

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

**Transformación genética de tomate de árbol (*Solanum betaceum*)
mediada por *Agrobacterium tumefaciens***

Andrea Arias Aguirre

Proyecto presentado como requisito para la obtención del título de B.S en Biotecnología

Quito

Enero de 2007

DERECHOS DE AUTOR

© Derechos de autor
Andrea Sofía Arias Aguirre
2006

DEDICATORIA

A mis padres que se esforzaron tanto por mi educación, que han confiado en mí y me han acompañado a lo largo del camino con amor y paciencia.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primero a María de Lourdes Torres y Venancio Arahana por siempre darme la oportunidad de investigar y crecer, por confiar en mí, por resolver mis dudas y aconsejarme para que este proyecto sea exitoso.

A la gente del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Castelar, Argentina por todo lo que me enseñaron y donaron, sin lo cual la realización de este proyecto no habría sido posible

A toda la gente del Laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito, que me facilitaron equipos, reactivos y lo más importante su experiencia y colaboración que fueron de gran ayuda para superar las limitaciones que tuve en cuanto a recursos. Quiero agradecer especialmente a Deysi por siempre estar dispuesta a ayudar y facilitar mi trabajo.

A todos los que trabajaron en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal mientras realizaba mi proyecto: Pedro José González, Luis Antonio Riofrío, José Tobar, Andrés Torres, Andrés Trávez, Soledad Ordoñez, por el apoyo que me dieron durante el desarrollo de este proyecto. Todos ellos más que compañeros se convirtieron en amigos.

A mis amigos, a todos, que siempre tuvieron palabras de apoyo en momentos difíciles.

Finalmente, pero más importante, quiero agradecer a Dios por mi familia que siempre me apoyó y confió en mí.

RESUMEN

Este proyecto pretende establecer un protocolo de transformación genética de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) mediada por *Agrobacterium tumefaciens* utilizando el plásmido pBI121 de clontech.

Para lograr este objetivo, se realizaron tres diferentes experimentos controlando variables como la fase de crecimiento de las bacterias, la utilización de extracto de papa como fuente de acetorringona, la producción de heridas en los explantes para aumentar la tasa de transformación y el uso o no del agente selectivo kanamicina durante las diferentes etapas del proceso.

El tercer experimento resultó exitoso, se transformaron 50 explantes de hoja con la cepa LB004 de *A. tumefaciens*. Después de los procesos de selección con kanamicina se obtuvieron 16 plantas potencialmente transgénicas. Utilizando primers específicos para la amplificar los genes GUS y NPTII, se confirmó la inserción del T-ADN del plásmido pBI121 en 3 plantas de tomate de árbol. También se obtuvo una planta positiva únicamente para el gen NPTII.

Más allá de la eficiencia del proceso, este es un estudio pionero en el país ya que no se han reportado trabajos de este tipo en ninguna especie vegetal. Los resultados obtenidos en este proyecto resaltan la posibilidad de introducir herramientas biotecnológicas para mejorar especies de importancia económica y consecuentemente competir eficientemente en el mercado global.

ABSTRACT

This project pretends to establish a transformation method mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in tamarillo (*Solanum betaceum*) using Clontech pBI121 plasmid.

To achieve this objective, three different experiments were performed, each one controlling different factors such as bacterial growth phase, the use of potato extract as a source of acetosyringone, production of wounds to increase the transformation rate, and the use or not of kanamycin during all the stages of the procedure.

The third experiment was successful; fifty leaf explants were inoculated with *A. tumefaciens* LB004. After growing the transformed explants in a medium containing the selection factor kanamycin, sixteen potentially transgenic plants were isolated. The insertion of the GUS and NPTII genes was determined by PCR using specific primers.

Although the efficiency of the procedure was not high, this study constitutes the first attempt of transforming plants in Ecuador since there are no reports, so far, of any work like this done in any plant specie. The results obtained from this project stress out the possibility of introducing the use of biotechnological tools to improve economically important species. Consequently, these improvements may help Ecuadorian crops to compete efficiently in the global market.

TABLA DE CONTENIDOS

Derechos de Autor.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos	v
Resumen.....	vi
Abstract	vii
1. Introducción:	1
1.1. Biotecnología Agrícola.....	1
1.2. Mejoramiento Vegetal.....	2
1.2.1. Técnicas de mejoramiento genético no tradicional	3
1.2.1.1. Regeneración de explantes	5
1.2.1.2. Ingeniería genética y tecnología del ADN recombinante.....	5
1.2.1.3. Transformación genética	7
1.2.1.3.1 .Técnicas de transformación mediada por vectores	7
1.3. Tomate de Árbol (<i>Solanum Betaceum</i>)	13
1.3.1. Generalidades.....	13
1.3.2. Situación del cultivo de tomate de árbol a nivel mundial	15
1.3.2.1 Cultivo de tomate de árbol en Nueva Zelanda	15
1.3.2.2 Cultivo de tomate de árbol en Ecuador	17
2. Objetivo General	19
3. Objetivos Específicos	19
4. Justificación	20
5. Área De Estudio.....	21
6. Materiales, Reactivos y Equipos	22
6.1. Material Vegetal.....	22
6.1.1. Esterilización de semillas de tomate de árbol	22
6.1.2. Medios para la germinación de semillas y subcultivo de plantas de tomate de árbol	22
6.2. Cepas Bacterianas utilizadas para la transformación.....	22
6.2.1. Medios de cultivo para las cepas de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	22
6.3. Transformación Genética de Explantes de Tomate De Árbol	23
6.4. Extracción de ADN de Plantas de Tomate de Árbol	23
6.5 Cuantificación de ADN.....	23
6.5. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	23
6.6. Electroforesis en Gel de Agarosa.....	24
7. Metodología.....	25
7.1. Cultivo in vitro de tomate de árbol	25
7.1.1. Obtención de semillas de tomate de árbol.....	25
7.1.2. Esterilización de semillas de tomate de árbol	25
7.1.3. Germinación de semillas de tomate de árbol	25
7.1.4. Cultivo in vitro de plantas madre de tomate de árbol para extracción de explantes de hoja.	25

7.2. Cultivo de cepas de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>.....	26
7.2.1. Experimento 1.....	26
7.2.2. Experimento 2.....	28
7.2.3. Experimento 3.....	29
7.3. Extracción de ADN de plantas de tomate de árbol potencialmente transformadas.....	31
7.4. Cuantificación y dilución de ADN de las 16 plantas potencialmente transformadas...	32
7.5. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).....	33
7.6. Electroforesis en gel de agarosa.....	34
8. Resultados	34
8.1. Experimento 1	34
8.2. Experimento 2	35
8.3. Experimento 3	36
8.4. Cuantificación y dilución de ADN de plantas.....	37
8.5. Resultados del PCR analizados en geles de agarosa	37
9. Discusión	38
9.1 Experimento 1.....	38
10. Conclusiones y Recomendaciones.....	43
10.1 Conclusiones.....	43
10.2 Recomendaciones.....	44
11. Bibliografía	46
12. Anexos	48
12.1. Figuras	48
12.2. Tablas.....	51

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

12.1. Figuras	48
Figura 1. Mapa genético del plásmido pBI121	48
Figura 2. Resultados de la PCR para el gen GUS (plantas del Experimento 3).....	49
Figura 3. Resultados de la PCR para el gen NPTII (plantas del Experimento 3).....	50
12.2. Tablas.....	51
Tabla 1. Medios de cultivo utilizados para el crecimiento de las cepas de <i>A. tumefaciens</i>	51
Tabla 2. Medios de cultivo utilizados para los explantes de tomate de árbol en el Experimento 1.	52
Tabla 3. Medios de cultivo utilizados para los explantes de tomate de árbol utilizados en el Experimento 2.....	53
Tabla 4. Medios de cultivo utilizados para los explantes de tomate de árbol utilizados en el Experimento 3.....	54
Tabla 5. Absorbancia, concentración y dilución de las muestras de ADN extraídas de las plantas de tomate de árbol, potencialmente transformadas, obtenidas en el Experimento 3.	55
Tabla 6. Secuencias de primer utilizadas para amplificar GUS y NPTII en las 16 plantas posiblemente transformadas	56
Tabla 7. Reactivos y concentraciones utilizados para una reacción de PCR de ADN de las 16 plantas posiblemente transformadas	56
Tabla 8. Resultados del Experimento 1 por caja.....	57
Tabla 9. Resultado del Experimento 2 por caja.	58
Tabla 10. Resultado del Experimento 3 por caja.	59
Tabla 11. Resultados del subcultivo de las plantas regenerada en el Experimento 3 a medio con kanamicina.....	60
Tabla 12. Porcentaje de supervivencia de las plantas de tomate de árbol, potencialmente transformadas, en medio de Selección (MS con 100 mg L ⁻¹ kanamicina).....	61

1. Introducción:

El desarrollo agrícola en el mundo, desde sus inicios, se ha servido de métodos químicos, físicos, biotecnológicos, entre otros, para poder aumentar la producción y mejorar la calidad de los alimentos.

1.1. Biotecnología Agrícola

De manera general, el glosario de biotecnología de la FAO define a esta disciplina como: “una variedad de biotecnologías moleculares como la manipulación de genes, la transferencia de genes, la tipificación del ADN y la clonación de plantas y animales” (FAO, Glosario de biotecnología, 2004). Por otro lado, el Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB) la define como: “toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos” (Secretaría del Convenio sobre Diversidad Biológica, 1992).

La agricultura inició hace unos 10 000 años a.C y la producción de algunos métodos biotecnológicos datan de hace 3000 años a.C, pero no fue sino hasta finales del siglo XIX, cuando Gregor Mendel identificó los principios de la herencia que sentaron las bases para los métodos básicos de mejoramiento (FAO, 2004). Fue en 1930 cuando aparecieron los primeros híbridos comerciales y durante el periodo entre 1940 y 1960 cuando se empezó a usar mutagénesis, cultivo de tejidos y regeneración de plantas (FAO, 2004). Sin embargo no fue sino hasta 1953, cuando se descubrió la estructura del ADN, que inició una evolución en la biotecnología. En 1970 fue posible la transferencia de genes gracias al descubrimiento de enzimas de restricción y ligasas, y para la década de 1980 aparecieron en el mercado los primeros productos fruto de la técnica del ADN recombinante. Finalmente con el nuevo milenio aparecieron la bioinformática, la

genómica, la proteómica y la metabolómica (FAO, 2004). Estos acontecimientos marcaron el inicio de las investigaciones tanto en plantas, microorganismos y animales.

1.2. Mejoramiento Vegetal

La alimentación mundial depende de la capacidad de producción de los agricultores, es por esto que la producción agrícola requiere de un gran dinamismo (Mendoza de Gyves, 2001). Esta situación se debe a cambios en los diferentes aspectos que regulan la producción agrícola como: los cambios en el mercado, cambios sociales, económicos y por supuesto ambientales (Mendoza de Gyves, 2001). Si bien es cierto que la mayoría de problemas en lo que respecta a producción agrícola se han solucionado con el uso de pesticidas, nuevas maquinarias y la obtención de variedades por métodos tradicionales, las exigencias actuales requieren de medidas más rápidas y con una base científica que asegure la optimización de recursos económicos y humanos. Es por esto que se han encontrado, en la biotecnología, técnicas para el mejoramiento que no se basan únicamente en la introducción de nuevos genes, sino en el estudio de especies y variedades a nivel molecular de tal manera de obtener resultados más precisos que puedan ser utilizados en beneficio de productores y consumidores. Es importante destacar que el mejoramiento vegetal busca también el conservar y estudiar los recursos fitogenéticos. En fin, las aplicaciones de la biotecnología en este sentido son muchas como: los marcadores moleculares, que identifican características y pueden servir como una forma de seleccionar plantas de interés; bancos de germoplasma que permiten conservar y estudiar los recursos filogenéticos; y otras técnicas utilizadas por la biotecnología agrícola tales como la manipulación y transferencia de genes.

De esta manera se pueden clasificar las técnicas de mejoramiento en: tradicionales y no tradicionales. Dentro de las técnicas del mejoramiento tradicional están: la

mutagénesis artificial, cruces tradicionales, producción de híbridos F1, selección en plantas de propagación vegetativa, selección en plantas autógamas y alógamas.

Por el tema de la presente investigación se describirán a continuación las principales técnicas utilizadas en el mejoramiento no tradicional.

1.2.1. Técnicas de mejoramiento genético no tradicional

Si bien es cierto que los programas de mejoramiento vegetal se han basado en la variabilidad genética de las especies o en la inducción de mutaciones, muchas de las características útiles no se encuentran dentro de la misma especie, género o familia, por lo tanto es imposible que haya una transferencia del gen por vía sexual (Mendoza de Gyves, 2001). Otra desventaja de los métodos tradicionales es el tiempo que duran los programas hasta poder obtener la variedad deseada. Es por esto que ha sido necesario recurrir a nuevas tecnologías que producen resultados más precisos en menos tiempo.

Por el momento estas nuevas tecnologías se basan en el cultivo *in vitro* y a partir de este se han desarrollado técnicas como el rescate de embriones inmaduros o rudimentarios fruto de la incompatibilidad sexual, el cultivo y fusión de protoplastos, y la transferencia de genes utilizando microinyección, electroporación, entre otros métodos.

Todas estas técnicas utilizan como base el cultivo *in vitro*, es decir, el cultivo de diferentes partes de la planta tales como órganos, tejidos, células o protoplastos en un medio que les provee de los nutrientes y factores de crecimiento necesarios y un ambiente libre de contaminación por microorganismos (Mendoza de Gyves, 2001).

El cultivo *in vitro* se basa en el hecho de que las células vegetales son inmortales y son capaces de regenerar una planta entera genéticamente idéntica a la planta de la cual provienen. Los explantes son pedazos de tejido vegetal que por lo general provienen de tejidos ya diferenciados. Las células de estos tejidos contienen la misma información genética que cualquier célula de la planta, pero su estado de diferenciación les permite

expresar solo algunos genes. Sin embargo, las células vegetales tienen la posibilidad de regresar a su estado primordial o totipotente y dar, así, lugar a una nueva planta. Las plantas obtenidas son por lo tanto clones de la planta de la cual proviene el tejido (Mendoza de Gyves, 2001).

