et al. 1990), recientemente ha sido utilizada para generar una estabilidad y la fertilidad de plantas de maíz transformadas (Frame et al. 1994).

Bombardeo de microproyectiles

La técnica de transformación que se ha utilizado principalmente para cereales es la de bombardeo de micro proyectiles, el fundamento de este técnica se basa en la salida acelerada de microesferas donde alcanzan grandes velocidades con ayuda de una descarga explosiva que puede ser descargas eléctricas o bien helio en altas presiones en una cámara de vacío.

Se disparan microesferas de metales que tiene adheridos el DNA, estas penetran en el interior de la célula o tejido. Esta micro esferas son de oro y tungsteno (usadas por su alta densidad) y el diámetro de 1-4 μm , entran a una velocidad aproximadamente de 500m/s y el DNA puede ser liberado y expresado transitoriamente o puede ser integrado de forma estable dentro de los cromosomas (Klein et al. 1987,1991). El DNA adherido a los microproyectiles que son llevados a un macro proyectil que acelera la salida de las balas sobre el tejido en forma de disparo (usando pistola con una descarga eléctrica o una cámara de vacío) que rápidamente evapora el agua del ambiente o bajo presión sobre presión alta de helio.

La aceleración de micro partículas deposita el DNA. Esta técnica es utilizada para la transformación de tejidos e especies que muestran buena respuesta

morfogenética incluyendo como modelo biológico al tabaco (Klein et al. 1988) también la importancia en cosechas como soya (McCabe et al. 1988), maíz (*Zea mays L.*) (Fromm et al. 1990; Gordon-Kamm et al. 1990), arroz (*orizaba sativa L.*) (Christou et al. 1991), avena (*Avena sativa L.*) (Wan and Lemaux 1994) y trigo (*triticum aestivum L.*) (Vasil et al. 1992; Weeks et al. 1993).

Cabe mencionar algunos protocolos de transformación genética de tabaco por infección de *Agrobacterium tumefaciens* que posteriormente se describen, de igual manera el protocolo de preparación de microproyectiles descrita por Guerrero Andrade.

6.2. RUTA CRÍTICA

Para el cumplimiento de los objetivos del presente trabajo se diseñó la ruta crítica mostrada en la figura 16.

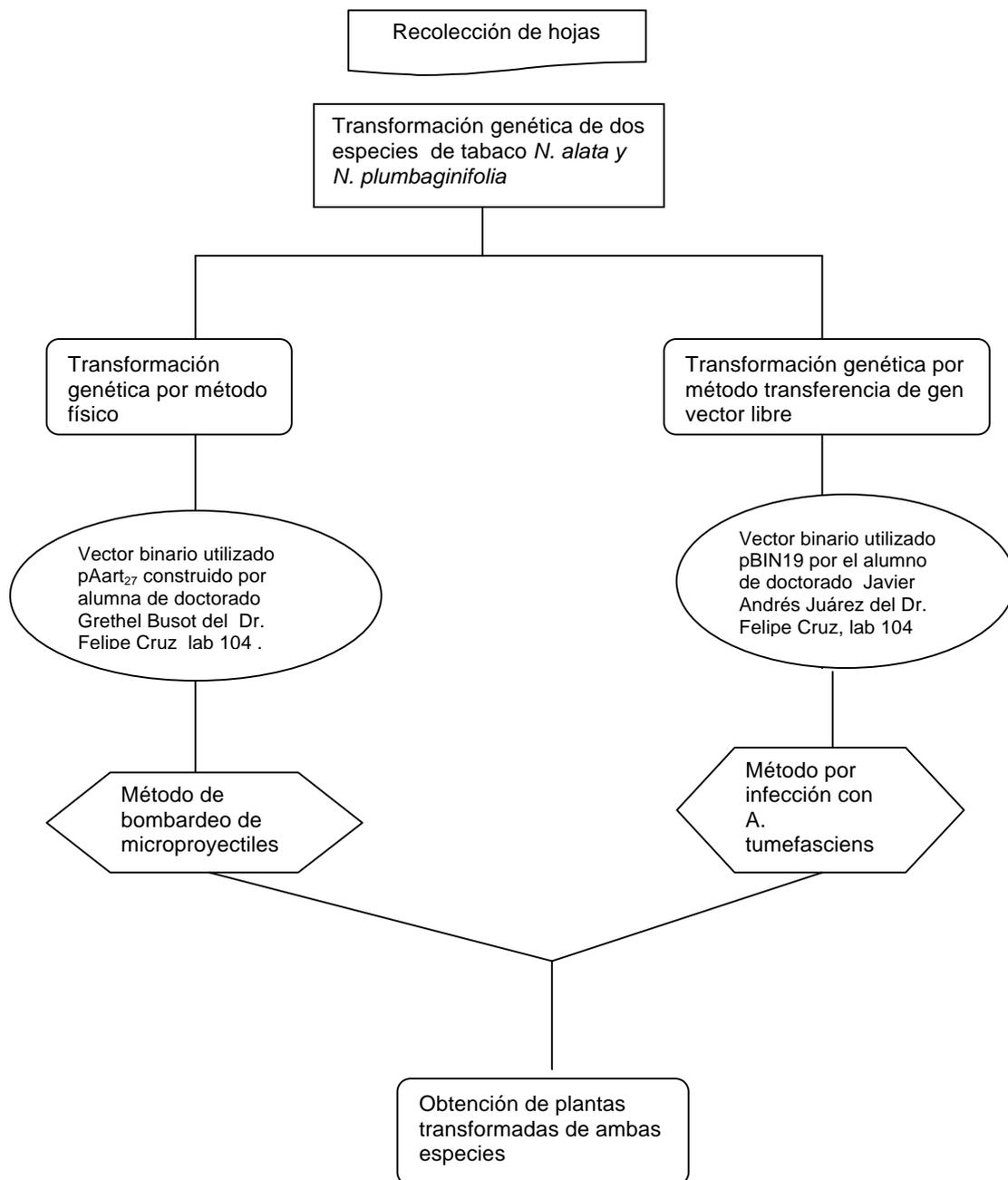


Fig. 16. Ruta crítica seguida para la obtención de protocolos para la Transformación de *Nicotiana alata*

6.3. MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron hojas plantas jóvenes de *Nicotiana glauca* y *Nicotiana glauca* crecidas bajo condiciones de invernadero

MÉTODO DE ESTERILIZACIÓN DE HOJAS Y SIEMBRA DE EXPLANTE

- 1.-Cortar las hojas a la mitad.
- 2.-Diluir el cloro 1:5 (40mL de agua con 10mL de cloro diluido)
- 3.-Colocar hojas en recipientes estériles y adicionar la mezcla de cloro en agua.
- 4.- Mantener en agitación por 8 minutos.
- 5.- Lavar con agua desionizada 5 veces
- 6.- cortar hojas de 1cm aprox.

6.3.1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE KANAMICINA PARA LA SELECCIÓN DE CULTIVOS TRANSFORMADOS

Se realizó un barrido de Kanamicina de diferentes concentraciones (50, 60, 70, 90, 100, 110) mg/L en el medio seleccionado en la primera parte del presente trabajo que fue el medio NAP6-3-4, realizando esto por triplicado por cada medio; para evaluar la respuesta se colocó un control negativo, esto es un explante sin bombardear expuesto en cada una de las concentraciones utilizadas dando como resultado la oxidación total a los 15 días, y a los 20 días la muerte del explante dependiendo la cantidad de kanamicina, mientras los explantes bombardeados y con la capacidad de presentar la resistencia sobrevivieron; esto se realizó para ambas especies.

