

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES**

**Estandarización de un protocolo de cultivo *in vitro* en  
tomate de árbol (*Solanum betaceum*) para futuras  
aplicaciones en transformación genética con *Agrobacterium  
tumefaciens***

Proyecto de investigación.

**María Carolina Jaramillo Crespo**

**Ingeniería en Procesos Biotecnológicos**

Trabajo de titulación presentado como requisito  
para la obtención del título de  
Ingeniera en Procesos Biotecnológicos

Quito, 3 de diciembre del 2018

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**  
**COLEGIO CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES**

HOJA DE CALIFICACIÓN  
DE TRABAJO DE TITULACIÓN

**Estandarización de un protocolo de cultivo *in vitro* en tomate de árbol  
(*Solanum betaceum*) para aplicaciones de transformación genética mediante  
*Agrobacterium tumefaciens* EHA105**

**María Carolina Jaramillo Crespo**

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico:

María de Lourdes Torres, Ph.D.

Firma del profesor

---

Quito, 3 de diciembre del 2018

## DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: \_\_\_\_\_

Nombres y apellidos: María Carolina Jaramillo Crespo

Código: 00121732

Cédula de Identidad: 0104199856

Lugar y fecha: Quito, 3 de diciembre del 2018

## DEDICATORIA

A mis papas, Pablo y Pilar, con quienes he compartido mi vida y me han apoyado siempre. Ellos me conocen bien, saben de mis sueños, de mis miedos, de mis anhelos y de mis fuerzas. Gracias por todo el esfuerzo, los viajes, risas y aventuras. ¡Este mérito es suyo!

A mis hermanos Sofía, Hugo y Emilia por ser enseñarme a aceptar lo que es, al saber que cada realidad está llena de recursos y oportunidades para explorar y aprender. “Si estás tratando de que algo suceda, estás creando resistencia hacia lo que es”.

A Helena María, por ser la alegría y motivación de hacer las cosas bien para los que vendrán.

A Bernardo, por el cariño y apoyo durante mi vida universitaria.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer especialmente a Andrea Argudo, Ma. de Lourdes Torres, Rodrigo Caroca, Carlos Vintimilla, Milton Gordillo, Pieter Van Hoff y UC Davis por hacer posible este proyecto.

Por darse el tiempo de ayudarme y prestarme equipos y reactivos quiero agradecer a Bernardo Correa, Jairo Guevara, Valeria Ochoa, Danny Navarrete, Sully Márquez, Verónica Baquero, Pedro Aponte, Vlastimil Zak, Antonio Machado, David Valencia, Pamela Borja, Hugo Mata, Miguel Orellana, Nina Espinosa de los Monteros y Andrés Caicedo.

Al Laboratorio de Biotecnología Vegetal USFQ, Instituto de Microbiología USFQ, Agrocalidad Agencia de regulación y control Fito y Zoonosanitario y Agrota Cía. Ltda.

De manera especial les quiero agradecer de corazón a mis abuelos Carlos, Mishu y Sandra porque sin ustedes hubiera sido imposible.

## RESUMEN

El tomate de árbol *Solanum betaceum* es una planta andina con potencial para convertirse en un producto de alta calidad a nivel nacional e internacional. Por ello, esta investigación tuvo como principal objetivo dejar establecido un protocolo de regeneración de brotes de tomate de árbol para ser utilizado en futuras aplicaciones biotecnológicas. Además, determinar un protocolo de selección para futuros explantes transformados con *Agrobacterium tumefaciens* EHA105, para lo que se analizó la dosis mínima inhibitoria del agente selectivo kanamicina. Se estudió paralelamente si el tamaño de los explantes influye en la regeneración de brotes al ser seleccionados por kanamicina. Por último, se verificó la funcionalidad de los vectores pGWB402 y pGWB402 $\Omega$  construidos por medio de la tecnología Gateway a través de un PCR comprobatorio del gen reportero GFP y a través de la técnica de agroinfiltración en la planta modelo *Nicotiana tabacum*.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se determinó que el medio MS + 0.05 ppm ANA + 4 ppm BAP debe ser usado para la regeneración de brotes de tomate de árbol *in vitro*. La concentración mínima inhibitoria para seleccionar futuros explantes transformados de tomate de árbol debe ser igual o superior a 50mgL<sup>-1</sup> de kanamicina. Se vio que el tamaño de los explantes de tomate de árbol analizados, en este proyecto, no influyeron en la regeneración de brotes al ser seleccionados con kanamicina. Finalmente se comprobó que *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 pGWB402 y pGWB402 $\Omega$  contienen el gen reportero GFP, y pueden ser utilizados en experimentos de transformación genética. La agroinfiltración permitió comprobar la expresión del GFP a partir del tercer día, por lo que nuevamente se verificó la funcionalidad de los vectores binarios construidos con la tecnología Gateway. Los protocolos previos a la transformación genética del tomate de árbol con *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 pGWB402 y pGWB402 $\Omega$  están listos, por lo que se recomienda realizar experimentos de transformación genética utilizando *Agrobacterium tumefaciens* y agroinfiltración en tomate de árbol.

**Palabras clave:** cultivo *in vitro*, MS, ANA, BAP, GFP, regeneración de brotes, transformación genética, tecnología Gateway, vectores, *Agrobacterium tumefaciens*, agroinfiltración.

## ABSTRACT

*In vitro* propagation and genetic transformation are valuable biotechnological tools that can be applied into tamarillo breeding, allowing this Andean plant to become a high-quality product in the national and international market. Therefore, the main aim of this research was to establish a tamarillo *in vitro* shoot regeneration protocol in order to be used in future biotechnological applications. Additionally, I studied kanamycin sensitivity in shoot regeneration of both leaves and cotyledons of tamarillo plants. In one experiment explant's size was considered as factor. Furthermore, I analyzed the construction and expression of pGWB402 and pGWB402 $\Omega$  vectors through a PCR for GFP gene, and through the expression of GFP by agroinfiltration in *Nicotiana tabacum*.

MS + 0.05 ppm ANA + 4 ppm BAP allows successfully *in vitro* regeneration of tamarillo shoots from leaves and cotyledons. The minimum concentration of kanamycin to select future transformed explants should be equal to or greater than 50mgL<sup>-1</sup> of kanamycin. It was found that size of tamarillo explants evaluated in this project did not influence the regeneration of shoots when selected with kanamycin. Finally, it has been shown that *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 pGWB402 and pGWB402 contain GFP and can be used in genetic transformation experiments. Agroinfiltration experiment showed the expression of GFP from the third day, so again the functionality of the binary vectors constructed with Gateway technology was verified. A tamarillo *in vitro* protocol is well established, as well as determined the minimum concentration of kanamycin. Therefore, is strongly recommended to do genetic transformation experiments with tamarillo plants with *Agrobacterium tumefaciens* and agroinfiltration.