Las células totipotentes son capaces de regenerar órganos tales como retoños o raíces en un proceso denominado *organogénesis somática* o regenerar embriones en un proceso llamado *embriogénesis somática*. Para el cultivo in vitro se debe identificar las características de la especie y los requerimientos del cultivo in vivo tales como pH, temperatura, salinidad, horas luz, requerimiento hormonal. El cultivo in vitro tiene algunas aplicaciones como: La *micropropagación* que brinda la posibilidad de producir plantas genéticamente idénticas, de tal forma de garantizar la estabilidad de las mismas, además también permite aumentar el número de plantas en un espacio y tiempo reducido (Dixon & González, 1994; Mendoza de Gyves, 2001). La micropropagación es muy útil sobre todo en plantas con problemas de reproducción, infértiles o con baja producción de semilla. Otra aplicación importante es la eliminación de patógenos tales como virus y bacterias, esta se basa en el cultivo de tejido meristemático el cual no es afectado por patógenos. De esta forma se elimina la contaminación y se obtiene una planta idéntica a la original pero libre del patógeno. La *variación somaclonal* es un fenómeno que se da por las condiciones del cultivo in vitro. No todas las plantas generadas son idénticas genéticamente y de hecho esta situación es utilizada como una fuente para aumentar la variabilidad genética del material cultivado in vitro. Esta variación esta basada en mutaciones a nivel de bases en el ADN o de cromosomas y permiten luego seleccionar mutaciones que dan como resultado la expresión de características deseadas. En la actualidad hay formas de inducir estas mutaciones por exposición a agentes radioactivos, químicos, herbicidas, pesticidas, de tal manera de que las plantas muten y se adapten (Mendoza de Gyves, 2001).

1.2.1.1. Regeneración de explantes

La micropropagación de plantas durante la década de los 90 superó los 100 millones por año (Dixon & González, 1994). Los explantes elegidos para la micropropagación pueden ser yemas apicales, yemas axilares. También se utilizan, dependiendo de la disponibilidad del material vegetal, pedazos de hoja o flores. Estos explantes, a pesar de estar formados por tejido vegetal diferenciado, son capaces de regenerar plantas viables (Dixon & González, 1994; Mendoza de Gyves, 2001).

El medio de cultivo utilizado, por lo general, es el de Murashige & Skoog (1962) para la mayoría de las especies de plantas, sobre todo si los explantes son yemas. Las variaciones al medio de cultivo dependen de las diferentes necesidades de las plantas en cuanto a la concentración de sales y el tipo de explante que se utiliza. En el caso de las hojas y las flores, es necesario agregar, al medio de cultivo, hormonas vegetales que ayudan al proceso de diferenciación y división celular. En este tipo de cultivo se forma un callo, es decir un tejido no organizado de células vegetales que pueden dar origen a una planta. De un callo puede salir más de una planta, pero cada planta proviene en teoría de una sola de las células del callo. Es la combinación de auxinas y citoquininas las que permiten la regeneración de plantas a partir de explantes (Dixon & González, 1994).

Las plantas obtenidas a partir de callo deben ser cambiadas a medios de elongación, es decir, medios que promuevan el crecimiento de los espacios entre los nudos de las plantas.

Finalmente, las plantas deben pasar a un medio de enraizamiento. Por lo general, las plantas enraízan solas, pero en algunos casos es necesario añadir auxinas o cambiar las condiciones físicas del cultivo para promover el enraizamiento (Mendoza de Gyves, 2001).

1.2.1.2. Ingeniería genética y tecnología del ADN recombinante

Si bien muchos de los métodos de fitomejoramiento tradicional logran la introducción de la característica deseada, lo hacen a costo de la calidad física o bioquímica

de la planta, además requieren mucho tiempo de experimentación para poder lograr resultados óptimos. La ventaja principal de la ingeniería genética es su capacidad de romper las barreras entre organismos que se encuentran muy separados desde el punto de vista genético. Esta capacidad amplía la posibilidad del método para suplir de variabilidad genética a las especies.

En 1953, Watson y Crick descubrieron la estructura molecular del ADN. Este fue sin duda un paso importante para el desarrollo de la ingeniería genética ya que esta molécula es la encargada de llevar toda la información que necesita un organismo para cumplir sus funciones vitales y más importante aún es que tiene la capacidad de heredarse a la progenie. A mediados de los años 60 se comprendieron los complejos procesos moleculares de transcripción y traducción (Mendoza de Gyves, 2001). Los estudios moleculares en la década de 1970 permitieron encontrar las enzimas de restricción y ligasas. Estas enzimas reconocen secuencias específicas en la secuencia de ADN en donde las enzimas de restricción se encargan de cortar y las ligasas de unir. La técnica del ADN recombinante utiliza estas enzimas para crear secuencias de ADN diferentes a aquellas que se encuentran originalmente en la naturaleza. Las diferentes construcciones obtenidas por medio de esta técnica pueden ser introducidas en bacterias o virus con diferentes propósitos. Uno de los primeros productos del ADN recombinante fue la insulina humana, hoy la técnica es muy utilizada para la producción de vacunas, antibióticos, enzimas para la industria alimenticia, etc.

Las plantas con nuevos genes introducidos se denominan transgénicas. La transgénesis no es sino la introducción de nuevos genes al genoma de un organismo por métodos diferentes al sexual (Dixon & González, 1994; Mendoza de Gyves, 2001). De manera general, la transformación de plantas requiere del cultivo in vitro de tejidos, células

o protoplastos y además de métodos de regeneración de plantas efectivos a partir de estos tejidos.

1.2.1.3. Transformación genética

En lo referente al mejoramiento vegetal, la técnica del ADN recombinante ha sido utilizada para la construcción de segmentos de ADN que permitan introducir genes que le den a la planta diferentes características como resistencia a enfermedades, stress abiótico, tolerancia a herbicidas o para aumentar su calidad nutricional a pesar de que los genes necesarios no se encuentren dentro del pool de genes de la especie. Existen varias técnicas que han sido utilizadas para introducir estas nuevas construcciones genéticas en plantas. Durante años los principales métodos de transformación trataron de introducir genes usando *Agrobacterium tumefaciens*, microláser, microinyección y aplicación directa de ADN, siendo el primero, el método de preferencia para transformar la mayoría de especies vegetales. Los otros métodos se utilizan únicamente para especies reticentes, es decir especies que no pueden ser transformadas por *Agrobacterium tumefaciens* (Siemens & Schieder, 1996).

En la actualidad se dispone de nuevas herramientas para la transformación que se adaptan al tipo de planta y a las diferentes condiciones de transformación. El método más utilizado es el de transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Siemens & Schieder, 1996).

1.2.1.3.1 .Técnicas de transformación mediada por vectores

Existen algunos agentes bacterianos y virales que han sido utilizados para la transformación como portadores de los genes que se desean introducir. Aunque este conocimiento es reciente, se han logrado algunos resultados exitosos.

Transformación mediada por vectores virales. Los virus son microorganismos simples que no se consideran como seres vivos. Están constituidos básicamente de una

molécula de ADN o ARN y proteínas. Estos microorganismos no tienen la capacidad de reproducirse por sí solos es por eso que buscan células procarióticas o eucarióticas para hacerlo. Este proceso de invasión y secuestro de la maquinaria celular se denomina infección. Para que la infección sea efectiva, los virus se integran al genoma de la célula, duplicándose al mismo ritmo que la célula o aumentando su propia tasa de duplicación. Esta técnica se basa en la sustitución de algunos de los genes de los virus y la inserción de genes deseados. La investigación basada en virus se ha difundido con la utilización de bacteriófagos (virus que infectan bacterias) que han permitido la inserción de algunos genes de interés para la producción en masa de antibióticos, vacunas, entre otros. En lo que respecta a las plantas, una de las limitaciones es la poca cantidad de grupos de virus que contengan ADN, solo los caulimovirus y germinivirus son virus de ADN. Esto limita un poco las posibilidades de transformación ya que el rango de infección es restringido. Lo importante de esta técnica es que el virus se puede expandir por todo el tejido vegetal, pudiendo así, llegar a las semillas y por lo tanto transmitir los genes insertados a la progenie (Mendoza de Gyves, 2001).

Transformación mediada por vectores bacterianos. El desarrollo de esta técnica se inició como la mayoría de descubrimientos en la ciencia, con la observación. A inicios del siglo XX, Smith y Twonsend estudiaron una enfermedad típica del tallo de la planta llamada agalla de cuello y que era causada por una bacteria del género *Agrobacterium* (Hooykaas & Schilperoort, 1992; Stanton, 2000). Lo que más llamó la atención fueron las protuberancias o tumores que esta bacteria causaba en la planta, estos tumores se debían a la proliferación excesiva de las células vegetales. Después de mucho tiempo, en el cual las observaciones de Smith y Twonsend fueron ignoradas, la investigación en esta enfermedad revivió cuando se encontró cierta evidencia interesante (Hooykaas & Schilperoort, 1992).

En cultivos *in vitro*, células extraídas de estos tumores eran capaces de duplicarse a una velocidad mayor que las células control extraídas de tejido no infectado, además se vio que podían duplicarse aún sin presencia de fitohormonas y finalmente lo más impactante fue el hecho de que las células podían continuar con el mismo comportamiento aún después de que la bacteria había sido eliminada del cultivo *in vitro*. En años posteriores se descubrió que las células tumorales tenían la capacidad de producir proteínas ajenas al tejido vegetal denominadas opinas. A finales de los 60, se descubrió que las diferentes cepas de *Agrobacterium* producían diferentes tipos de opinas y después de algunos años se concluyó que estas opinas eran el alimento de la bacteria. En la década del 70 se descubrió que algunas de las cepas virulentas de *Agrobacterium tumefaciens* poseían un largo elemento extracromosómico y que en éste se encontraban los genes que intervenían en la patología de la enfermedad así como los genes para la producción de opinas. En un inicio se pensó que se trataba de un bacteriófago lisogénico pero posteriormente se determinó que se trataba de un plásmido de más de 200 kb el cual se denominó plásmido Ti (inductor de tumor, por sus siglas en inglés). En 1977, con ayuda de las técnicas de ingeniería genética disponibles en el momento se comprobó que las células extraídas de tumores eran capaces de transmitir la información de la bacteria de generación en generación (Mendoza de Gyves, 2001; Hooykaas & Schilperoort, 1992).

El plásmido Ti posee un segmento llamado T-ADN. Este segmento tiene múltiples copias de genes que codifican para opinas y genes que codifican para fitohormonas. Con el uso de Southern Blot se descubrió que existen dos segmentos, uno a la derecha y el otro a la izquierda del plásmido Ti, que se transfieren independientemente a las células vegetales durante la inducción del tumor. Por esta razón los segmentos se denominaron T_L-ADN y T_R-ADN, por sus siglas en inglés. El segmento T_L-ADN resultó ser oncogénico mientras que el otro no (Stanton, 2000). Por otro lado, la secuenciación de las regiones T del

plásmido Ti muestran que este segmento está rodeado por una repetición conservada de 24 bp. Se comprobó que ninguna célula tumoral contiene segmentos de ADN del plásmido Ti que se encuentre fuera de estas secuencias flanqueantes, por lo tanto se pudo concluir que estas secuencias flanqueantes son señales de reconocimiento para la transferencia. El número de copias insertadas va de una hasta unas doce que es lo máximo que se ha encontrado, estas copias pueden insertarse en el mismo locus o en locus diferentes. Por secuenciación se ha comprobado que el T-ADN tiene señales de expresión eucarióticas tales como la caja TATA para inicio de transcripción y una terminal AATAAA que está envuelto en la poliadenilización. El segmento del plásmido Ti que contiene los genes de hormonas se denomina *tms* (tumor morphology shoot) o también conocidos como genes *onc* y en éste se encuentran los genes *aux* y *cyt* denominados así por su similitud con los genes que producen auxinas y citoquininas en células vegetales. La existencia de estos genes se comprobó ya que cepas mutantes para estos genes perdían su actividad oncogénica, la misma que podía ser sustituida por adicción de dichas hormonas al medio de cultivo. La presencia de estos genes en el T-ADN explicó porque las células podían proliferar aún en ausencia de fitohormonas. En este segmento de ADN también existen genes que codifican para la opino-sintetasa, enzima necesaria para la producción de opinas. Otras observaciones importantes en este tema fueron las relacionadas al rango de infección de la bacteria, se observó que las plantas monocotiledóneas no forman estos tumores por lo tanto se asumió que no hay transferencia del T-ADN a estas plantas (Hooykaas & Schilperoort, 1992; Stanton, 2000).

Para que se de la formación del tumor en las plantas son necesarios algunos pasos clave:

1. Reconocimiento de la planta blanco por parte de la cepa de *A. tumefaciens*
2. Adhesión de la bacteria a las células vegetales.

3. Transferencia del T-ADN.
4. Integración del T-ADN al genoma.
5. Expresión de los síntomas en la planta.

(Hooykaas & Schilperoort, 1992).

Para que se de la colonización de la planta por parte de la bacteria es necesario que la planta presente heridas que permitan la entrada de la bacteria y la liberación de compuestos vegetales que induzcan el sistema de virulencia bacteriana. Esto permite que la bacteria se reproduzca al interior del tejido vegetal. Los genes del T-ADN transferido son expresados aún antes de la integración al genoma. Los tumores generados son una mezcla de células que contienen T-ADN y de células normales sometidas a la acción de las hormonas (Hooykaas & Schilperoort, 1992; Stanton, 2000).

Los genes de virulencia también son importantes en el proceso. Estos se denominan genes *vir*, estos genes representan un segmento de unas 40 pb aproximadamente y los genes *chv* son los responsables de la transferencia del T-ADN a las células vegetales. Se comprobó que los genes envueltos en la transferencia del T-ADN se encuentran fuera de este segmento ya que a pesar de que de todos los genes en este segmento fueron inactivados sí se produjo la transferencia del T-ADN (Stanton, 2000). Los genes *chvA* y *chvB* son los responsables de la adhesión de *Agrobacterium* a la pared celular. Los genes *vir* se encuentran en 8 operones *virA- virH*. Los genes *chv* se expresan constitutivamente mientras que los genes *vir* son parte del sistema de virulencia que se activa una vez que la bacteria entra en contacto con las heridas y los exudados de las mismas. Estos exudados son compuestos fenólicos que la planta secreta por las heridas, uno de los más conocidos y utilizados en la actualidad para la transformación mediada por *A. tumefaciens* es la acetosiringona que es el compuesto fenólico más efectivo para activar los genes *vir* en las solanáceas (Hooykaas & Schilperoort, 1992; Stanton, 2000).