6.3.2 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA POR MÉTODO FÍSICO: BIOBALÍSTICA.

Para el método de biobalística fue necesario que el ADN se adhiriera a las balas de tungsteno como lo menciona el siguiente protocolo:

Precipitación de DNA de Klein *et al* 1986 citado por Guerrero-Andrade (1998).

- 1.- En un tubo eppendorf se colocan 50 μ l de la suspensión de partículas de tungsteno y se agregan los siguientes reactivos uno a uno.
- 2.- Primeramente se adicionan 5 μ l de DNA (1 μ g/1 μ l) depositándolo en la pared del eppendorff evitando que el DNA se mezcle con las partículas hasta el siguiente paso.
- 3.- Se agrega una gota de 50 μ l de CaCl₂ 2.5 M en la pared del tubo al lado de la gota del DNA.
- 4.- Se coloca junto a las dos gotas anteriores la gota correspondiente de 20 μ l de Spermidina 0.1M permitiendo que se mezcle cada componente. Agitar la mezcla durante 5 a 10 segundos en forma de pulso, en un vortex.
- 5.-Se centrifuga por 5 segundos en una microcentrífuga con una velocidad de 13000 rpm.
- 6.- Se toman 100 μ l del sobrenadante y se desechan.
7. Los 25 μ l restantes se resuspenden, se toman 5 μ l y se depositan en los swinex.

Condiciones para el bombardeo

Condiciones de presión	120 spi
Distancia	12 cm
Vacío	20-22 in de Hg

Medio para bombardeo

El medio utilizado es el NAP6-3-4 pero sin antibiótico y sin reguladores de crecimiento, únicamente con mayor cantidad de gellan esto es 3 g en cajas petri estériles.

Se realiza el bombardeo con una cámara de baja presión de acuerdo a las condiciones de bombardeo anteriormente mencionadas.

- 1.-Se coloca un explante por caja con el envés hacia arriba, se realiza el bombardeo con las balas de tungsteno impregnadas con el plásmido a

introducir; se sellan y se colocan en el cuarto de incubación por 15 días en el día 16 se pasan al medio de inducción con kanamicina a una concentración de 90 µg/ml manteniéndolas en este medio y realizando los subcultivos al mismo medio cada tres semanas.

2.-Los brotes obtenidos de cada explante se mantienen en el medio de alargamiento y enraizamiento con la misma concentración de kanamicina por tres meses, la preparación de las balas se describe en el protocolo de preparación de las partículas, ver anexo

En el caso del método de biobalística se llevó a cabo en condiciones de asepsia en una campana de flujo laminar previamente desinfectado con una solución de etanol al 70%.

Se sembraron 50 explantes y 5 controles negativos de cada especie (*N. alata* y *N. plumbaginifolia*) de hojas jóvenes de invernadero (descrito anteriormente proceso de desinfección), colocándose un explante en cada caja petri. se colocaron en cajas de medio sin hormonas ni antibiótico como se describió.

6.3.3 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA POR GEN VECTOR LIBRE: INFECCIÓN POR *Agrobacterium tumefaciens*

CULTIVO DE *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA 4404

Para la transformación genética de *Agrobacterium tumefaciens* se llevó a cabo de acuerdo al protocolo que se presenta a continuación; la cepa fue proporcionada por el Dr. Felipe Cruz García del departamento de bioquímica de la Facultad de Química.

1.-Crecer la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* en medio YM con los antibióticos correspondientes en un tubo con 5 ml.

2.-Crecer en un matraz el preinóculo (5 ml) en 45 ml de medio YM con los antibióticos correspondientes para llevar a un volumen de 50 ml

3.-Checar la densidad óptica (D.O) a 600nm, el cultivo deberá estar entre 0.5-0.6. Si la lectura se encuentra superior a la esperada se diluye con el medio YM y se trata de obtener una D.O. de 0.4-0.5. Posteriormente se agrega

acetosiringona (10 mM en DMSO) y se agrega 500 µl por cada 50 ml de *A. tumefaciens*. Se agita de 3 a 4 horas. Se checa D.O. se encuentre en 0.5-0.7.

6.4. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA CON *Agrobacterium tumefaciens*

Para la infección con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* para ambas especies se realizó de acuerdo al siguiente protocolo:

- 1.- Centrifugar en dos tubos falcon 20 ml de *Agrobacterium tumefaciens*.
- 2.- Resuspender en 40 ml de medio líquido la bacteria y colocarla dentro de dos cajas petri (conteniendo una con medio MS suplementado con BAP/ANA, medio B y otra con medio MS suplementado con 21p/AIA, medio Z, ver cuadro 5)
- 3.- Esterilizar hojas jóvenes en 10% hipoclorito de sodio con unas gotas de Tween durante 15 minutos en agitación constante; realizar 4 lavados con agua desionizada estéril.
- 4.- Disectar las hojas en 1cm² de forma uniforme.
- 5.- Colocar los explantes en las cajas con medio de resuspensión por 10 minutos.
- 6.-Al paso de este tiempo colocar ocho explantes con el envés hacia arriba en las cajas como medio Z y medio B (ver cuadro No. 5), secados previamente sobre un papel filtro estéril para eliminar el exceso de la bacteria: la composición de estos medios se describe en el cuadro No. 5 abajo descrito.
- 7.-Sellar cajas con parafilm y guardar en cuarto de incubación en condiciones de 18 h oscuridad/ 6 h luz a una temperatura 24 ± 2 °C, durante dos días.

Cuadro No. 5 Medios de cultivo para la transformación genética de *N. alata* y *N. plumbaginifolia* por infección de *A. tumefaciens*.

Componentes	Solución de resuspensión 100 mL	Medio Zhang cultivo en placas 500 ml	Medio Murfett cultivo en placas 500 ml
Sales MS 10 x	1 ml	5 ml	5 ml
Sales MS 100x	0.1 ml	0.5 ml	0.5 ml
Sacarosa	3 g	15 g	15 g

MES	0.39 g	1.95 g	1.95 g
Agua	92	460	460
PH	5.4	5.4	5.4
Agar	Ninguna	2.5 g	2.5g
Autoclave	Filtrado final	20 min	20 min
Acetosiringona (AS) (0.08 g/l)	5 ml	25 ml	25 ml
Vitamina B5 100 x	1 ml	5 ml	5 ml
Citocinina	Adicionar más tarde	0.5 mg 2ip (0.5 ml)	1 mg BAP (0.1 ml)
Auxina	Adicionar más tarde	0.5 mg AIA(015 ml)	0.05 mg ANA (0.05 ml)

8.- Transcurrido este tiempo se pasan en los medios descritos en el cuadro 6; donde se describe la utilización de cuatro antibióticos (cefotaxime, vancomicina, kanamicina, y timentina) de los cuales solamente se utilizaron dos que fueron la kanamicina y cefotaxime; ya que la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 no es muy infecciosa.

Los resultados obtenidos en ambos métodos se determinaron con base al número de explantes obtenidos de cada especie.