**Key words:** *in vitro* culture, MS, ANA, BAP, GFP, shoot regeneration, genetic transformation, Gateway technology, vectors, *Agrobacterium tumefaciens*, agroinfiltration.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>DERECHOS DE AUTOR</b> .....	<b>3</b>
<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>4</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>5</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>6</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>7</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>13</b>
<b>1.1 Tomate de árbol</b> .....	<b>13</b>
<b>1.1.1 Generalidades</b> .....	<b>13</b>
<b>1.1.2 Cultivo de tomate de árbol a nivel mundial</b> .....	<b>14</b>
<b>1.1.3 Cultivo de tomate de árbol en el Ecuador</b> .....	<b>14</b>
<b>1.2 Cultivo in vitro para aplicaciones biotecnológicas</b> .....	<b>15</b>
<b>1.3 Transformación Genética de Plantas</b> .....	<b>16</b>
<b>1.3.1 Agrobacterium tumefaciens</b> .....	<b>17</b>
<b>1.4 Vectores</b> .....	<b>19</b>
<b>1.4.1 Tecnología Gateway</b> .....	<b>20</b>
<b>1.4.2 Gen marcador de selección nptII</b> .....	<b>22</b>
<b>1.4.3 Gen Reportero GFP</b> .....	<b>22</b>
<b>1.5 Agroinfiltración</b> .....	<b>23</b>
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>24</b>
<b>2.1 Objetivo General</b> .....	<b>24</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>25</b>
<b>3. Justificación</b> .....	<b>25</b>
<b>4. Área de Estudio</b> .....	<b>26</b>
<b>5. Materiales, Reactivos y Equipos</b> .....	<b>26</b>
<b>5.1 Cultivo In Vitro de tomate de árbol</b> .....	<b>26</b>
<b>5.1.1 Material vegetal</b> .....	<b>26</b>
<b>5.1.2 Esterilización de semillas de tomate de árbol</b> .....	<b>26</b>
<b>5.1.3 Germinación in vitro de semillas de tomate de árbol</b> .....	<b>27</b>
<b>5.1.4 Subcultivo in vitro de plantas de tomate de árbol</b> .....	<b>27</b>
<b>5.2 Experimentos para la regeneración de brotes a partir de explantes de tomate de árbol</b> .....	<b>27</b>
<b>5.3 Experimentos para determinar la concentración mínima inhibitoria de kanamicina para la regeneración de brotes en tomate de árbol</b> .....	<b>28</b>

<b>5.4</b>	<b>Verificación de GFP en Vectores pGWB402 y PGWB402Ω.....</b>	<b>28</b>
5.4.1	Cepas bacterianas.....	28
5.4.2	Medios de cultivo para <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105 .....	28
5.4.3	Extracción de ADN de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105.....	29
5.4.4	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	29
5.4.5	Electroforesis en gel de agarosa .....	30
<b>5.5</b>	<b>Agroinfiltración en tabaco.....</b>	<b>30</b>
5.5.1	Material vegetal .....	30
5.5.2	Germinación de semillas de tabaco.....	30
5.5.3	Agroinfiltración en plantas de tabaco <i>Nicotiana tabacum</i> .....	31
<b>6.</b>	<b>Metodología .....</b>	<b>32</b>
6.1	Cultivo in vitro de tomate de árbol.....	32
6.1.1	Material vegetal .....	32
6.1.2	Esterilización de semillas de tomate de árbol .....	32
6.1.3	Germinación in vitro de semillas de tomate de árbol.....	33
6.1.4	Subcultivos in vitro de plantas de tomate de árbol.....	33
6.2	Experimentos para la regeneración de brotes a partir de explantes de tomate de árbol.....	33
6.3	Experimentos para determinar la concentración mínima inhibitoria de kanamicina para la regeneración de brotes en tomate de árbol. ....	34
6.3.1	Hojas .....	34
6.3.2	Cotiledones.....	35
6.3.3	Tamaño del Explante .....	35
6.4	Verificación de <i>gfp</i> en vectores pGWB402 y pGWB402Ω.....	36
6.4.1	Cepas bacterianas.....	36
6.4.2	Crecimiento de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	37
6.4.3	Extracción de ADN de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	37
6.4.4	PCR de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105 pGWB402 y pGWB402Ω para el gen GFP.....	38
6.4.5	Electroforesis en gel de agarosa .....	38
6.5	Agroinfiltración en tabaco.....	38
6.5.1	Material Vegetal.....	38
6.5.2	Germinación de semillas de tabaco.....	39
6.5.3	Agroinfiltración en Tabaco <i>Nicotiana tabacum</i> .....	39
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>40</b>

<b>7.1 Experimentos para la regeneración de brotes a partir de explantes de tomate de árbol .....</b>	<b>40</b>
<b>7.2 Experimentos para determinar la concentración mínima inhibitoria de kanamicina para la regeneración de brotes en tomate de árbol. ....</b>	<b>41</b>
<b>7.2.1 Hojas .....</b>	<b>41</b>
<b>7.2.2 Cotiledones.....</b>	<b>42</b>
<b>7.2.3 Tamaño del explante .....</b>	<b>43</b>
<b>7.3 Verificación de gfp en vectores pgwb402 y pgwb402<math>\Omega</math>.....</b>	<b>43</b>
<b>7.4 Agroinfiltración en tabaco.....</b>	<b>44</b>
<b>8. Discusión.....</b>	<b>44</b>
<b>9. Conclusiones .....</b>	<b>51</b>
<b>10. Recomendaciones .....</b>	<b>52</b>
<b>11. Literatura Citada .....</b>	<b>53</b>
<b>12. Tablas .....</b>	<b>62</b>
<b>13. Figuras .....</b>	<b>64</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1.</b> LISTA DE IMPGWBS.....	62
<b>TABLA 2.</b> CALLOGÉNESIS Y REGENERACIÓN DE BROTES A PARTIR DE EXPLANTES DE HOJA DE TOMATE DE ÁRBOL EN MEDIO MS + 0.05PPM ANA + 4PPM BAP.....	62
<b>TABLA 3.</b> CALLOGÉNESIS Y REGENERACIÓN DE BROTES A PARTIR DE EXPLANTES DE HOJA DE TOMATE DE ÁRBOL EN MEDIO MS + 0.05PPM ANA + 4PPM BAP + KANAMICINA EN DIFERENTES CONCENTRACIONES.....	62
<b>TABLA 4.</b> CALLOGÉNESIS Y REGENERACIÓN DE BROTES A PARTIR DE EXPLANTES COTILEDÓNEOS DE TOMATE DE ÁRBOL EN MEDIO MS + 0.05PPM ANA + 4PPM BAP + KAN EN DIFERENTES CONCENTRACIONES.....	63
<b>TABLA 5.</b> CALLOGÉNESIS Y REGENERACIÓN DE BROTES A PARTIR DE EXPLANTES DE HOJAS PEQUEÑOS (0.5cm <sup>2</sup> ) Y GRANDES (1cm <sup>2</sup> ) DE TOMATE DE ÁRBOL EN MEDIO MS + 0.05PPM ANA + 4PPM BAP + KAN EN DIFERENTES CONCENTRACIONES.....	63