Todo el conocimiento de este proceso a nivel molecular ha permitido que el plásmido Ti sea utilizado como vector para la transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Los estudios moleculares han demostrado que la única parte del plásmido Ti que se incorpora a las células vegetales es el T-ADN ya que este se encuentra en un replicón diferente al del resto del plásmido. Por lo tanto se puede manipular únicamente el T-ADN con fines de transformación (Hooykaas & Schilperoort, 1992).

La nueva información insertada en el plásmido Ti puede ingresar por dos vías. La vía *cis* en los cuales los genes entran por recombinación homologa con el T-ADN presente en el plásmido y la vía binaria, en la cual los genes son clonados en un plásmido que contiene un T-ADN artificial. En ambos casos los plásmidos son reinsertados a la cepa de *Agrobacterium*. Sin embargo, no solo se pueden insertar los genes de interés ya que es necesaria la selección de las plantas transformadas en etapas tempranas de experimentación, por esta razón se usan genes de resistencia a herbicidas o antibióticos para la selección temprana (Hooykaas & Schilperoort, 1992; Stanton, 2000). Los genes insertados usan también promotores y terminadores comerciales como el 19S, 35S, tNOS, entre otros. En la actualidad también se usan genes reporteros como el gen de la β -galactosidasa, β -glucoronidasa, estos genes codifican para enzimas que producen reacciones colorimétricas cuando entran en contacto con el sustrato correspondiente.

Debido a que los genes mencionados anteriormente requieren de la destrucción del tejido vegetal para la reacción, hoy existe un nuevo gen llamado GFP (Green Fluorescent protein) extraído de una medusa, el cual se expresa sin necesidad de una reacción enzimática y por tanto se puede observar a las plantas transformadas en etapas mucho más tempranas como se ha visto en ensayos con especies vegetales y animales (Songbiao et al, 2005).

1.3. Tomate de Árbol (*Solanum Betaceum*)

1.3.1. Generalidades.

La familia Solanaceae es una de las familias de mayor importancia económica a nivel mundial, ya que de esta familia provienen la mayor parte de alimentos que consumimos como el tomate, la papa, la pimienta, el tabaco y algunas frutas como la naranjilla, el tomatillo y el tomate de árbol (Bohs, 1989).

El tomate de árbol sufrió una serie de cambios taxonómicos desde que en 1799, Cavanilles, lo denominó como *Solanum betaceum*. El tomate de árbol se mantuvo en este género hasta que Sendtner en 1845 lo cambió al género *Cyphomandra*. Finalmente Bohs, en 1995 lo reasigna en el género *Solanum* (Heiser & Anderson, 1999).

El tomate de árbol, comúnmente se conoce también como tree tomato o Tamarillo (Atkinson et al, 1994). Es un arbusto leñoso, de rápido crecimiento y ciclo vegetativo perenne (Prohens et al, 1996; Morton, 1982). Es propio de las regiones subtropicales, nativo de los Andes sudamericanos y ha sido introducido en Nueva Zelanda, California y Florida a mediados del siglo diecinueve (Atkinson y Gardner et al, 1993; Atkinson et al, 1994; Prohens et al, 1996). No se conoce bien su origen, ni parientes silvestres, aunque se han reportado algunos tentativamente, encontrados desde el sur de Bolivia hasta el Norte de Argentina. Se sabe que el centro de origen del tomate de árbol es América del Sur ya que tiene la mayor cantidad de especies nativas del género *Cyphomandra*, al cual antiguamente pertenecía el tomate de árbol, sin embargo esto no ha permitido conocer la región exacta de origen y tampoco hay registros claros sobre su domesticación (Bohs, 1989).

La información sobre las variedades de cultivo, parientes silvestres y especies relacionadas es escasa y está basada en taxonomía tradicional, razón por la cual muchas

veces se ha confundido *S. betaceum* con *C. crassiflora* en la literatura científica, sobre todo cuando aún pertenecía al género *Cyphomandra*. (Bohs, 1989). Esta falta de información es la principal causa para la falta y fracaso de los programas de mejoramiento vegetal en esta especie.

Este cultivo es muy susceptible sobre todo a ciertos virus como: Cucumber mosaic virus (CMV), Arabis Mosaic Virus (ArMV), Virus del mosaico de la papa (PAMV), virus del mosaico del Tamarillo (TaMV) (Barghchi, 1997). También es susceptible a otros patógenos como: *Colletotrichum sp.*, *Phytophthora sp.*, *Alternaria sp.*, *Sclerotinia sp.*, *Botrytis sp.*, *Oidium sp.*, *Pseudomonas solanacearum*, *Cercospora sp.*, *Phoma sp.*; nemátodos, ácaros y varias especies de áfidos (Soria, 2002). El mal manejo de los cultivos así como los requerimientos internacionales obligan a los agricultores a mudar los suelos causando erosión y deforestación.

Existen algunas características que hacen que el tomate de árbol sea un fruto atractivo para el consumo y la producción, por ejemplo, muchos estudios realizados en varios países de Europa le atribuyen al tomate de árbol o tamarillo un alto contenido de vitamina C. Adicionalmente se sabe que el tamarillo contiene algunos elementos que evitan enfermedades degenerativas como el cáncer y las enfermedades cardíacas. Entre estos fitoquímicos se encuentran algunas antocianinas, betacarotenos, luteína, entre otras (Meadows, 2002; Ministerio de Agricultura del Ecuador, 2000). El conocimiento de los beneficios del tomate de árbol, así como el agradable sabor, la facilidad y el amplio campo de industrialización de esta fruta, llevaron a este cultivo a ser uno de los de mayor importancia en lo que se refiere a frutales andinos (Meadows, 2002).

1.3.2. Situación del cultivo de tomate de árbol a nivel mundial

Como se mencionó anteriormente, y gracias a varios estudios se ha determinado que el tomate de árbol es nativo de los Andes sudamericanos. Sin embargo, esta planta fue introducida en países como Estados Unidos y Nueva Zelanda, siendo éste último el país que más ha desarrollado el cultivo a nivel comercial, junto con Ecuador y Colombia. (Atkinson y Gardner et al, 1993; Atkinson et al, 1994; Prohens et al, 1996).

1.3.2.1 Cultivo de tomate de árbol en Nueva Zelanda

Nueva Zelanda es el mayor productor de frutos introducidos, ya que aquí se introdujo una alta cantidad de material vegetal, especialmente especies frutales andinas, antes del endurecimiento de las leyes de seguridad fitosanitaria. Se introdujeron algunas variedades de tomate de árbol y otras especies pertenecientes a los géneros *Solanum* y *Cyphomandra*. Sin duda el tomate de árbol resultó ser la especie introducida más productiva y rentable. La eficiencia en la productividad del tomate de árbol se debió a su capacidad de adaptarse a las nuevas condiciones. Hoy en día se sabe que existe cierto nivel de diversidad genética de las variedades de tomate de árbol cultivadas en Nueva Zelanda, producto de mutaciones al azar que ocurrieron en las semillas introducidas (Meadows, 2002).

A nivel taxonómico se conocen 34 especies silvestres relacionadas al género *Cyphomandra*. De estas 34 especies, 10 de estas fueron introducidas a Nueva Zelanda y solo 7 lograron crecer óptimamente en los campos de este país. Sin embargo solo 3 de estas 7 especies sobrevivientes han mostrado la producción de híbridos viables para el fitomejoramiento. A pesar de la obtención de estos híbridos, no todos los problemas del cultivo se resolvieron. Por esta razón los fitomejoradores neozelandeses vieron la necesidad de hacer nuevos ensayos para lo cual era necesario contar con las demás

especies silvestres relacionadas de tal manera de analizarlas y buscar otras características de interés agronómico (Meadows, 2002).

A pesar de que la introducción de las especies silvestres relacionadas al cultivo de tomate de árbol era necesaria para el mejoramiento del cultivo, la ley de Biodiversidad de Nueva Zelanda que entró en vigencia en 1998 impedía que estas especies entraran al mencionado país. Ante esta imposibilidad, los científicos y fitomejoradores buscaron una herramienta alternativa de mejoramiento basada en la transformación genética (Meadows, 2002).

Uno de los primeros experimentos reportados en Nueva Zelanda fue desarrollado por Janssen y Garner en 1989, que al entender los problemas y la dificultad en la producción de híbridos, obtuvieron plantas transgénicas a partir de explantes de hoja de tomate de árbol utilizando un vector binario pKIWI110 que contenía los genes GUS y NPTII. En este experimento se logró obtener plantas de tomate de árbol transgénicas que incorporaron a su genoma y expresaban los genes citados anteriormente (Atkinson y Gardner, 1993).

La distribución para fondos de investigación que hay en Nueva Zelanda ha sido destinada principalmente a la experimentación en frutas andinas introducidas como el tomate de árbol y el pepino dulce. Esta situación, sumada a la alta cantidad recursos humanos que aportan al desarrollo e investigación en biotecnología son la principal razón para que Nueva Zelanda sea el mayor productor de tomate de árbol a nivel mundial y el primer país que tiene eventos transgénicos de tomate de árbol, resistentes a virosis comunes, probados a pequeña escala en ensayos de campo (Meadows, 2002).

1.3.2.2 Cultivo de tomate de árbol en Ecuador

En el Ecuador, el tomate de árbol es una fruta de consumo nacional, cuya producción se realiza principalmente en las siguientes localidades: Ambuquí, San Gabriel, Bolívar, Pimampiro, Ibarra, Atuntaqui, Tumbaco, Puenbo, Tambillo, Latacunga, Salcedo, Pelileo, Huachi, Baños, Biblián, Gualaceo, Paute, Girón, Santa, Isabel, Loja (SICA, 2004). En el período comprendido desde comienzos de 2002 hasta febrero de 2005, las exportaciones de tomate de árbol fresco desde el Ecuador fueron de 47.060 toneladas, siendo España, Estados Unidos, Chile, Alemania, Holanda, Reino Unido, Canadá y Aruba los principales países a los que se les vendió este producto (BCE, 2005). Sin embargo, los últimos datos registrados en el 2000 mostraron una disminución del 90.4%, en la producción nacional de esta fruta lo que implicó que ésta tenga que ser importada para satisfacer el consumo interno (SICA, 2004). A pesar de que Ecuador es el segundo productor de tomate de árbol en Sudamérica después de Colombia, se ha visto obligado a importar desde Colombia casi 660.000 toneladas en los últimos 3 años (BCE, 2005; Corporación Colombia Internacional, 2000). La forma más comercializada es la parte comestible son los frutos que se usan principalmente para la producción de jugos o productos enlatados (Atkinson y Gardner, 1993; Prohens et al 1996).

La producción de tomate de árbol en el Ecuador está seriamente limitada por la presencia de enfermedades y plagas, así como por las restricciones medioambientales y las condiciones de suelo (Soria, 2002). En el Ecuador los principales problemas de este cultivo son el ataque de nemátodos y virus (Barghchi, 1997) que pueden reducir la producción hasta en un 100%. Otro problema en la producción del tomate de árbol, no solo en Ecuador sino también en Colombia, es la baja demanda a nivel internacional de los frutos debido a la baja calidad de los mismos. Las exigencias del mercado como la uniformidad y la identidad varietal no han podido ser conseguidas por los productores nacionales

(Corporación Colombia Internacional, 2000). Esta falla en la producción limita la comercialización de los frutos y cierra el mercado de la industria de procesados donde se debe cumplir estándares ya establecidos para la exportación, (Cubero, 2003). Existen también problemas para cumplir con las normas fitosanitarias que exigen algunos países para el ingreso de fruta fresca. Ni siquiera el uso extensivo de pesticidas, que además han causado graves problemas ecológicos, ambientales y de salud humana, puede garantizar que los frutos exportados cumplan la norma fitosanitaria exigida, ni la calidad de fruto requerida. Es por esto que los países sudamericanos productores de tomate de árbol se enfrentan con la necesidad urgente de iniciar programas de mejoramiento en esta especie que busquen incorporar genes de resistencia a plagas y enfermedades así como otras características deseables (Cubero, 2003; Soria, 2002).

El tomate de árbol tiene a nivel comercial tres variedades: morado, amarillo redondo y amarillo puntón. Los agricultores de la sierra andina acostumbran sembrar en el mismo lote o en lotes vecinos las tres variedades comerciales de tomate de árbol. Este descuido de los agricultores ha generado mezclas entre las variedades impidiendo la identificación varietal causando así, como se mencionó anteriormente, problemas para la comercialización de los frutos (Albornoz 1992).

Como ya se ha mencionado, un programa de mejoramiento, es la estrategia para optimizar las condiciones de cultivo de esta fruta. Es por eso que países en vías de desarrollo, como el Ecuador, necesitan buscar en la biotecnología una respuesta a estas necesidades. La biotecnología ofrece técnicas de cultivo *in vitro*, que presentan grandes ventajas a nivel de tiempo y costos; marcadores moleculares que permiten realizar análisis genéticos de variedades en busca de genes de interés y la transformación genética que permite obtener variedades con genes específicos, entre otras.

La información que existe sobre esta especie es escasa como ya se mencionó y la caracterización fenotípica de las diferentes variedades no ha sido útil para implementar programas de fitomejoramiento exitosos (Soria, 2002). La transformación genética brinda la posibilidad de introducir genes para obtener características deseables, de una forma más rápida y, además, abre la posibilidad de usar genes que se encuentran fuera del pool genético de la especie o genes de interés que se encuentran fuera del género, es decir, que para rompe las barreras interespecíficas e intergenéricas (Atkinson y Gardner, 1993).

Si bien es cierto que la transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* no es la primera opción para el fitomejoramiento en países en vías de desarrollo, ya existen este tipo de ensayos como los realizados por Janssen y Garner en 1989 Nueva Zelanda (Atkinson y Gardner, 1993). Estos eventos demuestran que la biotecnología no es solo una herramienta útil sino que es la herramienta de elección en los países desarrollados para mejorar especies vegetales.