Cuadro No. 6 Medios de cultivo para la inducción de plantas transformadas genéticamente de ambas especies por infección de *A. tumefaciens*.

componentes	Solución de lavado 250 ml	500ml de medio Z para selección de placas	500 ml de medio B selección se placas
Sales MS 10 x	25 ml	50 ml	50 ml
Sales MS 100 x	2.5 ml	5 ml	5 ml
Sacarosa	7.5 g	15 g	15 g
MES	0.15 g	0.3 g	0.3 g
Agua	548	495	495

PH	5.8	5.8	5.8
Agar	Ninguna	5 g	5 g
Autoclave	20 min	20 min	20 min
Vitamina B5 100 x	Ninguna	5 ml	5 ml
Citocinina	Ninguna	5 mg 2ip (0.5 ml)	1mg BAP (0.1 ml)
Auxina	0.25 ml	0.15 mg AIA (0.1ml)	0.05 mg ANA (0.05ml)
Cefotaxime (50mg/ml)	0.25 ml	0.5 ml	0.5 ml
Timentina (50mg/ml)	0.25 ml	0.5 ml	0.5 ml
Vancomicina (50mg/ml)	0.25 ml	0.5 ml	0.5 ml
Kanamicina (100mg/ml)	0.5 ml	1 ml	1 ml

9.-Subcultivar cada dos semanas.

10.- Después de cuatro semanas en oscuridad pasar a condiciones normales de luz.

11.-Remover los reguladores de crecimiento después de cuatro semanas o al formarse los brotes.

12.-Cuando se formen los brotes colocarlos en medios de regeneración (ver cuadro No.7).

En el caso de los cuadros No. 6 y 7 solamente se utilizaron dos de los cuatro antibióticos (kanamicina y cefotaxime) que vienen en el protocolo original ya que la cepa no es muy infectiva

Cuadro No. 7 Medio de regeneración de plantas transformadas genéticamente por infección de *A. tumefaciens* de *Nicotiana alata* y *Nicotiana plumbaginifolia*.

Componentes	0.5 ml	1000 ml	2000 ml
Sales MS 10 x	50 ml	100 ml	200 ml
Sales MS 100 x	5 ml	10 ml	20 ml
Sacarosa	15 g	30 g	60 g
MES	0.3 g	0.6 g	1.2 g
Agua	495 ml	990 ml	1980 ml
PH	5.8	5.8	5.8
Phytigel	1.5	3 g	6 g
Autoclave	20 min.	20 min.	20 min.
Vitamina B5 100 x	5 ml	10 ml	20 ml
Cefotaxime (50mg/ml)	0.5 ml	1 ml	2 ml
Timentina (50mg/ml)	0.5 ml	1mL	2 ml
Vancomicina(50mg/ml)	0.5 ml	1 ml	2 ml
Kanamicina(100mg/ml)	0.5 ml	1 ml	2 ml

VII. RESULTADOS

Con base a los resultados de la primera parte del presente trabajo, se determinó que el medio adecuado para la regeneración *in vitro* de ambas especies que fue el NAP6-3-4, mientras que en el desarrollo de la segunda parte se realizó un barrido para determinar la concentración de kanamicina en la cual se llevó a cabo la selección de los cultivos transformados genéticamente.

Se probaron cinco concentraciones diferentes de kanamicina: 0, 50,60, 70, 80, 90, 100 y 110 mg/l.L⁻¹. Los resultados obtenidos demostraron que la concentración más adecuada fue de 90 mg/l ya que la cantidad promedio de brotes por explante fue de 1.6; se seleccionó esta concentración por ser la concentración máxima donde sobrevivieron los explantes y generaron brotes adventicios.

En la tabla No. 5 se puede observar el número de brotes totales que se obtuvieron durante tres meses, este ensayo se realizó por triplicado para obtener datos más confiables; se separaron por lotes identificándolos con números romanos. Este ensayo era indispensable para que, después de realizar las transformaciones genéticas, se pudiera llevar a cabo la selección. Los plásmidos utilizados tenían en su construcción el gen que codifica a la proteína que confiere resistencia a dicho antibiótico.

Tabla No.5 Número de brotes totales de *N. alata* obtenidos en el medio NAP6 con diferentes concentraciones de Kanamicina a los 30 días de cultivo.

Concentración	Lote I	Lote II	Lote III
Control positivo	6	15	29
50 mg/L	18	11	15
60 mg/L	5	2	5
70 mg/L	3	3	1
80 mg/L	5	1	1
90 mg/L	1	1	3
100 mg/L	0	0	0
110 mg/L	0	0	0

Como se puede apreciar en la figura 11 los explantes todavía no presentaban cambio alguno en los parámetros evaluados (tamaño y color) ya que el tiempo de exposición al agente selectivo fue de treinta días, y para este periodo no se presentaron diferencias aparentes en comparación con el control positivo.

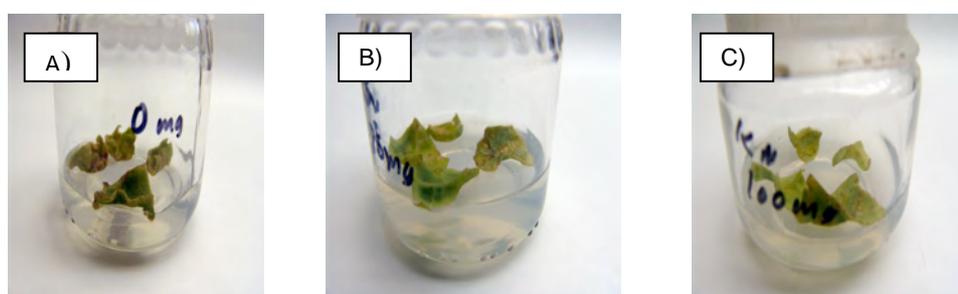


fig. 11 explantes de *N. alata* en medio con Kanamicina en concentraciones de izquierda a derecha A) control positivo, B) 80 mg/l y C)100mg/l

En la figura 12 se observa que habiendo transcurridos 45 días de cultivo en presencia del agente selectivo, ya se presentaron cambios drásticos en los explantes ya que éstos presentaron una coloración amarillenta, indicando un proceso de oxidación celular, siendo esta respuesta directamente proporcional a la concentración de kanamicina, esto es a concentraciones mayores más fuerte fue el daño.



fig. 12 Fotografía de comparación de diferentes concentraciones de Kanamicina de izquierda a derecha (control positivo, 50mg/l, 60 mg/l, 70mg/l, 80 mg/l, 90 mg/l, 100 mg/l) en *N. alata*

En el caso de *N. plumbaginifolia* de igual forma la concentración donde se obtuvieron la menor cantidad de brotes fue 90 mg/l que se puede observar en la tabla No. 6. Así como se demostró en la primera sección del presente trabajo, esta especie no presenta ninguna limitante para la regeneración.

Tabla No. 6 Número de brotes totales de *N. plumbaginifolia* en medio NAP6-3-4 con kanamicina.