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 1.5 % DE LOS PRODUCTOS DE PCR DE AGROBACTERIUM TUMEFACIENS EHA105 PGWB402 (A1, A2, A3, B1, B2, B3) Y AGROBACTERIUM TUMEFACIENS EHA105 PGWB402 $\Omega$ (C1, C2, C3, D1, D2) PARA COMPROBAR QUE CONTENGAN EL GEN GFP.....	64
<b>FIGURA 2.</b> AGROINFILTRACIÓN DE HOJAS DE TABACO A LOS 0 DÍAS (A, B, C, D, E, F) Y A LOS 3 DÍAS (G, H, I, J, K, L) DE LA AGROINFILTRACIÓN EN LUZ VISIBLE (A, C, E, G, I, K) Y EN LUZ UV DE 302NM (B, D, F, H, J, L).....	65
<b>FIGURA 3.</b> AGROINFILTRACIÓN EN HOJAS DE TABACO A LOS 3 DÍAS. (A). HOJA CONTROL EN LUZ UV. (B). CORTE DE HOJA A EN MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA. (C). HOJA AGROINFILTRADA CON AGROBACTERIUM TUMEFACIENS EHA105 PGWB402 $\Omega$ . (D). CORTE DE HOJA D EN MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA. EL MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA UTILIZADO PARA ESTAS FOTOS ES OLYMPUS BX61WI. ....	67
<b>FIGURA 4.</b> CALLOS FORMADOS A PARTIR DE COTILEDONES DE TOMATE DE ÁRBOL A LAS 4 SEMANAS EN MS + 0.05 PPM ANA + 4 PPM BAP. ....	68
<b>FIGURA 5.</b> CALLOS A PARTIR DE HOJAS DE TOMATE DE ÁRBOL A LAS 4 SEMANAS EN MEDIO MS + 0.05 PPM ANA + 4 PPM DE BAP + 0MGL <sup>-1</sup> DE KANAMICINA. <b>A.</b> CALLOS DE EXPLANTES PEQUEÑOS 0.5 CM <sup>2</sup> . <b>B.</b> CALLOS DE EXPLANTES GRANDES 1 CM <sup>2</sup> . ....	68
<b>FIGURA 6.</b> RESULTADO DE LA PRUEBA DE FRIEDMAN PARA ANALIZAR SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA EN EL TAMAÑO 0.5 CM <sup>2</sup> Y 1 CM <sup>2</sup> COMO FUENTE DE EXPLANTE HOJAS DE TOMATE DE ÁRBOL IN VITRO. ....	69
<b>FIGURA 7.</b> RESULTADO DE LA PRUEBA DE FRIEDMAN PARA ANALIZAR SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA ENTRE LOS 5 TRATAMIENTOS DE KANAMICINA (0MGL <sup>-1</sup> , 25MGL <sup>-1</sup> , 50MGL <sup>-1</sup> , 75MGL <sup>-1</sup> , 100MGL <sup>-1</sup> ) EN HOJAS DE TOMATE DE ÁRBOL IN VITRO. ....	69

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 TOMATE DE ÁRBOL

#### 1.1.1 Generalidades

El Ecuador es un país mega diverso ya que contiene miles de especies en tan solo 283.560 km<sup>2</sup>. Entre esas especies, se encuentran especies de origen andino con gran potencial para convertirse en productos de alta calidad a nivel nacional e internacional; como por ejemplo el tomate de árbol (*Solanum betaceum*) también conocido como tamarillo, tomate de palo ó tomate cimarrón (Ávila, 2015). El tomate de árbol es un arbusto que puede alcanzar los 3 m de altura, tiene tallos semileñosos y follaje perenne. Tiene hojas alternas cordiforme, carnosas, levemente pubescentes y muy grandes (Calvo, 2009). Tienen peciolo robustos de hasta 8 cm de longitud (Bohs, 1989). Las nerviaciones en las hojas son prominentes. Sus flores son pequeñas de aproximadamente 1,5 cm de diámetro de color blanco-rosáceo, agrupadas en racimos terminales. Tienen 5 pétalos y 5 estambres amarillos (Calvo, 2009). Su fruto es una baya ovoide con ápices puntiagudos, que contiene una gran cantidad de semillas pequeñas, entre 150 por fruto (Calvo, 2009). Esto les permite propagarse fácilmente y germinan sencillamente sin necesitar condiciones especiales. Las plántulas alcanzan la madurez en 1 o 2 años y dan frutos continuamente durante 8 a 10 años (Lewis & Considine, 1999). La pulpa del fruto es jugosa y dependiendo de la variedad puede tener diferentes colores, al igual que la cáscara de la baya.

El tomate de árbol (*Solanum betaceum*), es una planta originaria del sur de Bolivia que se ha distribuido naturalmente a lo largo de Sudamérica. Su producción se concentra en la región andina ya que normalmente crece entre 1500 a 2600 msnm con una temperatura de

entre 13 a 24 °C, con precipitaciones anuales de entre 500 y 1500 mm (Revelo, Pérez, & Maila, 2004).

### **1.1.2 Cultivo de tomate de árbol a nivel mundial**

*Solanum betaceum* produce frutas comestibles con un alto contenido de vitaminas, minerales, compuestos fenólicos y carotenoides (Correia y Canhoto, 2012; Vasco et al 2009). Las frutas se usan en helados, mermeladas, jugos y batidos (Bohs, 1989). Por otra parte, las hojas se usan con fines medicinales para problemas hepáticos, inflamación de las amígdalas, entre otros (Calvo, 2009). Por estas propiedades, se cultiva tomate de árbol en la región andina de origen principalmente en Chile, Ecuador, Bolivia, Colombia y Brasil. No obstante, también se cultiva esta planta en las zonas montañosas de África, India y Australia (Calvo, 2009); siendo Nueva Zelanda el mayor productor de este cultivo a nivel mundial (Correia, 2012; Meadows, 2002).

### **1.1.3 Cultivo de tomate de árbol en el Ecuador**

Según la encuesta de superficie y producción agropecuaria continua (INEC, 2015) se produjeron 16 175 toneladas métricas de tomate de árbol en el año 2015 en el Ecuador. Siendo Tungurahua la provincia líder de este cultivo, seguida de Imbabura, Cotopaxi, Chimborazo, Pichincha, Azuay y Bolívar (El Comercio, 2018).

A pesar de que no existe una clasificación oficial de los genotipos de tomate de árbol cultivados, comercialmente se los diferencia en base al color de la pulpa y cáscara. El estudio

realizado por el SICA (Sistema de Información del Censo Agropecuario) clasifica a las variedades ecuatorianas en 5 cultivares “Tomate Puntón”, “Tomate Negro”, “Tomate Amarillo”, “Tomate Redondo”, y “Tomate Mora” (Albornoz, 1992).

El tomate de árbol representa un factor económico importante para el Ecuador ya que por sus características organolépticas tiene alta acogida en el mercado nacional e internacional. Ramírez (2009) afirma que en el 2008 Ecuador exportó 1.3 millones de dólares de tomate de árbol a Estados Unidos. Sin embargo, uno de los principales problemas de la producción ecuatoriana de tomate de árbol son la presencia de enfermedades y plagas, como nemátodos y virus, así como también a condiciones del suelo.

## **1.2 CULTIVO *IN VITRO* PARA APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS**

A partir de 1983, se inició el desarrollo de protocolos para transformar plantas de interés agrícola (Herrera y Estrella, 1983). Estas técnicas incluyen el uso de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, el cual es necesario para promover la formación de plantas a través de dos vías principales, la organogénesis y embriogénesis somática (Gutiérrez et al, 2003). Esto se da porque las células vegetales son células eucariotas totipotentes, esto quiere decir que partir de una célula pueden generar un nuevo individuo completo (Mendoza de Gyves, 2001). Schwann y Schleiden reconocieron esta característica de totipotencialidad y por ello generaron condiciones específicas para originar individuos a partir de una célula (Hooykaas y Schilperrot, 1992). Las células vegetales diferenciadas y especializadas tienen la capacidad de desdiferenciarse y perder su especialidad frente a un estrés; por lo que se vuelve una célula totipotente y puede regenerar una planta completa idéntica genéticamente. Por una parte,

se puede regenerar órganos como brotes o raíces que se conoce como organogénesis somática, y, por otro lado, se puede regenerar embriones que se conoce como embriogénesis somática (Mendoza de Gyves, 2001).