En la presente investigación se realizaron algunos experimentos para establecer las condiciones óptimas de transformación genética de explantes de hojas de tomate de árbol mediada por *A. tumefaciens* que contiene el plásmido pBI121

2. Objetivo General

- Establecer un protocolo de transformación genética de tomate de árbol mediada por *Agrobacterium tumefaciens* utilizando el plásmido pBI121.

3. Objetivos Específicos

- Transformar explantes de hoja de tomate de árbol utilizando *Agrobacterium tumefaciens* LB004 que contiene el plásmido pBI121.

- Desarrollar métodos para la formación de callo y la regeneración de plantas a partir de explantes de hoja de tomate de árbol sometidos al proceso de transformación.
- Establecer métodos eficientes para seleccionar, en etapas tempranas del proceso, plantas de tomate de árbol transformadas.
- Verificar la integración del T-ADN del plásmido en el genoma de la planta y la expresión de los genes GUS y NPTII en la plantas de tomate de árbol transformadas.

4. Justificación

Por lo expuesto anteriormente es necesario encontrar en la biotecnología métodos útiles que permitan un desarrollo sostenible de la agricultura, no solo a nivel ambiental sino también social. Es importante destacar la necesidad de la investigación en esta área, sobre todo en los países en vías de desarrollo ya que es en estos donde se concentra el mayor porcentaje de la población con dificultad de acceso a alimentos. Para estos países es esencial optimizar la producción interna de manera de asegurar el futuro de los habitantes y el desarrollo de las sociedades. Es por esto que para el Ecuador es imperativo el desarrollo de estas nuevas tecnologías de tal manera de aplicarlas en cultivos de consumo tradicional. Consecuente con estas necesidades, el proyecto planteado pretende transformar plantas de tomate de árbol con genes marcadores y reporteros de tal manera de poner a punto un protocolo de transformación genética que pueda ser utilizado posteriormente con fines de mejoramiento.

La importancia de este proyecto, además de ser innovador en el país, es el demostrar que se puede utilizar estas tecnologías en el campo de la agricultura para satisfacer tanto a productores como a consumidores. Este proyecto marca el inicio de una

serie de investigaciones que pretenden solucionar problemas relacionados al cultivo, especialmente para lograr transformaciones genéticas que le de a la planta la capacidad de resistir a plagas o enfermedades, así como darle la posibilidad de aumentar la calidad o alguna otra característica deseada.

El Ecuador es un país agrícola, son muchos los cultivos de importancia en el país y son aún más los problemas que enfrentan los agricultores. El tomate de árbol (*Solanum betaceum*), es un cultivo importante y con un potencial alto para la exportación, ya sea como fruta fresca o como producto procesado. En párrafos anteriores se mencionaron los problemas que enfrenta este cultivo, así como la falta de programas de fitomejoramiento, que han impedido el desarrollo en la producción de tomate de árbol lo que consecuentemente no permite que el Ecuador pueda competir con otros países productores de esta fruta.

Es importante recalcar que este trabajo representa una experimentación pionera en el país, ya que no se han reportado otros datos experimentales de este tipo en ninguna especie.

Además hay que mencionar que este proyecto se llevó a cabo siguiendo las normas de bioseguridad apropiadas para este tipo de experimentación. Todo el material vivo utilizado se mantuvo en confinamiento y fue tratado adecuadamente antes de ser desechado.

5. Área De Estudio

Este proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales de la Universidad San Francisco de Quito. Cumbayá, Ecuador.

6. Materiales, Reactivos y Equipos

6.1. Material Vegetal

- Tomate de árbol proveniente del mercado quiteño cuyas semillas se utilizaron para la germinación in vitro de plantas y posterior extracción de hojas que fueron utilizadas como explantes para la transformación.

6.1.1. Esterilización de semillas de tomate de árbol

- Solución de alcohol potable al 70%
- Solución de hipoclorito de sodio al 2,5%
- Agua destilada estéril
- Tween 20

6.1.2. Medios para la germinación de semillas y subcultivo de plantas de tomate de árbol

- Medio MS (Murashige y Skoog, 1962) 30gL⁻¹ de sacarosa, 7 g L⁻¹ de agar y pH 5,8.

6.2. Cepas Bacterianas utilizadas para la transformación.

- Cepa *Agrobacterium tumefaciens* LB004
- Cepa *Agrobacterium tumefaciens* LB004/pBI121 (el plásmido contiene el gen GUS (β -glucoronidasa) y NPTII (noemycinfosfotransferasa).

6.2.1. Medios de cultivo para las cepas de *Agrobacterium tumefaciens*

- Medio LB Invitrogen
- Estreptomicina (100 mgL⁻¹)
- Kanamicina (100 mgL⁻¹)
- Rifampicina (100 mgL⁻¹)
- Espectrofotómetro Pharmacia Biotech *Ultraespec 2000*
- Celdas de cuarzo

- Incubadora Labline *Imperial II*

6.3. Transformación Genética de Explantes de Tomate De Árbol

- Cepas de *Agrobacterium* con pBI121
- Benzil amino purina - BAP (4 ppm)
- Medio MS (Medio Murashige y Skoog, 1962) 30gL⁻¹ de sacarosa, 7 g L⁻¹ de agar y pH 5,8.
- Ácido naftalenoacético - NAA (0.05 ppm)
- Cefotaxime (300 mgL⁻¹)
- Kanamicina (100 mgL⁻¹)
- Extracto de papa (10 µL/mL de medio de cultivo)

6.4. Extracción de ADN de Plantas de Tomate de Árbol.

- CTAB 2X
- B-mercaptoetanol (10 µL/mL de CTAB)
- Cloroformo/alcohol isoamílico 25:1
- Isopropanol
- Etanol al 76%
- Tris EDTA estéril
- Tubos Eppendorf

6.5 Cuantificación de ADN

- Espectrofotómetro Pharmacia Biotech *Ultraespec 2000*
- Celda de cuarzo
- Agua destilada

6.5. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

- dNTP's 20 mM

- Buffer 10 X para PCR
- Taq polimerasa 1 U
- Agua DNAsa/RNAsa free
- Primer β -glucoronidasa (GUS)
 - Secuencia 5'-3': CCC GCT TCG AAA CCA ATG CC
 - Secuencia 3'-5': ACG TCC TGT AGA AAC CCC AA
- Primer neomicina - fosfotransferasa (NPTII)
 - Secuencia 5'-3': CCG ACC TGT CCG GTG CCC
 - Secuencia 3'-5': CCG CCA CAC CCA GCC GGC C
- Termociclador Biometra Biometra *T Personal*
- Centrifuga Eppendorf *5415D*

6.6. Electroforésis en Gel de Agarosa.

- Tris-borato EDTA (TBE) 1X
- Agarosa 1%
- Bromuro de Etidio (EtBr) (0.025 μ L de EtBr/mL de gel de agarosa)
- Cámara Digital Kodak *DC 290 Zoom*
- Transiluminador Vilber Lourmat *TFX 35 M*
- Cámara de Electroforesis Horizontal EC Apparatus Cooperation *Maxicell EC-360M*
- Software Kodak 1D
- Fuente de Poder EC- Apparatus Cooperation *EC20607 Series 90*

7. Metodología

7.1. Cultivo in vitro de tomate de árbol

7.1.1. Obtención de semillas de tomate de árbol

Se tomaron 4 frutos de tomate de árbol maduros obtenidos del mercado quiteño. Se cortaron los frutos y se extrajeron las semillas. Estas semillas se lavaron en agua potable durante 15 minutos y se dejaron secar en toallas de papel absorbente durante 48 horas.

7.1.2. Esterilización de semillas de tomate de árbol

Las semillas secas de tomate de árbol se colocaron en un vaso de precipitación de 500 mL que contenía alcohol al 70% por 5 minutos. Después de este periodo, se descartó la solución de alcohol y se lavaron las semillas con agua destilada estéril. En el mismo vaso se colocó una solución de hipoclorito de sodio al 2,5% y se añadió 4 gotas de Tween 20, las semillas permanecieron en esta solución durante 20 minutos con agitación periódica. Posteriormente, las semillas fueron lavadas 4 veces con agua destilada estéril hasta eliminar completamente la solución de hipoclorito y tween. Finalmente, las semillas fueron colocadas en toallas de papel absorbente previamente esterilizadas para eliminar el exceso de agua.

7.1.3. Germinación de semillas de tomate de árbol

Se utilizó medio MS (Murashige & Skoog 1962) con 30 gL⁻¹ de sacarosa, 7 g L⁻¹ de agar y pH 5,8. Este fue repartido en frascos de vidrio estériles. En estos frascos se colocó de 10-12 y se esperó hasta que germinen.

7.1.4. Cultivo in vitro de plantas madre de tomate de árbol para extracción de explantes de hoja.

Una vez germinadas las semillas, las plántulas obtenidas fueron subcultivadas a medio MS⁻¹ de sacarosa, 7 g L⁻¹ de agar y pH 5,8. Las plantas se llevaron al cuarto de

cultivo con un fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad donde fueron dejadas de 4-6 semanas para posteriormente aislar explantes de hoja para el proceso de transformación.

7.2. Cultivo de cepas de *Agrobacterium tumefaciens*

De manera general, para todos los experimentos realizados, se cultivaron dos cepas de *A. tumefaciens*. La cepa LB 004 y la LB004/pBI121. Ambas cepas fueron donadas por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Castelar-Argentina.

La cepa LB 004 tiene en su genoma genes de resistencia a estreptomicina y a rifampicina razón por la cual el cultivo de la misma se realizó en medio LB con rifampicina (100mgL^{-1}) y estreptomicina (100mgL^{-1}). Por otro lado la cepa LB004/pBI121 posee, adicionalmente, el plásmido pBI121 (ver Figura 1). Este plásmido posee un gen de resistencia a kanamicina. Por esta razón, la cepa LB004/pBI121 fue cultivada con rifampicina (100mgL^{-1}), estreptomicina (100mgL^{-1}) y además con kanamicina (100mgL^{-1}). Las cepas de *A. tumefaciens* LB004 y *A. tumefaciens* LB004/pBI121 fueron sacadas del nitrógeno líquido, y se realizó un cultivo denso de las mismas en cajas petri con medio LB sólido como lo muestra la Tabla 1 y se dejaron toda la noche en la incubadora a 28°C .

La cepa LB 004 fue cultivada en medio LB con rifampicina, estreptomicina y kanamicina como control de crecimiento de las cepas de *Agrobacterium*.

7.2.1. Experimento 1.

A las cajas que presentaron crecimiento de *A. tumefaciens* se les añadió 5 mL de TE estéril para la resuspensión de las cepas bacterianas y esta suspensión fue utilizada para la inoculación de explantes de hoja de tomate de árbol. Para esto se seleccionaron hojas de tomate de árbol provenientes de plantas de tomate de árbol de 4-6 semanas de edad en cultivo in vitro y se los cortó en pedazos de 5 x 5 mm. Se aisló un total de 60 explantes. Estos explantes se dividieron en 3 grupos de 20 explantes como se muestra en la Tabla 2.

El primer grupo de 20 explantes se colocó directamente en cajas petri de plástico que contenían medio MS⁻¹ de sacarosa, 7 g L⁻¹ de agar y pH 5.8, más 0,05 ppm de NAA y 4 ppm de BAP. Estos explantes fueron utilizados como control de regeneración de los explantes de hoja de tomate de árbol no transformados.

El segundo grupo de 20 explantes tampoco fue inoculado con *A. tumefaciens* y se colocó en cajas petri con medio MS más 0,05 ppm de NAA; 4 ppm de BAP y 100 mgL⁻¹ de kanamicina. Este grupo de explantes se utilizó para determinar la concentración eficiente de kanamicina con la cual se consigue inhibir el crecimiento de explantes no transformados.

Finalmente, el tercer grupo de 20 explantes fue inoculado con la suspensión de células bacterianas. Para realizar la inoculación, los 20 explantes de hoja de tomate de árbol se colocaron en 10 mL de MS líquido y se añadió 1 mL de la suspensión de las cepas de *A. tumefaciens* en TE. Esta suspensión se mantuvo durante 30 minutos en la oscuridad. Pasado este tiempo los explantes se colocaron sobre tiras de papel secante estéril de tal forma de eliminar el exceso de bacterias. Posteriormente, se realizó un co-cultivo de los explantes con la bacteria en cajas petri plásticas que contenían medio MS sólido con NAA (0.05 ppm) y BAP (4 ppm) por 48 horas. Pasadas las 48 horas del co-cultivo, se colocaron los explantes en cajas petri de plástico que contenían medio MS con las concentraciones de hormonas antes mencionadas y se añadió cefotaxime 300 mgL⁻¹ y kanamicina 100 mgL⁻¹. El antibiótico cefotaxime fue utilizado en este tratamiento para eliminar del cultivo a *A. tumefaciens*.

Los tres tratamientos de este experimento fueron sometidos a un fotoperiodo 16 horas luz/8 horas oscuridad para la regeneración de los explantes después del co-cultivo.

7.2.2. Experimento 2

Debido a que se han reportado los beneficios del uso de acetosiringona en los procesos de transformación mediada por *A. tumefaciens* (Hooykaas & Schilperoort, 1992; Atkinson y Gardner, 1993), se intentó suplir a los medios de cultivo de la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* y a los medios de cultivo del tejido vegetal con este compuesto. Para esto se machacaron 2 gramos de hojas de planta de papa previamente esterilizadas con alcohol al 70% e hipoclorito de sodio al 2,5 %, y se diluyó con 2.5 mL de agua destilada estéril.

Para el tratamiento de explantes de hoja de tomate de árbol se siguieron nuevamente los pasos que se realizaron en el Experimento 1 que se detalla en la sección 7.2.1, es decir se trató un total de 60 explantes divididos en 3 grupo de 20 explantes de hoja para cada tratamiento.

El primer grupo de 20 se colocó en cajas petri de plástico que contenían MS con NAA (0.05 ppm) y BAP (4 ppm), pero adicionalmente se añadió 10 µL de extracto de papa por cada mL de medio de cultivo. Este grupo sirvió como control de regeneración de explantes no transformados y para observar la influencia que el extracto de papa tenía en la regeneración de explantes.

El segundo grupo de 20 explantes se trató de igual manera que en el Experimento 1 para determinar la concentración eficiente para inhibir el desarrollo de explantes no transformados.