Concentración	Lote I	Lote II	Lote III
Control positivo	Incontable	Brotos muy pequeños	35
50 mg/l	<50	0	39
60 mg/l	<50	0	<50
70 mg/l	<50	<50	<50
80 mg/l	<50	<50	30
90 mg/l	20	5	30
100 mg/l	0	0	0
110 mg/l	0	0	0

En la figura No. 13 se observa que no hay cambios morfológicos ni oxidación de los explantes teniendo 20 días de siembra

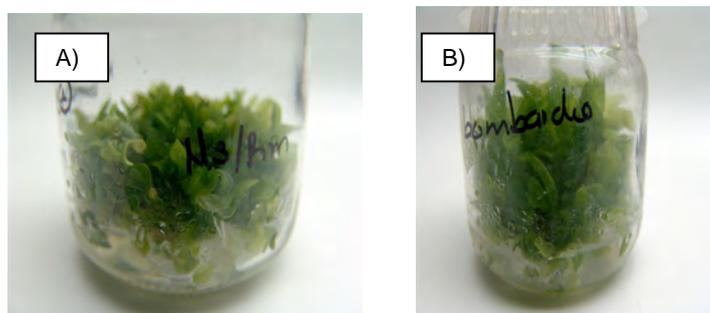


Fig. 13 Brotes de *N. plumbaginifolia*. A) control positivo, B) Concentración de 90 mg/l de kanamicina

7.1. Método físico: Biobalística

Para determinar las condiciones de bombardeo se utilizaron dos tipos de balas de diferente diámetro y diferentes distancias obteniéndose los siguientes resultados. Este experimento se realizó sólo con *N. alata* realizándose por triplicado (Lote A, Lote B y Lote C).

Como se puede observar en la tabla No. 6, no se aprecian diferencias significativas entre número de bala, sólo se puede observar una tendencia, siendo la bala M10 la que presenta en promedio mayor número de brotes regenerados, mientras que la distancia 12 cm reporta también un número mayor de brotes.

Tabla No. 6 Número de brotes totales *N. alata* bombardeo con balas M5 y M10

Distancia cm	Lote A		Lote B		Lote C	
	M5	M10	M5	M10	M5	M10
7.5	16	10	12	7	14	12
12	8	5	22	17	6	23
19	10	14	13	21	13	5

Como se observa en la figura 14 los explantes obtenidos del bombardeo con las balas M5 y M10 a una distancia de 12 cm, no hay cambios aparentes en los explantes-



Fig. 14 De izquierda a derecha A) Brotes de *N. alata* bombardeo con balas M5, B) brotes de *N. alata* con balas M10 a una distancia de 12 cm

Mediante los resultados obtenidos, se determinó que las condiciones de bombardeo y la concentración de kanamicina recomendadas fueron: tamaño de balas M10 a una distancia de 12 cm y una concentración de kanamicina de 90 mg/L. Para este trabajo en el cual se llevó a cabo la transformación con un vector binario pART27 construido por Grethel Busot alumna de doctorado del Dr. Felipe Cruz García del lab. 104

Posteriormente se realizó otra transformación para ambas especies, probándose las condiciones seleccionadas en el ensayo anterior.

En la tabla No.8 se presentan los datos obtenidos del bombardeo para ambas especies, donde se puede observar que hay un mayor número de brotes de *N. plumbaginifolia* que *N. alata*.

Tabla No. 8 Número de brotes totales de ambas especies provenientes de bombardeo

Especie	Lote I	Lote II	Lote III
<i>N. alata</i>	12	17	8
<i>N. plumbaginifolia</i>	25	20	35

En la fig. 17 se observa el daño del explante con la concentración de kanamicina seleccionada con respecto a una planta que no ha sido transformada y por lo mismo no hay desarrollo de brotes adventicios en este explante.

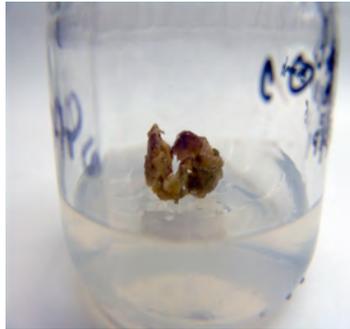


Fig. 17 control negativo de *N. alata*

En la fig. 18 se muestra la formación de brote de una planta transformada de lado derecho y el control negativo de lado izquierdo.

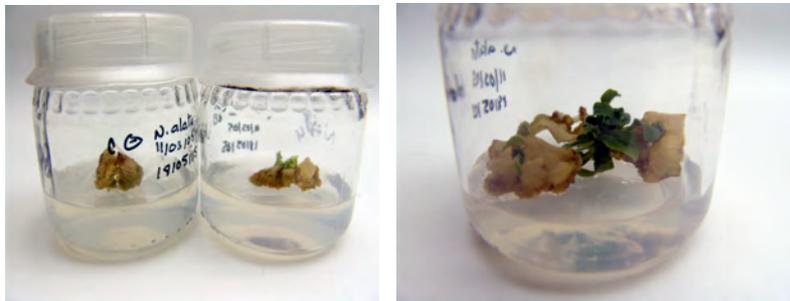


Fig. 18 Comparación de control negativo vs. Bombardeo

7.2 Método por gen vector libre: infección por *A. tumefaciens*

Para la transformación con *Agrobacterium tumefaciens* se siguió el protocolo descrito en el cuadro No. 5 para ambas especies *N. alata* y *N. plumbaginifolia*. Se sembraron 60 explantes de ambas especies de la misma forma de plantas de invernadero hojas jóvenes, de los cuales muy pocos se obtuvieron brotes adventicios nada más sobrevivieron y se desarrollaron aquellas con una capacidad de resistencia a esta bacteria.

De acuerdo a la tabla No.9 se observa una respuesta pobre a los 45 días con respecto a este método de transformación, ya que los explantes se fueron muriendo por la infección de *Agrobacterium tumefaciens*.

Tabla No. 9 Número de brotes totales de *N. alata* transformación con *A. tumefaciens*.

Medios	Lote I		Lote II		Lote III	
	<i>N. alata</i>	<i>N.plumbaginifolia</i>	<i>N. alata</i>	<i>N.plumbaginifolia</i>	<i>N. alata</i>	<i>N.plumbaginifolia</i>
Medio B	6	21	2	10	0	2
Medio Z	2	20	0	7	3	1

A continuación en las figuras 19 y 20 se observan los explantes después de haber sido infectados de ambas especies en los diferentes medios (medio Murffet y medio Z) de inducción después de la infección con *A. tumefaciens* presentando los explantes con el envés hacia abajo en contacto con el medio.

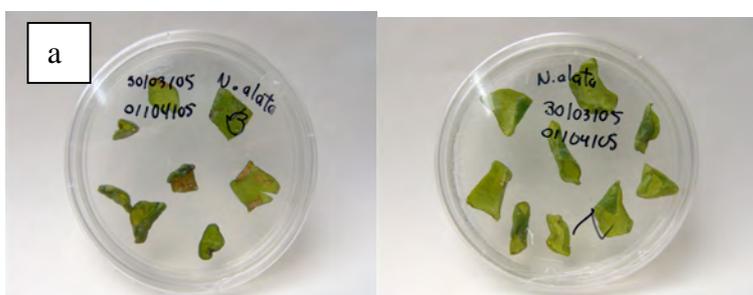


Fig. 19 Explantes de *N. alata* a) medio murffet y b) medio Z

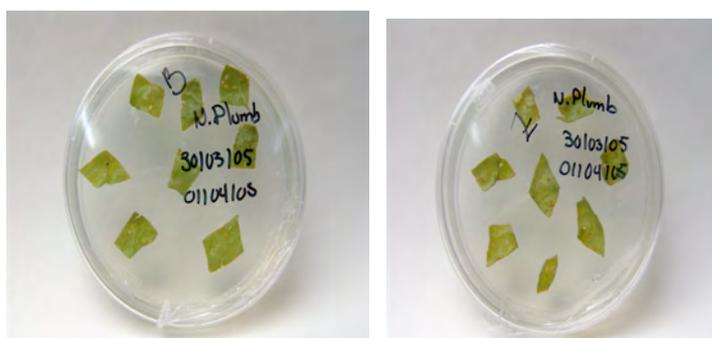


Fig. 20 Explantes de *N. plumbaginifolia* a) medio Murffet y b) medio Z

Los explantes de ambas especies provenientes de cada medio se subcultivaron en medios con cefotaxime y kanamicina, con el primer antibiótico para eliminar la bacteria y con el segundo antibiótico para realizar la selección de los explantes transformados.