Sin importar que vía se siga, es fundamental el uso de hormonas de crecimiento vegetal para la regeneración tanto de órganos como de plantas (Criollo, 2016) y la asepsia para mantener la esterilidad (Chacón, 2013). Las condiciones que se controlan a través del cultivo *in vitro* dependen de la especie y el genotipo, pero existen requerimientos generales como control el medio de cultivo, los requerimientos hormonales, pH, temperatura, salinidad, horas luz (Mendoza de Gyves, 2001). El cultivo *in vitro* es un método de regeneración indispensable para introducir genes de interés que han sido aislados, secuenciados y clonados mediante técnicas de biología molecular de ingeniería genética (Gutiérrez et al, 2003).

### **1.3 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE PLANTAS**

La ingeniería genética de plantas está dirigida a la producción de genotipos que expresen características de interés, mediante la integración en el genoma vegetal, de segmentos de ADN foráneos, provenientes de cualquier origen (Díaz y Chaparro, 2012). Estos segmentos de ADN alteran las características de las plantas mediante la modificación dirigida y controlada, al añadir, eliminar o modificar alguno o algunos de sus genes (Díaz y Chaparro, 2012; Danilova, 2007; Karimi et al, 2007). La ingeniería genética permite introducir genes de especies no relacionadas evolutivamente, por lo que se pueden usar diferentes especies, géneros y reinos; eliminando así las barreras de incompatibilidad sexual y fertilidad. (Vasil, 2007; Díaz y Chaparro, 2012). Por ello la principal ventaja, es poder introducir una característica sin tener

que transferir los miles de genes, si no, traspasar en uno o pocos genes, para conferir la característica deseada (Danilova, 2007). Otra ventaja es que permite acelerar procesos que de otra forma serían lentos y laboriosos, para mejorar las especies. (Jauhar, 2006 ; Livemore, 2002; Díaz y Chaparro, 2012).

La transformación de plantas usa una amplia gama de herramientas mediante las cuales, es posible la introducción de información genética foránea, sin afectar las cualidades agronómicas del cultivo (Díaz y Chaparro, 2012). La primera planta transgénica se reportó en 1983, y a partir de ese entonces, se han logrado transformar más de 120 especies y 35 diferentes familias vegetales (Díaz y Chaparro, 2012; Bhat y Srinivasan, 2002; Jauhar, 2006). Sin embargo, esto no significa que sea un proceso sencillo, al contrario, es un proceso complicado que involucra varias etapas: la identificación y aislamiento del gen de interés, construcción de los vectores, desarrollo de un protocolo de transformación para la introducción estable de ADN en el genoma vegetal, sistema de cultivo *in vitro* de tejidos que permita regenerar plantas completas, selección de transformantes mediante un proceso de distinción entre individuos transformados de individuos no transformados, y por último un método analítico para detectar el gen foráneo y sus productos en la planta transformada. (Díaz et al, 2004, Larik et al, 2004; Jauhar, 2006; Díaz y Chaparro, 2012).

### **1.3.1 *Agrobacterium tumefaciens***

El principal método de obtención de organismos vegetales genéticamente modificados es la transformación mediante *Agrobacterium tumefaciens*. Una bacteria patógena del suelo que infecta a plantas para formar la corona de agallas (Siemes y Schiedes, 1996). Esta

enfermedad fue estudiada por Smith y Twonsend, ya que producía los tumores en las plantas infectadas (Hooykaas & Schilperoort, 1992). Las células infectadas se duplicaban más rápido que las células normales y podrían continuar duplicándose a pesar de que la bacteria ya no esté presente. Posteriormente en los años 60, se descubrió que las células infectadas eran capaces de sintetizar proteínas no vegetales como las opinas. En los años 70, se entendió que las opinas servían de alimento para la bacteria y que las cepas virulentas poseían un elemento genético extracromosomal, el plásmido Ti (tumor inducing) (Hooykaas & Schilperoort, 1992).

El plásmido Ti está compuesto por genes virulentos y T-DNA (Binns, 2002). El T-DNA es el ADN de transferencia del plásmido Ti, es decir, son los genes que se introducen a la planta cuando infecta normalmente. Los genes virulentos son encargados de cortar, transferir e introducir el T-DNA al genoma de la planta. La infección natural de *Agrobacterium* se da porque una planta puede tener heridas, donde se liberan al ambiente fenoles conocidos como acetosiringona (Stachel et al, 1985; Valderrama et al, 2005). *Agrobacterium* en su membrana celular tiene receptores (complejo proteico virA y virG) de acetosiringona y por quimiotaxis se ve atraída a la planta para insertar su elemento genético extracromosomal o plásmido Ti. A partir de la señal en la membrana celular (virG), se da una cascada de regulación celular que permite dirigir e introducir genes de virulencia en el genoma de la planta para que se exprese y sinteticen proteínas de interés bacteriano (Valderrama et al, 2015). Es decir, se promueve la transcripción amplificada y la traducción acelerada de la región de virulencia del plásmido Ti. Lo primero en sintetizarse son las proteínas virD1 y virD2 que cortan al T-DNA desde su Left-Border hasta su Right-Border y se queda una cadena pegada a las proteínas. El resto de la cadena se recubre por otras proteínas como la virE2 y a esto se le conoce como el complejo T. Se guía al T-DNA hacia la inserción del genoma vegetal del T-DNA a través de un canal que

une el citoplasma bacteriano con el citoplasma vegetal. Una vez adentro se guía al t-DNA hacia el núcleo e integración del genoma por recombinación no homologa (Valderrama et al, 2005). La introducción es aleatoria dentro de las regiones eucromáticas donde existe alta expresión génica. Las auxinas y citoquininas promueven la división celular y por ello se crean los tumores (Binns, 2002).

## 1.4 VECTORES

Los descubrimientos científicos han permitido utilizar el mecanismo de *Agrobacterium tumefaciens* para introducir genes de interés, diferentes a los genes virulentos, en especies determinadas. Los genes de interés no se introducen directamente en una célula u organismo, ya que estos pueden ser degradados, y si esto no ocurre, no se replicarían y no se pasaría la información a la siguiente generación. Por ello, para asegurarse que los fragmentos de ADN se copian y se pasan de generación en generación a través de la división celular se utilizan vectores que garantizan que cada vez que la célula se divide, pasa la información introducida (Lodge, Lund y Minchin, 2007). Existen diferentes vectores entre los más usados, vectores virales, vectores plasmídicos y vectores binarios.

Frecuentemente se usan virus que son microorganismos simples que contiene una molécula de ADN o ARN y una cápside de proteínas. No tienen la capacidad autónoma de reproducirse, por ello infectan células eucariotas y procariotas integrando su genoma dentro de la célula huésped y aumentando la tasa de duplicación. La sustitución del genoma vírico por el genoma o genes de interés hace posible que por ejemplo se produzcan antibióticos de esta manera (Mendoza de Gyves, 2001). Una de las principales limitaciones del uso vírico

para transformación vegetal es que hay pocos virus de ADN que infectan plantas, como son los germinovirus y caulimovirus (Mendoza de Gyves, 2001).

Los vectores bacterianos son ampliamente usados como vectores de clonación para transferir y replicar fragmentos de ADN insertados mediante técnicas de ADN recombinante (Valderrama et al, 2005). Generalmente se usa el material extracromosomal bacteriano, los plásmidos. Los plásmidos son moléculas de ADN pequeñas, circulares y de doble cadena que se encuentran en células bacterianas porque les proveen una ventaja adaptativa. Son de suma importancia para la clonación, transferencia y manipulación de genes. Para que un plásmido sea un vector de clonación, debe tener un origen de replicación, genes marcadores y sitios de restricción (Valderrama et al, 2005).