Para la transformación, es decir el tercer grupo de explantes, el cultivo inicial de bacterias se realizó de la misma forma en que se detalla en el punto 7.2 de esta sección pero se añadió 10 µL de extracto de papa al medio de cultivo de la cepa *A. tumefaciens* LB004/pBI121. La inoculación de los explantes con la suspensión bacteriana se realizó como se describe en el punto 7.2. Los explantes secados en papel filtro fueron pasados a

medio de co-cultivo que contenían medio MS con NAA (0.05 ppm) y BAP (4 ppm) y 10 μL de extracto de papa por cada mL de medio de cultivo. Pasadas las 48 de co-cultivo, los explantes fueron pasados al medio MS con NAA (0,05 ppm), BAP (4 ppm), kanamicina (100 mgL^{-1}) y cefotaxime (300 mgL^{-1}) como se puede observar en la Tabla 3.

7.2.3. Experimento 3

En este experimento se añadió dos nuevas variables. La primera es la importancia de la fase de crecimiento bacteriano al momento de realizar la transformación (Atkinson y Gardner, 1993) y la segunda es la importancia de causar heridas múltiples al tejido para aumentar la probabilidad de infección y consecuentemente de transformación (Norelli, 1996).

En este experimento se trabajó con un total de 80 explantes de tomate de árbol que se dividieron en grupos como se muestra en la Tabla 4. El primer grupo de 10 explantes se colocó en medio MS con NAA (0.05 ppm) y BAP (4 ppm), como control de regeneración para los explantes no transformados.

El segundo grupo de 20 explantes se utilizó para determinar la concentración eficiente de kanamicina para impedir el desarrollo de los explantes no transformados, para lo cual fueron colocados en medio MS NAA (0.05 ppm) y BAP (4 ppm) y kanamicina 100 mgL^{-1} .

Los últimos 50 explantes de hoja de tomate de árbol fueron inoculados con la *A. tumefaciens*. El cultivo inicial de las cepas de *Agrobacterium* para la transformación se llevó a cabo como se muestra en el punto 7.2 de esta sección. Las células bacterianas que crecieron en los medios sólidos durante la noche fueron resuspendidas en 5 mL de TE estéril. De esta suspensión de células bacterianas se tomó una alícuota de 100 μL y se las colocó en tubos de ensayo que contenían 10 mL de LB líquido con kanamicina (100 mgL^{-1}), rifampicina (100 mgL^{-1}) y estreptomycin (100 mgL^{-1}). Estos medios líquidos, que contenían la

bacteria, fueron incubados por 4 horas en baño maría con agitación (200 rpm) a 28°C. La suspensiones bacterianas obtenidas después de la incubación se centrifugaron a 7000 rpm durante 5 minutos. Las células precipitadas en el fondo de los tubos fueron resuspendidas en 10 mL de medio MS líquido.

La fuente de explantes fueron plantas de tomate de árbol germinadas in vitro, de 4-6 semanas de edad aproximadamente. Se tomaron únicamente hojas, las cuales fueron cortadas en pedazos de 5 x 5 mm. Además de estos cortes, se causaron heridas múltiples en el centro del explante con ayuda del bisturí. Las hojas fueron llevadas al medio MS con *A. tumefaciens* por tres minutos, luego fueron lavadas con agua estéril y secadas en tiras de papel secante estéril (Atkinson y Gardner, 1993).

Los explantes secos se dividieron en dos grupos de 25 cada uno. Esta división se realizó para evaluar la diferencia que marca el uso del agente selectivo durante la regeneración de los explantes. Pasadas las 48 horas del co-cultivo, solo 25 de los 50 explantes inoculados con *A. tumefaciens* pasaron a los medios que contenía MS, BAP (4 ppm), NAA (0.05 ppm) y kanamicina (100mgL^{-1}). Los otros 25 se colocaron en medio MS con las concentraciones hormonales antes mencionadas como se muestra en la Tabla 4 pero sin el antibiótico. Los subcultivos de callo se realizaron cada 14 días conservando la composición de los medios.

Finalmente, las plantas regeneradas en ambos tratamientos se pasaron a medios MS sólidos con kanamicina (100 mgL^{-1}) para seleccionar aquellas potencialmente transformadas. Todas las plantas que sobrevivieron en medio MS con kanamicina por más de 15 días se llevaron a medios MS sin el kanamicina para promover el enraizamiento de las mismas.

7.2.3.1. Nomenclatura de callos y plantas obtenidas.-

Cada callo generado, independientemente de la caja en la que se generó, fue identificado con un número. Los números hasta el 9 son de aquellos callos regenerados sin presencia de kanamicina. Los números superiores al 9 representan los callos regenerados en presencia del agente selectivo. Para diferenciar plantas provenientes del mismo callo, después del número de identificación del mismo, se colocó un punto y se añadió un número del 1 al 9.

7.3. Extracción de ADN de plantas de tomate de árbol potencialmente transformadas

De las 16 plantas obtenidas después de la selección en medio MS con kanamicina en el Experimento 3, se realizó la extracción de ADN utilizando el protocolo Shagai-Maroo, et al (1984). Este protocolo se llevó a cabo con algunas modificaciones que se detallan a continuación:

Se tomaron hojas jóvenes, de dos semanas aproximadamente, provenientes del cultivo in vitro de las 16 plantas potencialmente transformadas obtenidas del Experimento 3. Estas hojas se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se preparó una solución de CTAB 2X con $10\text{ }\mu\text{L}$ β -mercaptoetanol por cada mL de CTAB. En la campana de gases, se tomó pedazos de hoja de aproximadamente 2.25 cm^2 y se los colocó en un mortero junto con $800\text{ }\mu\text{L}$ de la solución CTAB/ β -mercaptoetanol. Las hojas fueron trituradas hasta dejar un líquido verde sin presencia de restos sólidos, este producto fue llevado a un tubo eppendorf identificado previamente con el número de la planta correspondiente. Todos los tubos fueron trasladados al baño de arena a $62\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante una hora y eran agitados cada 15 minutos. Después del baño, se agregó $500\text{ }\mu\text{L}$ de una solución cloroformo/octanol 25:1 y se agitó vigorosamente los tubos para posteriormente dejarlos reposar durante 20 minutos.

Concluido este paso, los tubos fueron llevados a centrifugación durante 20 minutos a 13.000 rpm. Con ayuda de una pipeta se extrajo el sobrenadante y se lo llevó a un tubo nuevo, conservando la identificación de cada uno. Al líquido de los nuevos tubos se le agregó 1 volumen de isopropanol y se agitó los tubos hasta ver los hilos de ADN. Estos hilos fueron retirados con ayuda de una micropipeta y se los trasladó a un nuevo tubo donde se les agregó 800 μL de etanol 70 %. Los tubos con el etanol fueron agitados hasta remover el pellet de ADN de las paredes. Se eliminó el etanol de los tubos. Finalmente se resuspendió los pellets en 70 μL de TE estéril.

7.4. Cuantificación y dilución de ADN de las 16 plantas potencialmente transformadas.

Todo el ADN extraído de las 16 plantas obtenidas en el Experimento 3 fue cuantificado utilizando el espectrofotómetro Pharmacia Biotech *Ultraespec 2000*. Para realizar la cuantificación se colocó 3 mL de agua destilada en la cubeta de cuarzo para marcar el blanco y luego se añadió 5 μL del ADN de planta. Una vez obtenido el valor de la absorbancia, la concentración de ADN se determinó utilizando la fórmula:

$$A \times \frac{1}{FD} \times 50 \text{ ng} / \mu\text{L} = [\text{ADN}]$$

Donde FD es el factor de dilución.

A partir de las concentraciones obtenidas se realizaron diluciones para ADN en una concentración final de 20 $\text{ng}/\mu\text{L}$ para posteriormente, como se observa en la Tabla 5

7.5. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Se tomaron las 16 muestras de ADN de tomate de árbol obtenidas del Experimento 3 y se realizó el PCR para el gen GUS y para el gen NPTII del plásmido pBI121. Las secuencias de los “primers” Invitrogen utilizadas se pueden observar en la Tabla 6. Para la reacción de PCR se usaron las concentraciones de reactivos indicadas en la Tabla 7. Las cantidades mostradas en la Tabla 7 son para una reacción, por lo tanto se multiplicó estas cantidades tomando en cuenta el número total de plantas, la mezcla se hizo en un tubo de 1.5 mL y se tomó 8 µl de esta mezcla para llevar a un tubo eppendorf de 0.2 mL. A estos tubos se les agregó 2 µL de las diluciones de ADN de tomate de árbol de cada una de las plantas obtenidas en el Experimento 3. Para fines de comprobación también se realizó PCR del control positivo que era el plásmido pBI121 puro y el control negativo que era ADN extraído de una planta no transformada.

El ciclo utilizado para la amplificación en el termociclador es parecido al usado por Atkinson y Gardner (1993) pero debido a la diferencia con la especificidad de los primers se cambió de la siguiente manera:

1. 94 °C 3 min
2. 94 °C 1 min
3. 65 °C 1 min
4. 72 °C 2 min
5. Regresar al paso 2 y realizar 10 ciclos con una disminución de 1 °C por ciclo
6. 94 °C 30 seg
7. 55 °C 30 seg
8. 72 °C 2 min
9. Relizar 22 ciclos desde el paso 6

7.6. Electroforesis en gel de agarosa.

Los resultados de PCR para GUS y para NPTII se analizaron en geles de agarosa diferentes. Para cada uno se preparó 70 mL de un gel 1 % de agarosa en TBE 1X. Se derritió esta mezcla al microondas y cuando estaba suficientemente frío pero sin solidificar, se añadió 5 μ L de Bromuro de Etidio por cada 100 mL de gel. Se colocó el gel en la base de la cámara de electroforesis horizontal para dejar solidificar junto con los peines que forman los pocillos. A los productos de PCR se les agregó 3 μ l de buffer de carga y se los colocó en los pocillos respectivos empezando por el control positivo, las muestras en orden ascendente y el control negativo. El gel se corrió a 80 voltios durante dos horas. Una vez finalizado el proceso se tomó la foto del gel con ayuda del transiluminador UV Vilber Lourmat *TFX 35 M* y la cámara digital Kodak *DC 290 Zoom*.

8. Resultados

8.1. Experimento 1

En este experimento se observó la formación de callo y regeneración de plantas a partir de los explantes en el control de regeneración de explantes no transformados, como lo muestra la Tabla 8. En esta Tabla se puede ver que de estos explantes, utilizados como control para regeneración del material no transformado, se obtuvo un total de 21 plantas con tallos largos, hojas anchas y verdes.

Por otro lado, en los explantes no transformados que fueron colocados en medio MS con BAP (4 ppm), NAA (0.05 ppm) y kanamicina (100 mgL^{-1}) se observó necrosis y consecuentemente muerte del tejido.

El último grupo de 20 explantes de hoja de tomate de árbol, de este experimento, que fueron inoculados con *A. tumefaciens* presentaron también necrosis y muerte del tejido vegetal.

8.2. Experimento 2

En este experimento, los explantes no inoculados con *A. tumefaciens* y cultivados en medio MS con BAP (4 ppm), NAA (0.05 ppm) y kanamicina (100 mgL⁻¹) fueron utilizados para determinar la concentración eficiente de agente selectivo kanamicina que inhibe el crecimiento de los explantes no transformados. Estos explantes, consecuentemente, presentaron necrosis del tejido de la misma manera que lo hicieron los explantes del Experimento 1.

En lo que se refiere al control de regeneración, es decir los explantes no transformados que se colocaron en medio MS con BAP (4 ppm), NAA (0.05 ppm), kanamicina (100 mgL⁻¹) y 10 µL de extracto de papa/ mL de medio de cultivo, sí presentaron formación de callo. De los 20 explantes utilizados en este grupo, 12 presentaron formación de callo a la segunda semana de haber sido cultivados como muestra la Tabla 9. De los 12 callos obtenidos, 9 regeneraron únicamente raíces.

Finalmente, de los 20 explantes que fueron inoculados con *A. tumefaciens* se obtuvo un total de 8 callos se desarrollaron a partir de la tercera semana de cultivo en medio MS con BAP (4 ppm), NAA (0.05 ppm), kanamicina (100 mgL⁻¹) y 10 µL de extracto de papa/ mL. A partir de la quinta semana se observó la regeneración de 5 raíces provenientes de estos callos.

8.3. Experimento 3

Como lo muestra la Tabla 10, en el Experimento 3, de los 10 explantes utilizados como control de regeneración para explantes no transformados, 9 presentaron formación de callo y se obtuvo un total de 21 retoños.

También se puede observar en esta Tabla que los 20 explantes que no fueron inoculados *A. tumefaciens*, es decir, aquellos no transformados, presentaron necrosis y muerte del tejido cuando se cultivaron en medio MS con kanamicina (100 mgL^{-1}).

De los 50 explantes que fueron inoculados con *A. tumefaciens*, en este experimento, solo 17 presentaron formación de callo, de los cuales regeneraron un total de 24 retoños. Sin embargo, estos retoños provienen de dos tratamientos diferentes. Los explantes que regeneraron en medio MS con BAP (4 ppm), NAA (0.05 ppm) y kanamicina (100 mgL^{-1}) formaron menor número de callos y consecuentemente regeneraron menos retoños que aquellos explantes que no tuvieron contacto con el agente selectivo durante su regeneración.

Del medio con BAP (4 ppm), NAA (0.05 ppm) y kanamicina (100 mgL^{-1}) se obtuvieron 8 plantas mientras que del medio sin el agente selectivo se obtuvieron 16, es decir, un total de 24 plantas. La Tabla 11 muestra las 24 plantas regeneradas a partir de los callos obtenidos en este experimento, con su respectiva identificación. Las 24 plantas obtenidas fueron cultivadas en medio MS con kanamicina (100 mgL^{-1}) para seleccionar aquellas resistentes al antibiótico.

De las 8 plantas que provenientes de callos regenerados en medio MS MS con BAP (4 ppm), NAA (0,05 ppm) y kanamicina (100 mgL^{-1}), únicamente 3 sobrevivieron al subcultivo en medio MS con kanamicina. Por otro lado, de las 16 plantas que regeneraron en ausencia de kanamicina únicamente 13 sobrevivieron al proceso de selección en medio MS con kanamicina (100 mgL^{-1}).