En el caso de *N. plumbaginifolia* los explantes no presentaron tanto daño ya que la oxidación fue poca y se lograron obtener brotes. Como se puede observar en la figura 21.

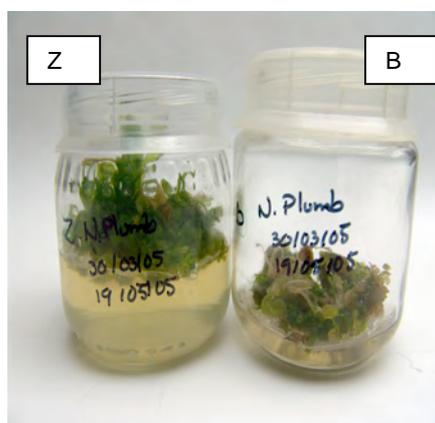


Fig. 21 Brotes de *N. plumbaginifolia* provenientes de medios Z y B

En la fig., 22 se observa el brote logrado de *N. alata* en el medio B, mientras que se demuestra también que en el medio Z no se logró la regeneración y, por el contrario se observa una oxidación del explante que se pasa al medio de cultivo.



Fig. 22 *N.alata* medio B medio Z (infección con *A. tumefaciens*)

El brote de *N. alata* obtenido en el medio B, creció y se desarrolló normalmente hasta llegar a planta, ver figura No. 23.



Fig. 23 planta de *N. alata* proveniente de medio B trasformación genética con *A. tumefaciens*.

VIII. ANALISIS DE RESULTADOS

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se observaron variantes muy importantes para la selección del método de transformación genética así como de la capacidad de la planta para regenerarse bajo condición de selección.

8.1 SELECCION DE CONCENTRACION DE KANAMICINA

En cuanto a la selección de la dosis letal media del agente selectivo, algunos autores tales como Rodríguez-García, recomiendan en su artículo transferencia del gen SKI2 de levadura al tabaco que la selección de *N. tabacum* es de 100 mg/L de kanamicina, de igual manera para *N. plumbaginifolia*, como lo menciona en su artículo Ebert y Clarke para ambas especies contraste a la elegida en este trabajo ya que se utilizó a una concentración de 90 mg/L. El agente selectivo fue eficiente para esta especie (*N. alata*), ya que actúa inhibiendo a síntesis protéica porción 30 S ribosomal mitocondrial.

8.2 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA METODO FISICO: BIOBALISTICA

Por el método de biobalística se observó que hay una selección aparente entre los explantes, La especie *N. glauca* se ha utilizado para obtener plantas transgénicas con expresión de autoincompatibilidad a otras especies de Nicotianas como los ensayos que realizaron Murfett, Cornish; Ebert (1992), esta técnica ha sido utilizada para transformar tejidos que muestran una buena respuesta morfogénica en diversidad de especies incluyendo como modelo el tabaco (Klein 1988), sin embargo no hay información de regeneración de plantas provenientes de transformación genética, de esta especie. Es importante destacar que Ebert y Clarke (1990) no obtuvieron ninguna planta transgénica, mientras que en este trabajo se obtuvo un promedio de los tres lotes (repeticiones) de 12.3 brotes por explante; mientras que de *N. glauca* se obtuvieron en promedio 26.6 brotes por explante a los 30 días de cultivo después de realizado el bombardeo. En el caso del bombardeo, es un sistema físico en el cual penetra ADN extraño, a través del acomplamiento de este material genético con balas de tungsteno, pero puede ser un sistema destructivo de las células, debido a la presión del He con el que sale, la altura de la platina y al tamaño de la bala, y si estas condiciones no son propicias para células de paredes delgadas y pequeñas, entonces se puede provocar la plasmólisis de las células dando como resultado la muerte celular y necrosis de todo el tejido. Este daño puede ser tan fuerte que el tejido, al ser expuesto también a un agente selectivo, no soporte el estrés y finalmente muera. En el caso de tejidos que lograron la incorporación del ADN extraño y crecieron en presencia del agente selectivo, su regeneración fue pobre debido al tamaño de los tejidos que lograron transformarse, éstos fueron pequeños y por lo tanto el área de regeneración fue mucho menor a las áreas regenerativas que se conservaron con la transformación con *A. tumefaciens*, además con el sistema de bombardeo no se logró la integración del ADN extraño produciéndose escapes.

En la especie *N. glauca* se ha estudiado el fenómeno de autoincompatibilidad que presenta ésta y otras especies de Nicotianas; sin embargo no se tienen estudios sobre la transformación genética mediante biobalística. En los

ensayos realizados por Murfett, Cornish y Ebert (1992), utilizaron la técnica de bombardeo para transformar tejidos (hojas y raíces) de diferentes especies y obtuvieron diferencias significativas en la diferenciación morfogénica de brotes adventicios demostrando que *N. tabacum* sigue siendo la especie que regeneró más brotes por ello se sigue recomendando como un modelo (Klein 1988), sin embargo este estudio no demostró la eficiencia de transformación. En otros ensayos realizados por Chen *et al* 1998 demostró que la eficiencia de transformación a través de biobalística de varias especies va de un 5 a 35% en general dependiendo de la especie a transformar. En el caso del presente trabajo, las plantas regeneradas de tejido transformado por biobalística, no fueron transgénicas, ya que no presentaron fluorescencia. Estos resultados demuestran que el sistema de biobalística no es eficiente para transformar células de *N. alata*, además la cantidad de regenerantes obtenidos fueron pocos.

8.3 TRANSFORMACIÓN POR GEN VECTOR LIBRE: INFECCIÓN POR *A. tumefaciens*

A. tumefaciens. Esta bacteria, Gram negativa, induce la formación de tumores, denominados agalla de la corona, generalmente en la unión del tallo con la raíz, en numerosas dicotiledóneas y en muy pocas monocotiledóneas y gimnospermas (De Cleene y De Ley, 1976). Esta bacteria del suelo infecta a dicotiledóneas como parte de su ciclo vital insertando genes foráneos en las mismas y consiguiendo que se expresen en forma de proteínas. En cuanto a la transformación genética mediada por *A. tumefaciens* Halge Puchta (2002) menciona que el éxito de la transformación está basada en las habilidades de integración del DNA extraño dentro del genoma de la planta hospedadora y la eficiencia de regeneración de células transformadas, utilizando genes marcadores que actúan como identificadores de la existencia de células transformadas y con resistencia a un antibiótico o herbicida se puede lograr esta eficiencia.