Para usar un plásmido como vector de clonación se debe fragmentar el ADN de interés, ligar por medio de la enzima ADN ligasa, transferir a una bacteria y seleccionar las bacterias que contengan el ADN de interés por medio de los marcadores de selección. Es decir, requiere del uso de enzimas de restricción. Las enzimas de restricción deben ser compatibles con los fragmentos de ADN, por lo que limitan la manipulación de genes por esta técnica. Hoy en día, se tienen nuevas tecnologías para construir vectores como la tecnología Gateway.

### **1.4.1 Tecnología Gateway**

La tecnología Gateway es un método nuevo, para construir vectores de transformación genética. Es una técnica de clonación universal basada en las propiedades de

recombinación específicas del bacteriófago lambda, que facilita la integración de lambda en el cromosoma de *E.coli* (Landy, 1989; Ptshane, 1992). En esta tecnología, se modifican los componentes del sistema de recombinación lambda para mejorar la especificidad y eficiencia del sistema (Bushhman et al, 1985). Los componentes del sistema basado en lambda son: las secuencias de recombinación de ADN, conocidos como sitios att, y las proteínas que intervienen en la reacción de recombinación, enzimas Clonase™ (*Invitrogen*). La tecnología Gateway usa el sistema de recombinación lambda para facilitar la transferencia de secuencias de ADN heterólogas, flanqueadas por sitios att modificados, entre vectores (Hartley et al, 2000). Gateway se basa en dos reacciones de recombinación.

Existen varias ventajas en el uso de esta tecnología: permite la transferencia de secuencias de ADN de forma rápida y altamente eficiente a múltiples sistemas vectoriales de expresión de proteínas, así como el análisis funcional, mientras mantiene la orientación y el marco de lectura (Hartley et al, 2000). Permite el uso y expresión de múltiples tipos de secuencia de ADN, como productos de PCR, clones de ADNc, fragmentos de restricción. Se adapta fácilmente a la transferencia de un gran número de secuencias de ADN en múltiples vectores de destino. Permite la conversión fácil de cualquier vector en un vector de destino Gateway (*Invitrogen*) y no se necesita usar las enzimas de restricción.

Los primeros vectores binarios Gateway para plantas se realizaron en 1995, pero en 2007 fueron mejorados por Nakagawa et al, dando como resultado los ImpGWB, entre los que están pGWB402 y pGWB402Ω (Nakagawa et al, 2009). Los vectores binarios forman parte del sistema trans, y son la estrategia más empleada para la transferencia de genes en *Agrobacterium tumefaciens* (Díaz y Chaparro, 2012).

### **1.4.2 Gen marcador de selección nptII**

Los genes marcadores de selección son una herramienta indispensable para la transformación genética, porque permiten seleccionar las células, tejidos o plantas que han sido transformadas de las que no han sido transformadas (Díaz et al, 2011). Los genes marcadores se introducen en el vector junto con los genes de interés y comúnmente son genes de resistencia a antibióticos como el gen nptII. Dicho gen confiere resistencia a aminoglicósidos como: paramomicina, geniticina y butirosina, que son usados a nivel clínico (Mella et al, 2004; Sundar y Sakthivel, 2008; Díaz et al, 2011). Sin embargo, para la producción de plantas transgénicas se usa el gen nptII como marcador de selección ya que permite la sobrevivencia de células vegetales transformadas en presencia de kanamicina e inhibe el crecimiento de las células no transformadas (Brasilero y Argão, 2001; Díaz et al, 2011). Esto se debe al gen nptII permite codificar la enzima neomicina fosfotransferasa que confiere resistencia al antibiótico kanamicina (Huang et al, 2002)

### **1.4.3 Gen Reportero GFP**

Además de los genes marcadores de selección, se deben introducir en el vector genes reporteros que permitan visualizar las células o tejidos transformados. Las proteínas fluorescentes (FP) por sus siglas en inglés, han revolucionado la investigación en las ciencias de la vida. Su popularidad deriva del hecho que sus fluoróforos se forman de una reacción autocatalítica, por lo tanto, no necesitan de cofactores adicionales (Prasher et al, 1992; Chalfie et al, 1994; Tsien, 1998; Zhang et al, 2002). En especial, el GFP (Green Fluorescent Protein, es una proteína que se expresa sin reacción enzimática, por ello es fácilmente

observar su expresión en plantas transformadas desde etapas tempranas siendo un excelente gen reportero (Nakagawa et al., 2007).

El gen de la proteína verde fluorescente está constituido por 750 pb (Franco y Longart, 2009). Fue aislado originalmente de la medusa *Aequorea victoria* (Tsien, 1998). El GFP es comúnmente usado como marcador en biología molecular porque no necesita intermediarios para expresarse, es susceptible a modificaciones para mejorar su intensidad, cambiar de color de emisión, construir quimeras con otras proteínas, servir de gen reportero, sensor bioquímico, medidor sensible de pH, entre muchas otras aplicaciones (Franco y Longart, 2009). La proteína verde fluorescente (GFP) tiene dos picos de excitación el primero cerca de los 395 nm, y el segundo de 475 nm; también dos picos de emisión a 508 nm y a 503 nm. (Tsien, 1998; Franco y Longart, 2009). Por ello, para que el GFP sea visible, se requiere excitación con luz UV. Sin embargo, Franco y Longart (2009) recomiendan considerar la posibilidad de la fotodegradación de los tejidos con la exposición a luz UV. Para este trabajo, el gen de GFP fue usado como gen reportero y gen de interés.

## 1.5 AGROINFILTRACIÓN

La agroinfiltración consiste en la introducción de una solución con *Agrobacterium tumefaciens* en el apoplasto (Valero, 2015). En pequeña escala esto se consigue fácilmente inyectando a presión la suspensión con una jeringa, aprovechando los estomas de las hojas o pequeñas heridas como zona de entrada (Valero, 2015). A mediana escala y también a escala industrial, la agroinfiltración se consigue sumergiendo las plantas en posición invertida en tanques de vacío que contienen la suspensión de *Agrobacterium*, facilitando así la infección y transferencia del T-DNA (Valero, 2015).

La agroinfiltración es una técnica que permite estudiar la expresión génica en plantas ya que transforma transitoriamente células vegetales. La expresión transitoria se define como un proceso rápido, que consiste en la expresión de ciertos genes, que no ha tenido que integrarse previamente en el genoma de la planta (Valero, 2015). La herramienta clave para la expresión transitoria en plantas son los genes transmitido por *Agrobacterium tumefaciens*. La ventaja más obvia del sistema es la velocidad, ya que la expresión de la proteína de interés en las hojas de las plantas agroinfiltradas se da de 3-4 días (Gleba et al, 2005; Lacroix et al, 2013; Krenek et al, 2015; Valero, 2015). Por ello, se usa para estudiar la actividad del promotor, la función de genes y proteínas o la interacción de proteínas in vivo (Bashandy et al., 2015).