Como se puede observar en la Tabla 12, el porcentaje de supervivencia de las plantas que regeneraron en ausencia del agente selectivo es del 81,3 % mientras que solo el 62,5% de las plantas que regeneraron en presencia de kanamicina lograron sobrevivir.

8.4. Cuantificación y dilución de ADN de plantas

Las absorbancias y concentraciones obtenidas de las muestras de ADN extraídas de las 16 plantas potencialmente transformadas se pueden observar en la Tabla 5. En el proceso de cuantificación se pudo observar que había muestras más concentradas y otras muy poco concentradas. Se puede ver que la concentración de ADN las 16 plantas de las cuales se extrajo ADN varía entre 120 y 600 ng/ μ L.

8.5. Resultados del PCR analizados en geles de agarosa

Del PCR realizado para las 16 plantas de tomate de árbol obtenidas en el Experimento 3, se pudo observar bandas para ambos genes en algunas de las plantas analizadas. Según Atkinson y Gardner (1993) el fragmento esperado para GUS es de 1028 pb aproximadamente mientras que para NPTII se espera un fragmento de 804 pb. Como se puede observar en la Figura 2, la banda para GUS se encuentra más arriba de la banda del marcador de peso molecular que corresponde a la banda de 1000 pb, lo cual significa que la banda amplificada en las muestras 5.1, 10.4 y 11.4 es la correspondiente al gen GUS (1028 bp). Por otro lado, la amplificación para la banda correspondiente al gen NPTII se puede observar en la Figura 3, la misma que muestra que tanto el control positivo como las plantas 5.1, 10.4 y 11.4 presentan la misma banda cerca de los 800 pb del marcador de peso molecular. Adicionalmente se puede observar una banda tenue en el pocillo correspondiente a la planta 11.1

Estas bandas positivas tanto para el gen GUS como para NPTII tienen el peso molecular esperado, cerca de las 1000 pb para GUS y cerca de las 800 pb para NPTII. Con los resultados obtenidos en las pruebas moleculares se puede decir que el porcentaje de transformación logrado es del 18,8 % de las 16 plantas que sobrevivieron a la selección en kanamicina (100 mgL^{-1}). Este porcentaje no toma en cuenta la planta 11.1 ya que ésta resultó positiva únicamente para NPTII en las pruebas moleculares y la banda que presenta es muy tenue como se observa en la Figura 3.

En resumen, de las 50 explantes que fueron inoculados inicialmente con *Agrobacterium tumefaciens*, en este experimento, se obtuvo un total de 24 plantas regeneradas, de las cuales solo 16 sobrevivieron en medios que contenían el agente selectivo kanamicina. De estas 16 únicamente 3 plantas resultaron positivas en las pruebas moleculares para el gen GUS y para NPTII, mientras que también se obtuvo una planta positiva únicamente para el gen NPTII. Se sabe que cada planta provino de un callo diferente, pero las plantas 11.1 y 11.4 provienen del mismo callo. Por esta razón, se puede concluir que solo se obtuvo un 6% de éxito en la transformación de explantes de tomate de árbol, ya que de los 50 explantes inoculados con *A. tumefaciens*, únicamente 3 regeneraron plantas.

9. Discusión

9.1 Experimento 1

Es importante mencionar que el llevar a cabo diferentes experimentos ayudó a analizar algunas variables que son importantes considerar cuando se lleva a cabo experimentos de transformación genética.

Uno de los principales problemas del Experimento 1 fue que el cultivo de *A. tumefaciens* que se utilizó como inóculo para los explantes de hoja de tomate de árbol

permaneció toda la noche en la incubadora. Esto quiere decir que las bacterias tuvieron una alta actividad metabólica y por tanto se encontraban en fase estacionaria de crecimiento al momento de la transformación. Por lo tanto, muchas bacterias estaban deterioradas por la acumulación de metabolitos secundarios o por la falta de nutrientes, por esta razón su competencia pudo estar disminuida al momento de ingresar el tejido vegetal. En este experimento se comprobó que el medio de regeneración utilizado, es decir, MS con BAP (4 ppm) y NAA (0,05 ppm) es óptimo para la regeneración de explantes de hoja de tomate de árbol ya que los explantes control regeneraron retoños eficientemente. También se comprobó que el agente selectivo kanamicina en una concentración de 100 mgL⁻¹ era efectivo para seleccionar explantes no transformadas ya que el tejido vegetal de mismos se necrosó y murió.

9.2 Experimento 2

En el Experimento 2 se pudo comprobar que el uso de extracto de papa, no fue eficiente. Esto se debió principalmente a que el protocolo utilizado para preparar el extracto de papa fue empírico. Las concentraciones del extracto utilizadas en los medios de cultivo de bacterias y de regeneración de explantes fueron inexactas, ya que no se pudo encontrar un protocolo confiable que establezca la forma efectiva de preparar estos extractos y la concentración en que deben ser utilizados. (Mendoza de Gyves, 2001). En este Experimento, se observa también regeneración únicamente de raíces a partir de callos. Esto refleja otro problema que se presenta cuando se usa extractos, como el de papa, ya que además de añadir el factor que se necesita se pueden añadir también otros elementos que pueden influir en la regeneración de los explantes. En este experimento, el extracto de papa, pudo aportar algunos elementos, entre ellos fitohormonas, las cuales pudieron cambiar el balance hormonal dando como resultado alteraciones en los patrones de regeneración previamente establecidos (Dixon & González, 1994). Por esta razón en el

Experimento 3 se eliminó este ingrediente de los medios de cultivo. Se pudo ver que a lo igual que en el Experimento 1, el medio de regeneración, es decir, el medio MS con BAP (4 ppm) y NAA (0,05 ppm) es óptimo. Los brotes que regeneran en medios sin kanamicina aparecen entre 1-2 semanas antes que aquellos brotes que regeneran en medios con kanamicina (100 mgL^{-1}). Esto pudo deberse principalmente a que los antibióticos pueden afectar el metabolismo de las células vegetales y consecuentemente retrasan los procesos de crecimiento, proliferación y dediferenciación celular (Mendoza de Gyves, 2001)

9.3 Experimento 3

Finalmente, en el Experimento 3 sí se logró obtener plantas transgénicas como se ve en las Figura 2 y 3. Primero hay que destacar que el usar bacterias en fase logarítmica optimiza el porcentaje de transformación ya que éstas se encuentran jóvenes y competentes (Hooykaas & Schilperoort, 1992). También es importante mencionar que el causar más heridas a los explantes de hojas de tomate de árbol, aumenta la concentración de compuestos fenólicos y por tanto las bacterias son atraídas más exitosamente al tejido vegetal, aumentando así la probabilidad de transformación (Atkinson et al, 1994, Norelli, 1996).

Como se explicó en la metodología algunas de los explantes transformados regeneraron en presencia de kanamicina (100 mgL^{-1}) y otros no. Hay que recalcar que, a pesar de que se usaron igual número de explantes en ambos tratamientos, los explantes regenerados en medios de cultivo sin presencia del agente selectivo kanamicina produjeron más callos y regeneraron un mayor número retoños. En el medio de regeneración que tenía kanamicina (100 mgL^{-1}) hubo una mayor tasa de mortalidad, y por lo tanto se obtuvieron únicamente 8 plantas regeneradas. Pero de estas 8 planta, únicamente 3 sobrevivieron al subcultivo en medio MS con 100 mgL^{-1} de kanamicina, es decir, el 62,5 %, mientras que de los 16 retoños que regeneraron en ausencia de kanamicina se obtuvo un 81,3% de

supervivencia en subcultivo posterior en medio MS con kanamicina, como se muestra en la Tabla 12.

Como se observa en las Figuras 2 y 3 respectivamente, existen tres plantas transgénicas para GUS y cuatro para NPTII. De estas 4 plantas 3 provienen de retoños que regeneraron en medios con una concentración de kanamicina de 100 mgL^{-1} . Por lo tanto, se puede concluir que la presencia del agente selectivo reduce el porcentaje de retoños obtenidos a partir de los explantes inoculados, pero asegura la selección de retoños potencialmente transformados.

De los explantes potencialmente transformados por la bacteria y que regeneraron sin agente selectivo, se obtuvo un alto número de retoños sin embargo un bajo porcentaje de las plantas obtenidos a partir de estos explantes resultó ser transgénico. Esto destaca la importancia del uso del agente selectivo kanamicina durante la regeneración y el crecimiento de plantas obtenidas a partir de explantes transformados.

De las 16 plantas obtenidas potencialmente transformadas que se analizaron molecularmente, solo se comprobó la inserción del gen de resistencia a kanamicina en 4 de éstas. Sin embargo las 16 crecieron y se desarrollaron en medio MS con kanamicina (100 mgL^{-1}) en la etapa de selección. Teóricamente las plantas que no tenían el gen que codifica para la neomicinfosfotransferasa (NPTII), no debieron crecer en los medios MS que contenían este antibiótico. Este fenómeno puede explicarse de dos maneras, la primera es que la plantas pueden expresar los genes del plásmido por algún tiempo sin integrarlo a su genoma, es decir, el plásmido ingresa y se expresa pero no llega al núcleo y por tanto no se integra al genoma, razón por la cual no se detecta la presencia de genes de plásmido en las pruebas moleculares (Hooykaas & Schilperoort, 1992) o bien porque el tiempo de exposición al antibiótico no fue suficiente para observar la muerte de las plantas no transformadas.

En lo que se refiere a las pruebas moleculares hay varios puntos que analizar. Como se puede ver en la Figura 3, la amplificación para el gen del NPTII deja ver algunas otras bandas que no corresponden a la esperada, lo cual sugiere que la amplificación fue inespecífica. Esto puede deberse a que el “primer” utilizado encuentra homología en otros sitios y por eso se ven otras bandas. Por esta razón se elevó la temperatura de anclaje del primer de 55°C hasta 65°C permitiendo aumentar la especificidad, luego se realizó una disminución sucesiva de esta temperatura para poder amplificar los segmentos específicos y eliminar las bandas inespecíficas. De todas formas a pesar de utilizar este protocolo se observó inespecificidad en bajo grado.

También es importante discutir el hecho de que la planta 11.1 es positiva para NPTII y no para GUS, esto puede deberse a que el plásmido fue cortado al momento de su ingreso. Stanton (2002) reporta la fragmentación o inserción incompleta de plásmidos en experimentos de transformación genética mediada por *A. tumefaciens*.

Para concluir es necesario analizar que en los experimentos de transformación genética de tomate de árbol realizados por Janssen y Gardner (1989) y por Atkinson y Gardner (1993) existe una diferencia en la frecuencia de transformación entre los explantes que fueron colocados en medios con acetosiringona durante el co-cultivo y aquellos explantes que no. Los explantes co-cultivados en medio con 20 μM acetosiringona presentaron una frecuencia de transformación entre 34% y 35%. Por otro lado, los explantes co-cultivados en ausencia de acetosiringona presentaron una frecuencia de transformación 2% y 9%.

La frecuencia de transformación obtenida en este proyecto es baja, similar a la obtenida para los explantes co-cultivados en ausencia de acetosiringona de los experimentos antes mencionados. Por lo tanto, se puede concluir que el uso de

acetosiringona ayuda a aumentar la tasa de transformación, aunque este efecto no se pudo observar en esta investigación.

En esta investigación se analizaron varios factores y variables que dieron como resultado 3 plantas transgénicas de tomate de árbol y un protocolo preliminar de transformación de explantes de tomate de árbol utilizando *A. tumefaciens*. A pesar de que el porcentaje de transformación es bajo, el protocolo obtenido a partir del Experimento 3 resultó exitoso y puede ser utilizado como base para la optimización de la transformación de tomate de árbol y puede ser ampliado también a otras especies.

10. Conclusiones y Recomendaciones

10.1 Conclusiones

La transformación genética tomate de árbol a partir de explantes de hoja mediada por *A.tumefaciens* es factible. Esto confirma que es posible implementar programas de mejoramiento genético en esta especie, vía inserción de genes foráneos, como se ha hecho en muchas otras solanáceas (Hooykaas & Schilperoort, 1992; Atkinson y Gardner, 1993).

El protocolo de regeneración de plantas a partir de explantes de tomate de árbol previamente desarrollado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito, es eficiente para regenerar plantas sometidas al proceso de transformación mediada por *A.tumefaciens*

Es posible obtener plantas transgénicas de tomate de árbol aún si no se utiliza kanamicina para la selección durante todo el proceso, pero el porcentaje de plantas transgénicas es mayor en aquellas plantas que regeneraron a partir de explantes que estuvieron siempre en contacto con el agente selectivo.

Se debe evitar el uso de extractos de plantas o levaduras en los medios de cultivo, excepto que se ha ajustado previamente la concentración adecuada, ya que la metodología

para la utilización de los mismos es imprecisa y puede alterar los resultados y retrasar el tiempo de experimentación.

Es primordial que las células de *A. tumefaciens* estén en la fase logarítmica de su crecimiento al momento de inocular los explantes, ya que esto asegura que las mismas se encuentren activas para poder ingresar al tejido vegetal y consecuentemente integrar el T-ADN del plásmido al genoma de las células vegetales.

Finalmente, se puede concluir que las heridas causadas en la planta ayudan a aumentar la tasa de transformación de la misma debido a que se aumenta la producción de compuestos fenólicos que atraen a la bacteria a la planta y activan los genes vir (Norelli, 1996).

10.2 Recomendaciones

Es importante hacer pruebas para observar la expresión de los genes introducidos en las plantas de tomate de árbol transformadas. Esto ayudaría a comprobar que además de la integración de los mismos, éstos están en capacidad de expresarse en el tejido vegetal. Pruebas como la reacción del x-gluc. En esta reacción el tejido vegetal de la planta transgénica se tiñe de azul por la reacción entre la β glucuronidasa, resultado de la expresión del gen GUS, y el sustrato del x-gluc. La regeneración en medio con kanamicina puede ayudar a evaluar la expresión del gen NPTII. La reacción de x-gluc no pudo llevarse a cabo debido al costo de los reactivos.

Adicionalmente, sería interesante realizar un análisis de herencia del gen para ver si este se hereda establemente a las siguientes generaciones y confirmar así una transformación integrativa (Potrykus, 1991).