En el presente trabajo se realizó de igual manera la transformación genética por infección por *A. tumefaciens*, lográndose un brote transformado el cuál

se comprobó a través de una prueba de luminiscencia, la cual consiste en exponer el brote a una lámpara de U. V. éste presentó fluorescencia; sin embargo el problema mayor con este sistema es lograr la muerte de la bacteria. Con este sistema se logró la regeneración de aproximadamente 4 brotes por explante, pero conforme se desarrollaban e inducción más la bacteria se hacía presente invadiendo por completo los explantes y brotes, por lo que se considera que éste es el verdadero problema con este sistema.

El resultado obtenido es el caso en los tres meses que se logró obtener provino de la infección con *A. tumefaciens* y regenerado en el medio B que tiene en su composición los reguladores de crecimiento ANA y BAP en una relación de 1:2, la misma concentración que se utilizó en la primera parte de este trabajo, creció de forma definida.

En el caso de *N. Plumbaginifolia* se han realizado diferentes experimentos tal es el caso el trabajo realizado por Blanco, Valverde en su artículo de optimización de la transformación con *Agrobacterium rhizogenes*. Donde utilizan también *N. tabacum* logrando la transformación pero en diferentes condiciones.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demostraron la capacidad de regeneración y la capacidad de presentar resistencia al a Kanamicina obteniendo resultados en el barrido de concentraciones para ambas especie. De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se observó que la capacidad regenerativa de *Nicotiana alata* es afectada fuertemente por el método de transformación genética de, teniendo una mejor respuesta regenerativa cuando se transformó con *Agrobacterium tumefaciens*, mientras que en los tejidos bombardeados fue difícil su recuperación impidiendo tejido capaz de regenerar brotes adventicios. En la mayoría de los artículos Ebert y Clarke(1990) de transformación genética de *N. tabacum* el método de transformación utilizado es a través de un vector como *A. tumefaciens*, debido a que son compatibles y *A. tumefaciens* puede infectar exitosamente a las células de especies de la familia Solanacea, lográndose la integración del ADN extraño al genoma de las célula, situación contraria a la especies

monocotiledónea en donde no se logra una infección exitosa y por tanto no se lleva a cabo la integración del ADN extraño al genoma nuclear de las células.

IX. CONCLUSIONES

Con base a los resultados obtenidos en este trabajo se concluye que:

1. El método de transformación genética *A. tumefaciens* resultó más eficiente que el método por biobalística. .
2. La regeneración de brotes adventicios se ve afectada fuertemente usando el método de biobalística.

X PERSPECTIVAS

Se recomienda.

1. Realizar nuevamente el bombardeo de hojas de *N. alata* probando otro tamaño de balas y condiciones de presión y altura.
2. Para la transformación con *A. tumefaciens* se sugiere que no se eliminen ninguno de los antibióticos, hasta lograr que el brote esté ya bien desarrollado y enraizado.
3. La infección por *A. tumefaciens* no se pudo contener utilizando en los subcultivos solamente el antibiótico cefotaxime

ANEXOS:

CUADRO No.1 Medios que se probaron en el primer ensayo de la regeneración de *Nicotiana alata* y *Nicotiana plumbaginifolia*.

SALES	NAP1 (mL)	NAP2 (mL)	NAP3 (mL)	NAP4(mL)
MS	10	10	10	10
Cock 20	10	-	-	-
Vit R2	-	-	+	10 (vit B5)
Glicina	-----	----	10	----
Vit. Nitsh	----	10	----	----
AIA	15	10	10 (ANA)	1 (ANA)
Kin	60	20 (2ip)	20 (BAP)	20 (BAP)
Antioxidante	2	----	-----	1g
Azúcar	30	20	30	30
Gellan	2.5	2.5	2.5	2.5

PH 5.7

REACTIVOS UTILIZADOS EN UN LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

COMPUESTOS INORGÁNICOS

NOMBRE REACTIVO	FÓRMULA	PESO MOLECULAR	OBSERVACIONES
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	61.83	Irritante, almacena a T. amb.
Carbonato de calcio	CaCO ₃	100.10	Almacena a T. amb.
Cloruro de amonio	NH ₄ Cl	53.49	Irritante, almacena a T. amb.
Cloruro de calcio	CaCl ₂	111.00	Irritante, higroscópico, almacena a T. amb.
Cloruro de calcio dihidratado	CaCl ₂ ·2H ₂ O	147.02	Irritante, higroscópico, almacena a T. amb.
Cloruro de cobalto	CoCl ₂ ·6H ₂ O	237.95	Tóxico, irritante, cancerígeno almacena T. amb.
Cloruro de cobre dihidratado	CuCl ₂ ·2H ₂ O	170.50	Tóxico almacena T. amb.
Cloruro de fierro III	FeCl ₃ ·6H ₂ O	270.30	Corrosivo y tóxico, almacena T.amb.
Cloruro de magnesio	MgCl ₂ ·6H ₂ O	203.30	Irritante e higroscópico,

			almacena T.amb.
Cloruro de potasio	KCl	74.55	Altamente irritante, almacena T.amb.
Cloruro de sodio	NaCl	58.44	Irritante e higroscópico, almacena T. amb.
Fosfato de calcio	NH ₄ H ₂ PO ₄	115.03	Irritante e higroscópico, almacena T. amb.
Fosfato de fierro III	FePO ₄	151.00	Almacena a T.amb.
Fosfato de potasio monobásico	KH ₂ PO ₄	136.09	Irritante e higroscópico, almacena T. amb.
Fosfato de sodio monobásico	NaH ₂ PO ₄	137.99	Corrosivo e higroscópico.
Fosfato de sodio dibásico	Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	268.10	Irritante y almacena T.amb.
Hidróxido de potasio	KOH	56.11	Tóxico y corrosivo.
Hidróxido de sodio	NaOH	40.00	Corrosivo y tóxico.
Molibdato de sodio	NaMoO ₄ ·2H ₂ O	241.96	Irritante, higroscópico, almacena T.amb.
Nitrato de amonio	NH ₄ NO ₃	80.04	Irritante y oxidante.
Nitrato de calcio	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	236.15	Irritante y oxidante.
Nitrato de potasio	KNO ₃	101.11	Irritante y oxidante.
Nitrato de sodio	NaNO ₃	84.99	Oxidante y tóxico.
Biulfito de sodio	NaSO ₂	174.11	Inflamable.
Sulfato de amonio	(NH ₄) ₂ SO ₄	132.15	Irritante.
Sulfato de calcio dihidratado	CaSO ₄ ·2H ₂ O	172.20	Almacena a T. amb.
Sulfato de cobre pentahidratado	CuSO ₄ ·5H ₂ O	240.69	Altamente tóxico y corrosivo.
Sulfato de fierro III	FeSO ₄ ·7H ₂ O	278.03	Irritante en exposición prolongada.
Sulfato de magnesio	MgSO ₄ ·7H ₂ O	246.50	Higroscópico.
Sulfato de manganeso	MnSO ₄ ·1H ₂ O	169.01	Irritante en exposición prolongada.
Sulfato de potasio	K ₂ SO ₄	174.26	Irritante en exposición prolongada.
Sulfato de sodio	Na ₂ SO ₄	142.00	Altamente irritante.
Sulfato de zinc	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	142.05	Irritante e

			higroscópico, almacena T. amb.
Tiosulfato de sodio	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	248.19	Irritante e higroscópico.
Tiplex EDTA	Na_2EDTA	372.24	Irritante y almacena T.amb.
Yoduro de potasio	KI	166.01	Oxidante e irritante.