El propósito de este trabajo fue establecer las etapas previas a la transformación genética con *Agrobacterium tumefaciens* EHA105. Por ello, se estandarizó un protocolo de cultivo in vitro para la regeneración de plantas de tomate de árbol, se estandarizó un sistema de selección para futuros explantes transformados, se comprobó que los plásmidos recombinantes pGWB402 y pGWB402 $\Omega$  contengan el gen GFP, y por último se evidenció la expresión del GFP mediante agroinfiltración en plantas de tabaco.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GENERAL**

- Desarrollar un protocolo de regeneración de brotes de tomate de árbol partir de explantes de hoja y cotiledones para futuras aplicaciones de transformación genética.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comprobar el medio de cultivo y concentraciones óptimas de hormonas para la regeneración de plantas de tomate de árbol en cultivo *in vitro*.
- Determinar la concentración de kanamicina (marcador de selección) que inhibe el crecimiento *in vitro* de explantes de tomate de árbol.
- Establecer si el tamaño de los explantes de hoja de tomate de árbol influye en la regeneración de brotes.
- Comprobar que los vectores pGWB402 y pGWB402 $\Omega$  construidos por medio de la tecnología Gateway en *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 contengan el gen reportero GFP.
- Verificar la expresión del gen GFP en plantas de tabaco mediante agroinfiltración.

## 3. JUSTIFICACIÓN

El desarrollo tecnológico del mundo se encuentra tan avanzado, que la transformación genética es una metodología casi estándar en cualquier laboratorio. Esto se debe a que la transformación genética puede ser usada para diversas industrias con distintos objetivos. Dentro de la agricultura, las aplicaciones de la transformación genética de plantas son infinitas e importantísimas porque la agricultura es un pilar de la sociedad. Optimizar la producción agrícola y mejorar la calidad nutricional de los alimentos no solo permiten sino aseguran un desarrollo sustentable a nivel económico y social (Balbás y Lorence, 2004). Por ello, este trabajo de investigación es fundamental para futuras aplicaciones de transformación genética en tomate de árbol.

## **4. ÁREA DE ESTUDIO**

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

## **5. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS.**

### **5.1 CULTIVO *IN VITRO* DE TOMATE DE ÁRBOL**

#### **5.1.1 Material vegetal**

Tomate de árbol proveniente de la plaza del Maxwell de la Universidad San Francisco de Quito. Se utilizó las semillas para la germinación *in vitro* de las plantas, de las cuales se extrajeron las hojas que fueron utilizadas para la regeneración de brotes de los experimentos 1, 2 y 3. Adicionalmente se usó semillas de tomate de árbol de la variedad rojo puntón obtenidos en el *Supermaxi* para los experimentos 4, 5 y 6 que fueron esterilizadas y germinadas *in vitro*.

#### **5.1.2 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
- Cámara de flujo laminar LABCONCO®

### **5.1.3 Germinación *in vitro* de semillas de tomate de árbol**

- Medio MS (Murashige & Skoog,1962) con 30 gL<sup>-1</sup> de sacarosa, 7 gL<sup>-1</sup> de agar y pH 5,8.
- Semillas estériles de tomate de árbol
- Cámara de flujo laminar LABCONCO®

### **5.1.4 Subcultivo *in vitro* de plantas de tomate de árbol**

- Plantas de tomate de árbol germinadas *in vitro*
- Medio MS (Murashige & Skoog,1962) con 30 gL<sup>-1</sup> de sacarosa, 7 gL<sup>-1</sup> de agar y pH 5,8.
- Cajas Petri autoclavadas
- Cámara de flujo laminar LABCONCO®

## **5.2 EXPERIMENTOS PARA LA REGENERACIÓN DE BROTES A PARTIR DE EXPLANTES DE TOMATE DE ÁRBOL**

- Hojas de plantas de tomate de árbol *in vitro* de 6 semanas de edad aproximadamente
- Medio MS (Murashige & Skoog,1962) con 30 gL<sup>-1</sup> de sacarosa, 7 gL<sup>-1</sup> de agar y pH 5,8.
- Ácido naftalenoacético ANA 0.05 ppm SIGMA
- Benzilaminopurina BAP 4 ppm SIGMA
- Cámara de flujo laminar LABCONCO®

### **5.3 EXPERIMENTOS PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE KANAMICINA PARA LA REGENERACIÓN DE BROTES EN TOMATE DE ÁRBOL.**

- Cotiledones de plantas de tomate de árbol de 4 semanas de edad
- Hojas de plantas de tomate de árbol de 6 semanas de edad
- Medio MS (Murashige & Skoog,1962) con 30 gL<sup>-1</sup> de sacarosa, 7 gL<sup>-1</sup> de agar y pH 5,8.
- Ácido naftalenoacético ANA 0.05 ppm SIGMA
- Benzilaminopurina BAP 4 ppm SIGMA
- Kanamicina 0 mgL<sup>-1</sup>, 25 mgL<sup>-1</sup>, 50 mgL<sup>-1</sup>, 75 mgL<sup>-1</sup>, 100 mgL<sup>-1</sup> GIBCO
- Cámara de flujo laminar LABCONCO®
- Minitab 17
- IBM SPSS Statistics.

### **5.4 VERIFICACIÓN DE GFP EN VECTORES PGWB402 Y PGWB402Ω**

#### **5.4.1 Cepas bacterianas**

- Cepa *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 con el plásmido pGWB402
- Cepa *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 con el plásmido pGWB402Ω

#### **5.4.2 Medios de cultivo para *Agrobacterium tumefaciens* EHA105**

- Medio LB *Invitrogen*
- Rifampicina 25 mgL<sup>-1</sup> MK
- Tetraciclina 5 mgL<sup>-1</sup> GENFAR

- Estreptomicina 40 mgL<sup>-1</sup> SIGMA
- Bacto™ Agar Becton, *Dickinson and Company*.

### **5.4.3 Extracción de ADN de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105**

- Alícuotas de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 con el plásmido pGWB402
- Alícuotas de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 con el plásmido pGWB402 Ω
- Ultra congeladora *Revco UxF ThermoScientific*
- Medio LB + Rifampicina 25 mgL<sup>-1</sup> + Tetraciclina 5 mgL<sup>-1</sup> + Estreptomicina 40 mgL<sup>-1</sup>
- Incubadora Memmert
- UltraPureDestilated Water Invitrogen
- Tubos Eppendorf de 1,5 mL autoclavados
- MultiBlock Heater ThermoScientific
- Termómetro
- NanoDrop 2000 Spectrophotometer ThermoScientific
- Software NanoDrop 2000 /2000c ThermoScientific

### **5.4.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

- dNTPs 10 mM *Invitrogen*
- Buffer 10 X *Invitrogen*
- MgCl<sub>2</sub> 50 mM *Invitrogen*
- Taq DNA polimerasa 1U *Invitrogen*
- UltraPureDestilated Water Invitrogen

- Primer GFP Forward CACCATGGTGAGCAAGGGGGAGGAG
- Primer GFP Reverse TTA CTTGTACAGCTCGTCCATGCC
- T100 ThermalCycler BIORAD

#### **5.4.5 Electroforesis en gel de agarosa**

- Agarosa UltraPure™ Invitrogen
- Balanza Scout Ohaus®
- TBE 1X (Tris base ácido bórico – EDTA)
- SYBR Safe DNA gel Stain *Invitrogen*
- Blue Juice 10x Loading Buffer *Invitrogen*
- Ladder DNA 100pb *Invitrogen*
- Cámara de electroforesis Enduro Gel XL *Labnet International*
- Fotodocumentador Gel DOC™ XR BIORAD
- Software ImageLab 5.0 BIORAD

### **5.5 AGROINFILTRACIÓN EN TABACO**

#### **5.5.1 Material vegetal**

- Plantas de tabaco de la marca comercial *Seeds Garden* de la variedad *Virginia*.

#### **5.5.2 Germinación de semillas de tabaco**

- Semillas de tabaco variedad *Virginia*
- Sustrato “*Tierra Milagrosa*”

- Fibra de coco
- Semillero (Bandeja de germinación) de 128 alveolos.