Es importante lograr un protocolo más eficiente para la transformación de explantes de tomate de árbol. Para esto se puede tener en cuenta variables como edad de la planta en el cultivo in vitro, posición de las hojas en la planta, uso de acetosiringona, entre otros.

También es importante que una vez establecido el protocolo de transformación se pruebe con todas las variedades de tomate de árbol de interés agrícola para establecer si existen diferencias y realizar los respectivos ajustes para adaptar el protocolo de transformación para estas variedades.

Finalmente, sería importante ampliar la investigación a otros cultivos de interés nacional, tanto en especies frutales como ornamentales de tal manera de estar preparados para las exigencias del mercado.

11. Bibliografía

1. Atkinson R., M. Eagles, R. Forster, y R. Gardner R. “Genetic Transformation of *Cyphomandra betaceae* (Tamarillo)”. Biotech Agr Forest 29 (1994).
2. Atkinson R. y R. Gardner. “Regeneration of transgenic tamarillo plants”. Plant Cell Reports., 12 (1993): 21-28
3. Banco Central del Ecuador. Estadísticas Nandina –país. Partida 0819030000. 27 Abr 2005. <<http://www.bce.fin.ec>>.
4. Barghchi, M. “In Vitro regeneration of Tamarillo *Cyphomandra betaceae* (cav.) sendt., Plant Improvement, and Virus elimination” En. MR Davey et al (Eds), Tree Biotechnology: Towards the Millenium. Nottingham Univerity Press. 1997.
5. Bohs, L. “Ethnobotany on the genus *Cyphomandra* (solanaceae)”. Economic Botany, 43(1989): 143-163
6. Bohs, L. “Four New Species of *cyphomandra* (solanaceae) from South America.” Sistematic Botany 13 (1988):265-285.
7. Corporación Colombia Internacional. 2001. Tomate de árbol. Mar 2003. <<http://www.cci.org.co>>.
8. Cubero, M. Tomate de árbol. Mar 2003. <<http://www.sica.gov.ec>>.
9. Delannay X., Bauman D., Beigley M., Buettener H., Coble M., DeFelice C., et al. “Yield Evaluation os a Glyphosate-Tolerant Soybean Line alter Treatment with Glyphosate”. Crop Science, 35 (1995): 1461-1467
10. Dixon R, R. González. Plant Cell Culture: A Practical Approach. Ed. Rickwood & Hames. Oklahoma: Oxford University press, 1994.
11. FAO. Estado Mundial de Agricultura y la Alimentación 2003-2004. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2004.
12. FAO. Glosario de biotecnología para la agricultura y la alimentación. Estudio FAO Investigación y Tecnología. 2004
13. Hooykaas P, R Schikperrot. “Ageobacterium and plant genetic engineering”. Plant Molecular Biology 19 (1992): 15-38.
14. Heiser C, G. Anderson. Perspectives on new crops and new issues. Ed. J. Janick. Indiana: ASHS press, 1999.
15. Meadows L. Growing Tamarillo Relatives in the New Zeland Home Garden. Enero 2002. 24 Julio 2005. <http://www.naturalhub.com/grow_fruit_type_tamarillo_relative_new_zealand.htm>

16. Mendoza de Gyves. Agrobiotecnología. México D.F: Grupo Editorial Iberoamérica, 2001
17. Ministerio de Agricultura. Tomate de árbol/Tamarillo/Tree tomato/Sweet tomato. Enero 2000. 14 marzo 2003. <<http://www.mag.gov.ec> >
18. Morton, J. “The tree tomato or “tamarillo”, a fast-growing, early fruiting small tree for subtropical climates. proc. fl state”. HortScience 95 (1982):81-85.
19. Murashige, T y F. Skoog. “A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures”. Physiol. Plant 15 (1962): 473-497.
20. Norelli J, J Mills, H Aldwinckle. “Leaf Wounding Increases Efficiency of Agrobacterium-mediated Transformation of Apple”. Hort Science 31(1996): 1026-1027.
21. Pazmiño C. Resistencia de ocho entradas de tomate de árbol silvestre a Meloidogyne sp. Tesis para título de Ingeniero en Ciencias Agrícolas, Universidad Central del Ecuador (1992).
22. Potrycus, I, “Gene Transfer To Plants: Assessment of Published Approaches and Results Annu. Rev.” Plant Physiology. 42 (1991): 205-225
23. Prohens J, J. Ruiz y F.Nuez “Advancing the Tamarillo Harvest by Induced Postharvest Ripening”. HortScience 31 (1996): 109-111.
24. Secretaría del Convenio sobre Diversidad Biológica, 1992. Convenio de la Diversidad Biológica. 2003. 10 Jul 2004. <<http://www.biodiv.org/doc/legal/cbd.es.pdf>>.
25. SICA. Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador, Servicio de Información Agropecuaria. 9 Mar 2004. <<http://www.sica.gov.ec/agronegocios> >.
26. SICA. Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador, Servicio de Información Agropecuaria. Tomate de árbol. 22 abril 2005.<<http://www.sica.gov.ec/agronegocios>>
27. Siemens J, O. Schieder. “Transgenic plants: transformation – recent developments and the state of the art”. Plant Tissue Culture and Biotechnology 2 (1996): 66-75.
28. Soria, N. Tecnología del cultivo de tomate de árbol.2000. Mar 2002. <<http://www.mag.gov.ec> >.
29. Songbiao, Chen et al. “Green fluorescent protein as a vital elimination marker to easily screen marker-free transgenic progeny derived from plants co-transformed with a double T-DNA binary vector system.” Plant Cell Report 23 (2005): 625-631.
30. Stanton B. “*Agrobacterium* and Plant genes involved in, T-DNA transfer and integration.” Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol 51 (2000): 223-256.

12. Anexos

12.1. Figuras

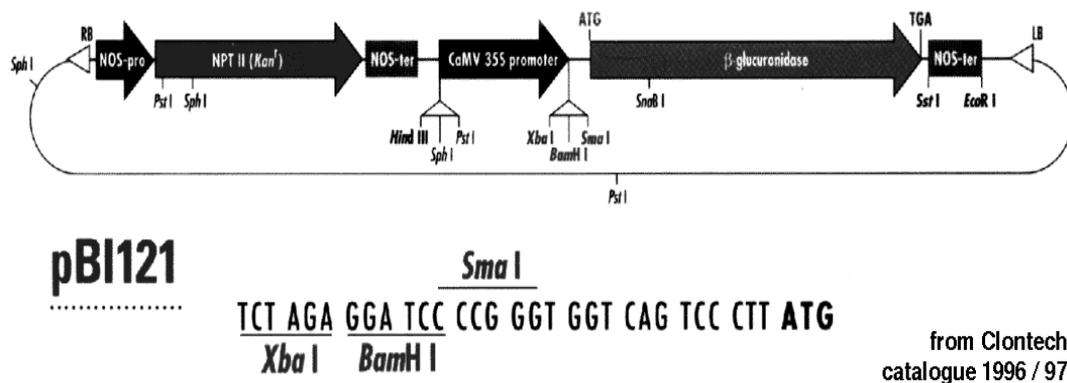


Figura 1. Mapa genético del plásmido pBI121.

En esta figura se puede observar el gen NPTII y el gen GUS con sus respectivos promotores y terminadores, así como los sitios de restricción del plásmido.

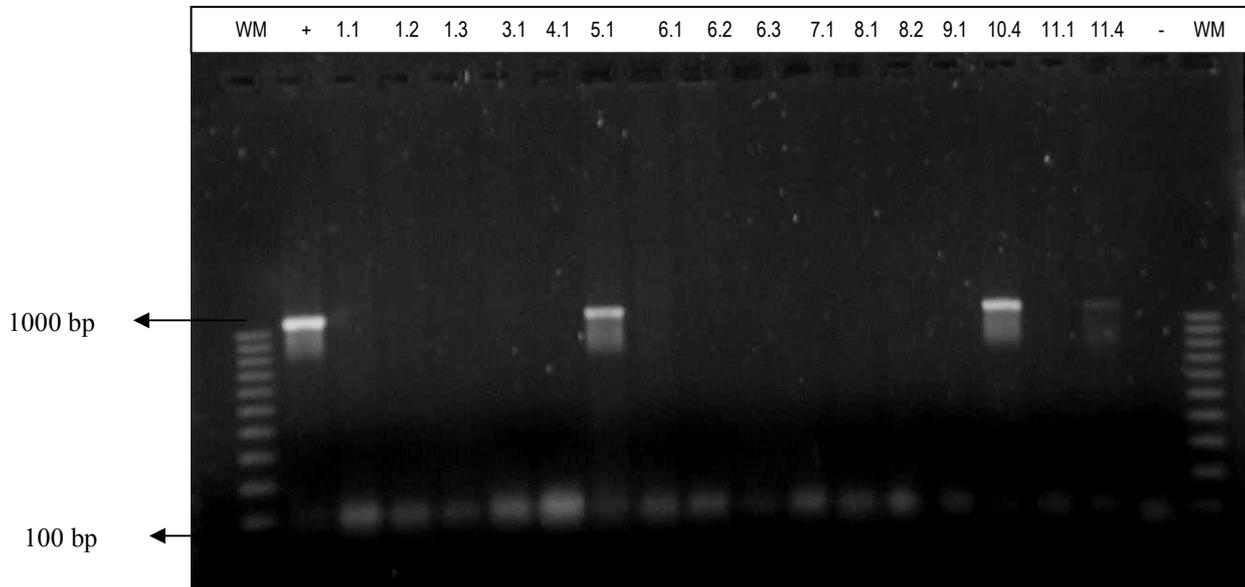


Figura 2. Resultados de la PCR para el gen GUS (plantas del Experimento 3).

En esta figura se observa claramente que el control positivo (plásmido pBI121) presenta una banda que se encuentra un poco más arriba de la última banda del marcador de peso molecular (WM). Esta banda corresponde a la amplificación de un segmento de 1028 pb del gen GUS. Adicionalmente se observa que las plantas 5.1; 10.4, 11.4 presentan esta misma banda correspondiente al gen GUS. Por lo que se asumen que estas tres plantas son positivas, es decir, que han integrado el gen GUS a su genoma.

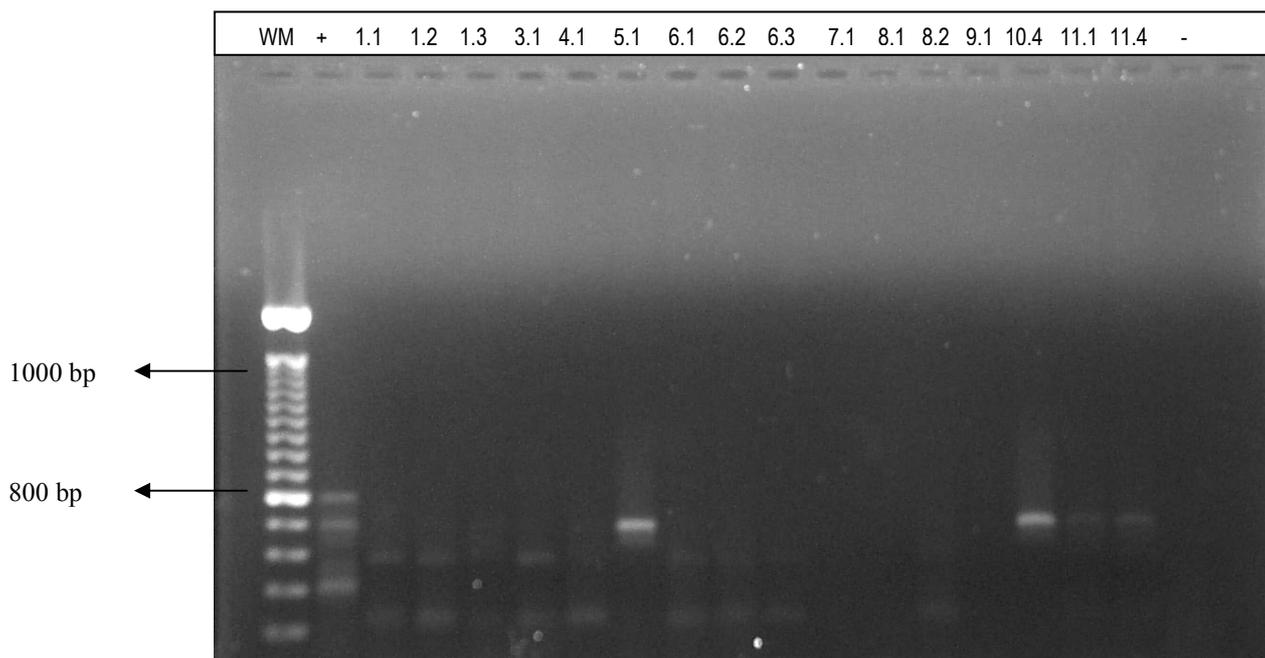


Figura 3. Resultados de la PCR para el gen NPTII (plantas del Experimento 3).

Como se puede observar en esta figura las mismas 3 plantas que fueron positivas para el gen GUS (5.2; 10.4; 11.4) son positivas para NPTII. Se observa, además, que la planta 11.1 presenta una tenue banda de casi 800 pb igual que las otras plantas positivas para este gen. También se observan bandas inespecíficas que no cumplen el peso de la banda esperada.

12.2. Tablas

Cepa	Medio de Cultivo	Antibiótico	Concentración	Resultado del cultivo
<i>A. tumefaciens</i> LB004	LB sólido	Estreptomicina	(100 mgL ⁻¹)	Crece <i>A. tumefaciens</i> LB004
		Rifampicina	(100 mgL ⁻¹)	
Cepa Control: <i>A. tumefaciens</i> LB004	LB sólido	Estreptomicina	(100 mgL ⁻¹)	Muere <i>A. tumefaciens</i> LB004
		Rifampicina	(100 mgL ⁻¹)	
		Kanamicina	(100 mgL ⁻¹)	
<i>A. tumefaciens</i> LB004/pBI121	LB sólido	Estreptomicina	(100 mgL ⁻¹)	Crece <i>A. tumefaciens</i> LB004/pBI121
		Rifampicina	(100 mgL ⁻¹)	
		Kanamicina	(100 mgL ⁻¹)	

Tabla 1. Medios de cultivo utilizados para el crecimiento de las cepas de *A. tumefaciens*.