COMPOSICIÓN DE MEDIOS

SALES MS I NITRATOS

COMPUESTO	FÓRMULA	g por litro
Nitrato de potasio	KNO_3	190
Nitrato de amonio	NH_4NO_3	165

SALES II SULFATOS

Sulfato de magnesio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	37
Sulfato de manganeso	$\text{MnSO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$	1.69
Sulfato de zinc	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.860

SALES III HALÓGENOS

Cloruro de calcio	CaCl_2	44
Yoduro de potasio	KI	0.083
Cloruro de cobalto	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.002

SALES IV FOSFATOS, ÁCIDO BÓRICO Y MOLIBDATO

Fosfato de potasio monobásico	KH_2PO_4	17
Ácido bórico	H_3BO_3	0.620
Molibdato de sodio	$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.025

SALES V QUELANTES

Sulfato ferroso	FeSO ₄ ·7H ₂ O	2.784
Triplex EDTA	Na ₂ EDTA	3.724

VITAMINAS R2 (cantidades en mg)

Myoinositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	100
Ácido nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	0.5
HCl-piridoxina	C ₈ H ₁₁ NO ₃ ·HCl	0.5
HCl-tiamina	C ₈ H ₁₇ N ₄₀ SCI·HCl	10

VITAMINAS B5

Myoinositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	100
Ácido nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	1.0
HCl-pridoxina	C ₈ H ₁₁ NO ₃ ·HCl	1.0
HCl-tiamina	C ₈ H ₁₇ N ₄₀ SCI·HCl	10

VITAMINAS NITSH

Myoinositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	100
Ácido nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	0.5
HCl-pridoxina	C ₈ H ₁₁ NO ₃ ·HCl	5
HCl-tiamina	C ₈ H ₁₇ N ₄₀ SCI·HCl	0.5
Biotina	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	0.05
Glicina	C ₂ H ₅ NO ₂	0.5
Ácido fólico	C ₁₄ H ₁₉ N ₇ O ₆	2.0

COCK 20

Patente en tramite.

AUXINAS

Ácido indol-3acético	AIA	C ₁₀ H ₉ NO ₂
Ácido -naftalenacético	ANA	C ₁₂ H ₁₀ O ₂

CINETINAS

6-bencil aminopurina	BAP	C ₁₂ H ₁₁ N ₅
Cinetina(6-fufurilenina purina)	Kin	C ₁₀ H ₉ N ₅ O
6(-dimetilamina) purina	2ip	C ₁₀ H ₁₃ N ₅

ANTIOXIDANTES

L-ácido ascórbico	Vitamina C	$C_6H_8O_6$
Ácido cítrico		$C_6H_5O_7 \cdot H_2O$
Ácido(2-(Morpholino)ethalensulfónico	MES	$C_6H_{12}NO_4SNa$

Medio YM

Preparación de 1L

Extracto de levadura	0.4 g
Manitol	10 g
NaCl	0.1 g
MgSO ₄ 7 H ₂ O	0.2 g
K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O	0.5 g
Ó K ₂ HPO ₄	0.38 g

Disolver en 900 mL, ajustar pH a 7.0 y aforar a 1L esterilizar en autoclave.

Medio de alargamiento y enraizamiento de los brotes

Medio MS (Murashige & Skoog 1962)

Solución I	MS (nitratos)	100x	10mL
Solución II	MS (sulfatos)	100x	10mL
Solución III	MS (halógenos)	100x	10mL
Solución IV	MS (Ms, Pb, No)	100x	10 mL
Solución V	MS (EDTA, Fe)	100x	10mL
Glicina	(20mg/100mL)	100x	10mL
Vitamina R2			10mL
Sacarosa			30g
Gellan (sigma) Gelrite Gum			2.5g
pH			5.7

Preparación de las partículas de acuerdo a Guerrero-Andrade (1998).

- 1.- Se pesaron 60 mg de tugsteno de 0.4 μ m de diámetro (M5) colocándose en un tubo de centrifuga de 15 ml.
- 2.-Después se añadieron 2 ml de ácido nítrico (HNO₃) 0.1M y se sonicó en hielo durante 20 minutos.

- 3.-Posteriormente se eliminó el ácido nítrico agregándose 1 mL de agua desionizada estéril; la muestra se transfirió a un tubo de 2mL de capacidad y se sonicó brevemente.
- 4.-Las micropartículas se centrifugaron de 10-30 segundos a una velocidad de 10,000 r.p.m.
- 5.-Se eliminó el agua y se agregó 1 ml de etanol absoluto (100% y se sonicó brevemente.
- 6.- Se centrifugaron las micro partículas de 10 a30 segundos a una velocidad de 10,000 r.p.m.
- 7.-El etanol se eliminó, se agregó 1mL de agua desionizada estéril y se sonicó brevemente.
- 8.-Se colocaron 200 µL de la suspensión en un tubo eppendorf.
- 9.-Después se añadieron 750 µL de agua desionizada estéril a cada tubo.
- 10.-finalmente los tubos se almacenaron a –20°C.

Siembra de explantes

Preparación de medios de cultivo

Medio MS (murashige & Skoog, 1962) modificado para 1000ml.

Solución I	MS (nitratos)	100x	10ml
Solución II	MS (sulfatos)	100x	10ml
Solución III	MS (halógenos)	100x	10ml
Solución IV	MS (Ms, Pb, No)	100x	10 ml
Solución V	MS (EDTA, Fe)	100x	10ml
Glicina	(20 mg/100 ml)	100x	10ml
Vitamina R2			10ml
Fitoreguladores			
ANA		10mg/100 ml	1 ml
BAP		10mg/100 ml	20 ml
MES			1g
Sacarosa			30g
Gellan (sigma) Gelrite Gum			2.5g
pH			5.7

En 400 ml de agua desionizada estéril se vierten las soluciones anteriores y la sacarosa, se ajusta el pH a 5.7 utilizando NaOH o HCl al 1N, posteriormente se hidrata el gellan en 500 ml de agua desionizada estéril esparciéndolo en forma uniforme para evitar la formación de grumos; se coloca en el horno de microondas para que se disuelva totalmente por la temperatura tomando el tiempo aproximado de 1 min/100ml. Finalmente se calienta el medio y se junta con las sales y sacarosa y el gellan disuelto se afora y se vierte en frascos con 30 ml cada uno. Se esteriliza durante 18 min., a una temperatura de 120°C y a una presión de 1.2kg/cm² .

BIBLIOGRAFÍA

1. Ammirato, P.V. (1983). Embryogenesis. In: Handbook of plant cell culture. Vol. I D. Evans, W.R.Sharp, P.V. Ammirato & Yamada (eds) Mc Millan, New York, USA pp.82-123.
2. Ammirato P.V. (1987). Organization Events During Somatic Embryogenesis In: Plant Tissue and Cell Culture C. E. Green K. A. Somers, W.P. Hackett & pp.95-200.
3. Ascher P. D. y Peloquin S.J. (1968) Pollen tube growth and incompatibility following intra and interspecific pollinations in *Lilium longiflorum* .American Journal of Botany 55: 1230-1234.
4. Butcher D.N. & Ingram D.S. (1990) Plant Tissue Culture Edward Arnold Publishers, pp 68.
5. De Nettancourt, D. (1977) Incompatibility in angiosperms. Berlin, Heidelberg, New York Springer- Verlag, pag 217-221
6. Dimitri, M. 1987. Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. Tomo I. Descripción de plantas cultivadas. Editorial ACME S.A.C.I., Buenos Aires. *Solanaceae Source*. URL accedida el 2007-11-17.
7. Ebert P. R. Anderson M.A Bernatzky R., Altschuler M. y Clarke A. E. (1989) Genetic polymorphism of self- incompatibility in flowering plants. Cell 56: 255-262.
8. Hill, T.A, 1984 hormonas reguladoras de crecimiento vegetal, ediciones Omega Barcelona.pags124-197
9. McClure, B.A., Gray, J.E., Anderson, M.A, Y Clarke, A.E (1990) Naute 347:757.