### 5.5.3 Agroinfiltración en plantas de tabaco *Nicotiana tabacum*

- Plantas de tabaco de la variedad Virginia de 12 semanas de edad
- Alícuotas en glicerol al 60% de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 con el plásmido pGWB402 a -80 °C
- Alícuotas en glicerol al 60% de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 con el plásmido pGWB402Ω a – 80 °C
- Medio LB + Rifampicina 25 mgL<sup>-1</sup> + Tetraciclina 5 mgL<sup>-1</sup> + Estreptomicina 40 mgL<sup>-1</sup>
- Bacto™ Agar *Becton, Dickinson and Company*.
- Incubadora Memmert
- Medio LB + Rifampicina 25 mgL<sup>-1</sup> + Tetraciclina 5 mgL<sup>-1</sup> + Estreptomicina 40 mgL<sup>-1</sup> + acetosiringona 20 uM
- MaxQ 4000 Shaker *Thermo Fisher Scientific*
- Centrifuga CentraMP4 IEC *International Equipment Company*
- Espectrofotómetro Genesys 30 Visible
- Medio MES 10mM (pH 5,6) + acetosiringona 100uM + Agrex-F diluido (1 mL Agrex-F / 1 L de Agua Destilada)
- Jeringas estériles de 1 mL
- Cuarto oscuro
- DMSO Dimetilsulóxido Iglesia Genesis II

- Standard Class Microscope Slides Citoplus
- CoverGlass GoldLab
- Cámara Canon Rebel T2I
- Slee mtc cryostat
- Microscopio de fluorescencia confocal Olympus BX61WI

## **6. METODOLOGÍA**

### **6.1 CULTIVO *IN VITRO* DE TOMATE DE ÁRBOL**

#### **6.1.1 Material vegetal**

Se tomaron frutos de tomate de árbol maduros obtenidos del árbol de la plaza del Maxwell, en la Universidad San Francisco de Quito. Se cortaron los frutos y se extrajo las semillas. Estas semillas, se lavaron en agua potable durante 20 minutos y se dejaron secar en papel toalla absorbente durante 48 horas.

De igual forma, los frutos provenientes del Supermaxi fueron cortados y se extrajeron las semillas. Estas fueron lavadas en agua potable durante 20 minutos y se dejaron secar en papel toalla absorbente durante 48 horas.

#### **6.1.2 Esterilización de semillas de tomate de árbol**

Las semillas secas de tomate de árbol se colocaron en un vaso de precipitación de 500mL que contenía alcohol al 70% por 5 minutos. Posteriormente, se descartó el alcohol y se lavaron las semillas en agua destilada estéril. En el mismo vaso se colocó 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. Por último, las semillas fueron lavadas 5 veces con agua destilada estéril hasta eliminar completamente el hipoclorito de sodio al 2.5% y tween 20.

### **6.1.3 Germinación *in vitro* de semillas de tomate de árbol**

Se colocó 10 semillas por frasco en frascos de vidrio estériles con el medio MS previamente autoclavado, y se esperó 4-6 semanas a que germinen. Los frascos estuvieron con un fotoperiodo controlado de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.

### **6.1.4 Subcultivos *in vitro* de plantas de tomate de árbol**

Una vez germinadas las semillas, las plántulas fueron subcultivadas a medio MS cada 4 semanas para su posterior uso en los experimentos de regeneración de brotes y determinación de concentración mínima inhibitoria de kanamicina.

## **6.2 EXPERIMENTOS PARA LA REGENERACIÓN DE BROTES A PARTIR DE EXPLANTES DE TOMATE DE ÁRBOL**

Se hizo tres experimentos de regeneración de brotes a partir de hojas de tomate de árbol. Los tres experimentos fueron iguales y no se cambió ninguna variable. Cada experimento tuvo 40 explantes de hojas de tomate de árbol cultivado *in vitro* de aproximadamente 6 semanas de edad. Las hojas se cortaron en pedazos de 5 mm<sup>2</sup> en cámaras de flujo laminar y se colocó 5 explantes en cajas Petri que contenían el medio MS + 0.05ppm

ANA + 4ppm BAP. Las condiciones de crecimiento fueron un sistema de fotoperiodo con 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad y temperatura ambiente. Los subcultivos se realizaron cada 4 semanas. Se tomaron los datos durante 12 semanas en las que se vio formación de callos y brotes.

### **6.3 EXPERIMENTOS PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE KANAMICINA PARA LA REGENERACIÓN DE BROTES EN TOMATE DE ÁRBOL.**

#### **6.3.1 Hojas**

Una vez que se vio el crecimiento de callos y regeneración de brotes a partir de explantes de hojas de tomate de árbol (6.2) se hizo un experimento para determinar la concentración de agente selectivo (kanamicina) que inhibe el crecimiento de callo. Para ello se usó hojas de tomates de árbol *in vitro* de 6 semanas en explantes de 5 mm<sup>2</sup>. En total se obtuvo 90 explantes y se colocó 5 explantes por caja. Se colocó 10 explantes en cajas Petri que contenían medio MS+ANA 0.05ppm + BAP 4ppm sin kanamicina como control. Se colocó 20 explantes en cajas Petri que contenían medio MS + 0.05 ppm ANA + 4 ppm BAP + 25 mgL<sup>-1</sup> KAN. Otros 20 explantes se colocaron en cajas Petri que contenían medio MS + 0.05 ppm ANA + 4 ppm BAP + 50 mgL<sup>-1</sup> KAN. Otros 20 explantes se colocaron en cajas Petri que contenían medio MS + 0.05 ppm ANA + 4 ppm BAP + 75mgL<sup>-1</sup> KAN. Por último, se colocó 20 explantes en cajas Petri que contenían medio MS + 0.05 ppm ANA + 4 ppm BAP + 100 mgL<sup>-1</sup> KAN.

### 6.3.2 Cotiledones

Se repitió el experimento 6.3.1 utilizando cotiledones de tomate de árbol como fuente de explantes. Se quería comprobar si hay diferencia entre cotiledones y hojas para la regeneración de tomate de árbol en condiciones *in vitro*.

Para ello se utilizó 90 cotiledones que se cortaron en cuadrados de 4 mm<sup>2</sup> y se distribuyeron 5 cotiledones por caja. Se colocó 10 explantes en cajas Petri con medio MS + 0.05 ppm ANA + 4 ppm BAP sin kanamicina como control. El resto se dividió en 20 explantes para cada concentración de kanamicina en medio MS + 0.05 ppm ANA + 4 ppm BAP + KAN en 25 mgL<sup>-1</sup>, 50 mgL<sup>-1</sup>, 75 mgL<sup>-1</sup> y 100 mgL<sup>-1</sup> respectivamente.

### 6.3.3 Tamaño del Explante

Se realizó un experimento factorial 2x5 para analizar cómo influye el tamaño del explante y la concentración de kanamicina en la calogénesis y regeneración de brotes a partir de hojas de tomate de árbol. Se diseñó el experimento con repeticiones y réplicas para que tenga validez estadística. Por ello, cada caja Petri contuvo 10 explantes y 3 cajas Petri representaron 1 corrida. El experimento inicial fue de 10 corridas (2 factores x 5 niveles) y se hicieron dos réplicas por lo que fueron un total de 30 corridas. Cada corrida tenía 3 cajas por lo que fueron 90 cajas Petri. Cada caja contenía 10 explantes por lo que se utilizaron 900 explantes de hoja de tomate de árbol de 6 semanas de edad para este experimento.