Se observa los diferentes medios de cultivo para las cepas de *A. tumefaciens*. Las cepas de *A. tumefaciens* LB 004 crecen en medio LB con 100 mgL⁻¹ de estreptomicina y rifampicina. Esta misma cepa se utiliza como control para comprobar que *A. tumefaciens* LB004 es sensible al antibiótico kanamicina por tanto muere en medio LB que contenga este antibiótico. Finalmente solo la cepa de *A. tumefaciens* que posea el plásmido pBI121 es capaz de crecer en medios de cultivo que contengan el antibiótico kanamicina.

Número de explantes de tomate de árbol	Contenido adicional el medio MS sólido (medio de regeneración)	Nombre del tratamiento
20	NAA (0.05 ppm) BAP (4 ppm)	Control de regeneración de explantes de tomate de árbol no transformados.
20	NAA (0.05 ppm) BAP (4 ppm) Kanamicina (100 mgL ⁻¹)	Explantes control de tomate de árbol no transformados para medir la concentración eficiente de antibiótico*
20	NAA (0.05 ppm) BAP (4 ppm) Kanamicina (100mgL ⁻¹) Cefotaxime (300mgL ⁻¹)	Explantes que fueron inoculados con <i>A. tumefaciens</i> LB004/pBI121

*Concentración eficiente de antibiótico: concentración a la cual se consigue la muerte de los explantes no transformados.

Tabla 2. Medios de cultivo utilizados para los explantes de tomate de árbol en el Experimento 1.

Se observa los elementos que se usan para cada uno de los tratamientos del Experimento 1. El primer grupo de 20 explantes se sembró automáticamente en el medio de regeneración compuesto por sales MS con 0,05 ppm de NAA y 4 ppm de BAP.

El segundo grupo de 20 explantes se colocó en medios de regeneración con la concentración hormonal descrita anteriormente y con 100 mgL⁻¹ de kanamicina para comprobar la sensibilidad de los explantes no transformados al antibiótico

Finalmente, el tercer grupo de 20 explantes, que fue inoculado con la cepa *A. tumefaciens* LB004/pBI121a, se colocó, después del co-cultivo, en medios de regeneración con 100 mgL⁻¹ de kanamicina y 300 mgL⁻¹ de cefotaxime para eliminar el exceso de *A. tumefaciens*.

Número de explantes de tomate de árbol	Contenido adicional el medio MS sólido (medio de regeneración).	Nombre del tratamiento
20	NAA (0.05 ppm) BAP (4 ppm) Extracto de papa 10 µl/mL	Control de regeneración de explantes de tomate de árbol no transformados.
20	NAA (0.05 ppm) BAP (4 ppm) Kanamicina (100mgL ⁻¹)	Explantes control de tomate de árbol no transformados para medir la concentración eficiente de antibiótico*
20	NAA (0.05 ppm) BAP (4 ppm) Kanamicina (100mgL ⁻¹) Cefotaxime (300mgL ⁻¹)	Explantes inoculados con <i>A. tumefaciens</i> LB004/pBI121

*Concentración eficiente de antibiótico: concentración a la cual se consigue la muerte de los explantes no transformados.

Tabla 3. Medios de cultivo utilizados para los explantes de tomate de árbol utilizados en el Experimento 2.

En esta tabla se observar que el grupo control de regeneración de explantes de tomate de árbol no transformados, se colocó en medio MS con las concentraciones hormonales ya establecidas más 10 µl de extracto de para por mL de medio de cultivo El segundo grupo de explantes, utilizado para determinar la concentración eficiente de antibiótico de la misma manera que se explica en la Tabla 2. Finalmente, se puede observar que el grupo de explantes que fue inoculado con *A. tumefaciens* se colocó, después del co-cultivo, en medio MS de regeneración con BAP (4 ppm) y NAA (0.05 ppm) el agente selectivo kanamicina y cefotaxime.

Número de explantes de tomate de árbol	Contenido adicional el medio MS sólido (medio de regeneración)	Nombre del tratamiento
10	NAA (0.05 ppm) BAP (4 ppm)	Control de regeneración de explantes de tomate de árbol no transformados.
20	NAA (0.05 ppm) BAP (4 ppm) Kanamicina (100mgL ⁻¹)	Explantes control de tomate de árbol no transformados para medir la concentración eficiente de antibiótico*
25	NAA (0.05 ppm) BAP (4 ppm) Cefotaxime (300mgL ⁻¹)	Explantes inoculados con <i>A. tumefaciens</i> LB004/pBI121**
25	NAA (0.05 ppm) BAP (4 ppm) Kanamicina (100mgL ⁻¹) Cefotaxime (300mgL ⁻¹)	Explantes inoculados con <i>A. tumefaciens</i> LB004/pBI121***

*Concentración eficiente de antibiótico: concentración a la cual se consigue la muerte de los explantes no transformados.

** Colocados en medio MS sin kanamicina después del co-cultivo

*** Colocados en medio MS con kanamicina después del co-cultivo

Tabla 4. Medios de cultivo utilizados para los explantes de tomate de árbol utilizados en el Experimento 3.

Se observa la composición del medio MS utilizado para el primer grupo de 10 explantes del control de regeneración. El segundo grupo de 20 explante fue cultivado en medio con agente selectivo para determinar la concentración eficiente de antibiótico para inhibir el desarrollo de tejido vegetal no transformado. Finalmente, se muestra que el grupo de explantes que fueron inoculados con *A. tumefaciens* fue dividido en 2 grupos. El primer grupo de 25 explantes colocado en medio de regeneración sin kanamicina y el segundo grupo en medio de regeneración con kanamicina a 100 mgL⁻¹ después del co-cultivo.

Identificación de la planta	Lectura del espectrofotómetro	Concentración de ADN de plantas aplicando la fórmula (ng/ μ L)
1.1	0.019	570
1.2	0.006	180
1.3	0.009	270
3.1	0.013	390
4.1	0.004	120
5.1	0.005	150
6.1	0.008	240
6.2	0.004	120
6.3	0.020	600
7.1	0.014	420
8.1	0.010	300
8.2	0.005	150
9.1	0.025	750
10.4	0.008	240
11.1	0.005	150
11.4	0.005	150

Tabla 5. Absorbancia, concentración y dilución de las muestras de ADN extraídas de las plantas de tomate de árbol, potencialmente transformadas, obtenidas en el Experimento 3.

Se observa una alta diversidad entre las concentraciones de ADN obtenidas de las 16 plantas potencialmente transgénicas. Las concentraciones fluctúan entre los 120 y 600 ng/ μ L

Gen a amplificar	Secuencia de los primers utilizados
GUS	CCC GCT TCG AAA CCA ATG CC
	ACG TCC TGT AGA AAC CCC AA
NPTII	CCG ACC TGT CCG GTG CCC
	CCG CCA CAC CCA GCC GGC C

Tabla 6. Secuencias de primer utilizadas para amplificar GUS y NPTII en las 16 plantas posiblemente transformadas.

Reactivo	Cantidad
dNTP's 20 μmol	0.1 μl
Buffer 10 X con MgCl	1.0 μL
Agua DNAsa/RNAsa Free	6.3 μL
Taq polimerasa 1 U	0.2 μL
Primer Up	0.2 μL
Primer Low	0.2 μL

Tabla 7. Reactivos y concentraciones utilizados para una reacción de PCR de ADN de las 16 plantas posiblemente transformadas.

Nombre del Tratamiento	Número de caja	Número de explantes sembrados	Número de explantes que formaron callo	Número de plantas regeneradas por caja
Control de regeneración de explantes de tomate de árbol no transformados.	1	5	3	5
	2	5	2	6
	3	5	3	6
	4	5	3	4
Explantes control de tomate de árbol no transformados para medir la concentración eficiente de antibiótico*	1	5	0	0
	2	5	0	0
	3	5	0	0
	4	5	0	0
Explantes inoculados con <i>A. tumefaciens</i> LB004/pBI121	1	5	0	0
	2	5	0	0
	3	5	0	0
	4	5	0	0

*Concentración eficiente de antibiótico: concentración a la cual se consigue la muerte de los explantes no transformados.

Tabla 8. Resultados del Experimento 1 por caja.

Se muestra que el medio de regeneración promueve la formación de callos y consecuentemente de plantas a partir de explantes de hoja de tomate de árbol. Adicionalmente se observa que la concentración 100 mgL^{-1} de kanamicina inhibe la formación de callos a partir de explantes de hoja no transformados y finalmente se observa que este experimento no se obtuvo plantas transformadas a partir de los explantes de hoja que fueron inoculados con *A. tumefaciens*.

Nombre del Tratamiento	Número de caja	Número de explantes sembrados	Número de explantes que formaron callo	Número de raíces regeneradas por caja
Control de regeneración de explantes de tomate de árbol no transformados.	1	5	3	2
	2	5	3	4
	3	5	2	3
	4	5	4	0
Explantes control de tomate de árbol no transformados para medir la concentración eficiente de antibiótico*	1	5	0	0
	2	5	0	0
	3	5	0	0
	4	5	0	0
Explantes inoculados con <i>A. tumefaciens</i> LB004/pBI121	1	5	3	3
	2	5	2	1
	3	5	2	1
	4	5	1	0

*Concentración eficiente de antibiótico: concentración a la cual se consigue la muerte de los explantes no transformados.

Tabla 9. Resultado del Experimento 2 por caja.

Todos los explantes sin transformar produjeron callo en el medio de regeneración con 4 ppm de BAP y 0,05 ppm de NAA. De estos 20 explantes de tomate de árbol utilizados como control de regeneración de explantes no transformados, se obtuvo 12 callos que regeneraron un total de 9 raíces. Por otro lado, los explantes utilizados para determinar la concentración eficiente de antibiótico para matar el tejido vegetal, no formaron callo ni regeneraron plantas. Finalmente se puede observar que los explantes que fueron inoculados con *A. tumefaciens*, si crecieron en medio de regeneración con kanamicina (100 mgL⁻¹), sin embargo los órganos regenerados fueron en su totalidad raíces.

Nombre del Tratamiento	Número de Caja	Número de explantes por caja	Número de explantes con callo	Número de plantas obtenidas por caja
Control de regeneración de explantes de tomate de árbol no transformados.	1	5	4	9
	2	5	5	12
Explantes control de tomate de árbol no transformados para medir la concentración eficiente de antibiótico*	1	5	0	0
	2	5	0	0
	3	5	0	0
	4	5	0	0
Explantes inoculados con <i>A. tumefaciens</i> LB004/pBI121**	1	5	3	4
	2	5	2	3
	3	5	4	3
	4	5	1	2
	5	5	3	4
Explantes inoculados con <i>A. tumefaciens</i> LB004/pBI121***	1	5	0	0
	2	5	2	4
	3	5	1	4
	4	5	1	0
	5	5	0	0

*Concentración eficiente de antibiótico: concentración a la cual se consigue la muerte de los explantes no transformados.

** Colocados en medio MS sin kanamicina después del co-cultivo

*** Colocados en medio MS con kanamicina después del co-cultivo

Tabla 10. Resultado del Experimento 3 por caja.

El primer grupo utilizado como control de regeneración de explantes de tomate de árbol no transformados presentará formación de callo y se regeneraron un total de 21 plantas a partir de este grupo de explantes. Por otro lado, se comprobó la eficiencia de la concentración de antibiótico utilizada para inhibir el desarrollo de material vegetal no transformado, los explantes cultivados en medios con kanamicina (100 mgL^{-1}) no formaron callo. Para el grupo de explantes que fueron inoculados con *A. tumefaciens* se puede observar que sí hubo formación de callo y regeneración de plantas. De los 50 explantes, 25 fueron cultivados en medio MS con kanamicina (100 mgL^{-1}) y los otros 25 formaron en ausencia de kanamicina. De los explantes que crecieron en ausencia del agente selectivo se obtuvo un total de 13 callos y regeneraron 16 plantas, mientras que de los explantes que pasaron a medio MS con kanamicina inmediatamente después del co-cultivo se obtuvo únicamente 4 callos y 8 plantas.

Tipo de medio en el que se regeneraron las plantas	Identificación de la planta	Resultado del cambio a medio con agente selectivo
Medio sin kanamicina	1.1	Sobrevivió
	1.2	Sobrevivió
	1.3	Sobrevivió
	2.1	Murió
	2.2	Murió
	3.1	Sobrevivió
	3.2	Murió
	4.1	Sobrevivió
	5.1	Sobrevivió
	6.1	Sobrevivió
	6.2	Sobrevivió
	6.3	Sobrevivió
	7.1	Sobrevivió
	8.1	Sobrevivió
	8.2	Sobrevivió
9.1	Sobrevivió	
Medio con 100 mgL⁻¹ de kanamicina	10.1	Murió
	10.2	Murió
	10.3	Murió
	10.4	Sobrevivió
	11.1	Sobrevivió
	11.2	Murió
	11.3	Murió
	11.4	Sobrevivió

Tabla 11. Resultados del subcultivo de las plantas regenerada en el Experimento 3 a medio con kanamicina.

De las 16 plantas regeneraron a partir del grupo de explantes que fueron cultivados en medio MS con BAP (4 ppm) y NAA (0,05 ppm), 13 sobrevivieron al subcultivo posterior en medio de selección MS con 100 mgL⁻¹. Por otro lado de las 8 plantas obtenidas a partir de los explantes que regeneraron en medio MS con BAP (4 ppm), NAA (0,05 ppm) y kanamicina (100 mgL⁻¹) únicamente 3 sobrevivieron al subcultivo posterior en el medio de selección MS con 100 mgL⁻¹ de kanamicina.

Contenido del medio MS del cual se obtuvo plantas regeneradas en el Experimento 3.	Total de plantas obtenida en este medio	Número de plantas que murieron al se pasadas a MS con kanamicina (100 mg L ⁻¹)	Porcentaje de plantas que sobrevivieron
Sin kanamicina	16	3	81.3 %
Con 100 mg L⁻¹ de kanamicina	8	5	62,5 %

Tabla 12. Porcentaje de supervivencia de las plantas de tomate de árbol, potencialmente transformadas, en medio de Selección (MS con 100 mg L⁻¹ kanamicina).

Se observa que las plantas regeneradas a partir de explantes cultivados en MS con 100 mg L⁻¹ de kanamicina después del co-cultivo sobrevivieron en mayor porcentaje que aquellas plantas regeneraron bajo la presión del agente selectivo.