10. McCubbin, A.G y Kao T-H. (1996) Molecular recognition and response in pollen pistil interactions. *Annu. Rev. Cell Dev Biol* 16: 333-364.
11. Murashige T. & Skoog F. (1963). A revised medium for rapid growth and assays with tobacco cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-497.
12. Nickell, L.G. (1982) Growth regulators. Pp 214-325, Springer, Verlag. Berlin.
13. Reinert, J. & Bajaj and B. Zbell (1977). Aspects of organization organogenesis cytodiferentiation. In *plant tissue and cell culture*. 2nd, Ed. Edited by H. E. Street. University of California Press, Berkeley, pp 389-497.
14. Reinert, J. & Bajaj and B. Zbell (1977) Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture. 2nd. Ed. Edited Spriger – Verlag, Berlin Heidelberg New York pp.186-188, 426-429.
15. Ribnicky, D.M., I. Nebojsa., J.D. Cohen & T.J Cooke (1996). The effects of Exogenous Auxins on Endogenous Indole-6-3 Acetic Acid Metabolism. *Plant Physiol* 112:549-558.
16. Roberts, J.A. y Hooley, R. (1989) *Plant Growth regulators*, Chapman and Hall, New York pp. 200-278.
17. Sherrington P. y George F. (1984). *Plant propagation by tissue culture Hand book and Directory of commercial Laboratories*. Eregcties limited England.
18. D'Arcy, William G. (1986), *Solanaceae*. ISBN 0-231-05780-6.
19. Stevens, P. F. (2001 en adelante). *Solanaceae. Angiosperm Phylogeny Website, versión 8, junio del 2007. Última actualización de la sección: 11-03-2007*. URL accedida el 2007-11-04.

20. Watson, L.; Dallwitz, M. J.. *Solanaceae. The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. Version: 1st June 2007.*. URL accedida el 2007-11-04.
21. Lehninger, A. L., 1976. *Curso breve de Bioquímica*. Omega, Barcelona, 447 pp.
- 22.-Christou, P., Ford, T.L. and Kofron, M., (1991). Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. *Biotechnology*, 9:957-962.
- 23.-Draper, J., Davey, M.R., Freeman, J.P., Cocking, E.C. and Cox, B.J. (1982) Ti plasmid homologous sequences present in tissues from *Agrobacterium* Ti plasmid-transformed *Petunia* protoplasts. *Plant cell physiology*. 23:451-458.
- 24.-Frame, B.R., Drayton, P.R., Bagnall, S.V. et al (1994). Production of fertile transgenic maize plants by silicon carbide whisker-mediated transformation. *Plant Journal*. 6:941-948.
- 25.-Fromm, M.E., F.M. Morrish, C. Armstrong, R. Williams, J Thomas & T.M. Klein (1990). Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. *Biotechnology*, 8: 833-839.
- 26.-Gordon-Kamm, W. W., T. M. Spencer, M.L. Mangano, T.R. Adams, R.J. Daines, W.G. Start, J.V. O'Brien, S.A. Chambers, W.R.W.R. Jr. Adams, N.G. Willets, T.B. Rice, C. V. Mackey, R.W. Krueger, A.P. Kaush & P.G. Lemaux (1990). Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *Plant cell*, 2: 603-618.
- 27.-Guerrero-Andrade, O. Tesis Maestría. Construcción de vectores para la transformación de plantas con los genes de las glicoproteínas de fusión y de la hemaglutinina-neuraminidasa del virus de la enfermedad aviar del

Newcastle y optimización de las condiciones de bombardeo CINVESTAV ., IPN Irapuato, 2000.

28.-Hahn-Hagerdahl, B., Hosono,K., Zachrisson, A. and Bornman, C.H. (1986). Polyethylene glycol and electric field treatment of plant protoplasts:characterization of some membrane properties. *Physiology plant.* 67:359-364.

29.-Haq, T.A., H.S. Mason, J.D. Clemens y Ch. J Arntzen (1995). Oral immunization with recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science* 268:714-716.

30.-Kaeppler, H.F., Gu, W., Somers, D.A., Rines, H.W. and Cockburn, A.F. (1990). Silicon carbide fiber-mediated DNA delivery into plants cells. *Plant cell.* 9:415-418.

31.-Klein, T.M., Wolf, E.D., Wu, R. and Sanford, J.C., (1987). High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells . *Nature.* 327:70-73.

32.-Klein, T.M, Gradziel, M.E. Fromm & J.C. Sanford (1988). Factors influencing gene delivery into *Zea mays* cells by high-velocity microprojectiles, *Biotechnology*, 6: 559-563.

33.-Klein,T.M. Knowlton, S. and Arentzen, R. (1991). Gene transfer by particle bombardment. In *plant Tissue Culture Manual*. Lindsey, K. (ed). Kluwer Academic Publishers, The Nertherlands, pp. D1:1-12.

34.-Krens, F.A., Molendijk, L., Wullmes, G.J. and Schilperoort, R.A. (1982). In vitro transformation of plants protoplasts with Ti DNA. *Nature* 296:72-74.

35.-Lindsey, K. (1992). Genetic manipulation of crop plants, *journal Boitechnology.* 26: 1-28.

36.-Mason, H.S., D.M-K Lam y Ch. J. Arntzen (1992). Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. Proceeding of the National Academy of Science USA 89:11745-11749.

37.-Mason, H.S., J.M. Ball, J.J. Shi, Xi. Kiang, M.K. Estes y Ch. J. Artzen (1996) espression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its ral inmunogenicity in mice. Proceeding of the National Academy of science USA 93: 5335-5340.

38.-McCabe, D.E., Swain, W.F., Martinell, B.J. and Christou, P. (1988). Stable transformation of soybean (glycine max) by particle acceleration. Biotechnology 6:923-926.

39.-Neuhaus, G., Spangenberg, G., Mittelsten-Scheid, O. and Schweiger, H.-G:(1987). Transgenic rape seed plants obtained by microinjection of DNA into microspore derived embryos. Theor. Appl. Genet. 75: 30-36.

40.-Nomura, K. and Komamine, A (1986). Embryogenesis from microinjected single cells in a carrot suspension culture. Plant Science. 44:53-58.

40.-Sowers, A. E.(1986). A long-lived fusogenic state is induced in erythrocyte ghosts by electric pulses. Journal Cell Biology. 102:1358-1362.

41.Trigiano, R.N. D.J. Gray. Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Excercises, CRC Press, Newe York, 2000, 297-305.

42.-Vasil, V., S.M. Brown, D. Re M.E. Fromm & I.K. Vasil (1991). Stably transformed callus lines from microprojectile bombardment of cell suspension cultures of wheat. Biotechnology, 9: 743-747.