Se dibujó un cuadrado de 1 cm<sup>2</sup> como guía del tamaño grande, y de 0.5 cm<sup>2</sup> como guía del tamaño pequeño en una hoja. La misma que se colocó en la cámara de flujo laminar debajo

de la caja Petri para cortar los explantes de hoja. Para el factor concentración de kanamicina, se utilizaron 5 niveles  $0\text{mgL}^{-1}$ ,  $25\text{mgL}^{-1}$ ,  $50\text{mgL}^{-1}$ ,  $75\text{mgL}^{-1}$  y  $100\text{mgL}^{-1}$  suplementados en el medio MS + 0.05 ppm ANA + 4 ppm BAP. Una vez que se aleatorio las corridas con Excel, se cortó los explantes y se colocó en la caja correspondiente. Los explantes estuvieron expuestos a un fotoperiodo controlado de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad en temperatura ambiente. Los explantes fueron subcultivados cada 4 semanas periódicamente. Se tomó los datos de calogénesis a las 4 semanas y los datos de regeneración de brotes hasta las 12 semanas de iniciado el ensayo. Los datos obtenidos se analizaron posteriormente con los softwares estadísticos Minitab 17 y IBM SPSS Statistics.

## **6.4 VERIFICACIÓN DE GFP EN VECTORES PGWB402 Y PGWB402Ω**

### **6.4.1 Cepas bacterianas**

Por todas las ventajas antes mencionadas en la introducción, se usó la tecnología Gateway como nuevo sistema de clonación en dos vectores binarios para plantas, facilitando así futuros experimentos transgénicos en biotecnología vegetal. Esto se realizó previo a este trabajo por Andrea Argudo en convenio con la Universidad UC Davis, en California-Estados Unidos. Los dos vectores binarios construidos por la tecnología Gateway (pGWB) contienen resistencia a la espectinomicina para selección bacteriana, y el gen NPTII de kanamicina para selección de las plantas (Ver Tabla 1) (Nakagawa et al, 2009). Estos dos vectores binarios fueron usados en este trabajo y su estructura completa esta descrita basándonos en los resultados publicados por Nakagawa et al (2007) en la Tabla 1. Cada vector binario Gateway se insertó en una bacteria de la cepa *Agrobacterium tumefaciens* EHA105. Por ello, antes de

realizar la agroinfiltración se hizo un PCR comprobatorio para observar el gen GFP de los plásmidos pGWB402 y pGWB402Ω.

#### **6.4.2 Crecimiento de *Agrobacterium tumefaciens***

Se sembró *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 pGWB402 y *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 pGWB402Ω en el medio LB líquido + 25 mgL<sup>-1</sup> rifampicina + 5 mgL<sup>-1</sup> tetraciclina + 40 mgL<sup>-1</sup> estreptomicina. Posteriormente, se incubó los tubos falcons a 28°C durante 24 horas con agitación constante de 180 rpm. Luego se sembró por agotamiento en medio LB sólido + 25 mgL<sup>-1</sup> rifampicina + 5 mgL<sup>-1</sup> tetraciclina + 40 mgL<sup>-1</sup> estreptomicina a partir de los medios líquidos y se incubó durante 48 horas a 28°C.

#### **6.4.3 Extracción de ADN de *Agrobacterium tumefaciens***

Se colocó 100uL de agua de PCR en 12 tubos eppendorf previamente esterilizados. Se seleccionó con palillos estériles 6 colonias de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 pGWB402 y 6 colonias de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 pGWB402Ω. Se disolvió en el agua de un tubo eppendorf por cada colonia de bacteria y se colocó los tubos eppendorf en la cámara de arena a 100°C por 30 minutos. Posteriormente, se cuantificó el contenido de los tubos antes mencionados al colocar 2 uL en el NanoDrop para analizar su concentración y calidad. Se usó 2 uL de cada tubo como ADN para el PCR.

#### **6.4.4 PCR de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 pGWB402 y pGWB402Ω para el gen GFP**

Se realizó la amplificación de 6 colonias de *Agrobacterium tumefaciens* pGWB402 y 5 colonias de *Agrobacterium tumefaciens* pGWB402Ω por PCR utilizando 1 par de primers de GFP descritos en la sección 5.4.5. En cada reacción se utilizó un volumen total de 20 uL que contenían 2 uL de ADN, Buffer de PCR 1X (Invitrogen, California, USA), 2 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen, California, USA), 0.4 uM de dNTPs, 0.5 mM de cada primer y 1 unidad de Taq polimerasa (Invitrogen, California, USA). Se amplificó el ADN en 35 ciclos, utilizando el termociclador T100 (BioRad, California, USA) programado para 15 segundos de desnaturalización a 94 °C, 30 segundos de annealing a 57 °C y 45 segundos de extensión a 68°C.

#### **6.4.5 Electroforesis en gel de agarosa**

Para comprobar la presencia del GFP en las muestras de *Agrobacterium tumefaciens* pGWB402 y *Agrobacterium tumefaciens* pGWB402Ω, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % colocando 5 uL de producto de PCR junto con 3 uL de Blue Juice 10X (Invitrogen, California, USA) y 1 uL de ladder de 100 pb en el pocillo correspondiente. Se corrió el gel por 1 hora a 80 voltios.

### **6.5 AGROINFILTRACIÓN EN TABACO**

#### **6.5.1 Material Vegetal**

Se obtuvo las semillas de tabaco de la casa comercial *Magic Garden Seeds* de la variedad Virginia.

### **6.5.2 Germinación de semillas de tabaco**

Se colocó en un semillero de 128 alvéolos una mezcla de  $\frac{3}{4}$  tierra milagrosa +  $\frac{1}{4}$  de fibra de coco. Las semillas se colocaron superficialmente en el semillero y se cubrió con plástico durante una semana para mantener la humedad. Se les colocó agua cada dos días por el plato del semillero. El semillero radicó en el cuarto de cultivo in vitro que tiene un fotoperíodo controlado de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad y temperatura ambiente. Las semillas germinaron en 7 días y se retiró el plástico. A las 4 semanas se transfirió las plantas a macetas individuales a manteniendo el agua cada dos días, el fotoperíodo y la temperatura ambiente.

### **6.5.3 Agroinfiltración en Tabaco *Nicotiana tabacum***

Para la agroinfiltración se sembró *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 pGWB402 y pGB402 $\Omega$  a partir de las alícuotas A2 (pGWB402) y D2 (pGWB402  $\Omega$ ) en cajas Petri que contenían LB sólido + 25 mgL<sup>-1</sup> rifampicina + 5 mgL<sup>-1</sup> tetraciclina + 40 mgL<sup>-1</sup> estreptomina en la cámara de flujo laminar. Las cajas se incubaron a 28°C durante 48 horas. Posteriormente, se hizo un hisopado de la bacteria y se colocó en 5 mL de LB líquido + rifampicina 25 mgL<sup>-1</sup> + tetraciclina 5 mgL<sup>-1</sup> + estreptomina 40 mgL<sup>-1</sup> + acetosiringona 20 $\mu$ M y se dejó en el shaker a 28°C y 180 rpm durante 12 horas. Se usó 1 mL del cultivo incubado en agitación por cada cepa y se añadió en 24 mL de LB líquido + rifampicina 25mgL<sup>-1</sup> + tetraciclina 5mgL<sup>-1</sup> + estreptomina 40mgL<sup>-1</sup> en tubos Falcons estériles de 50 mL. Se calibró el espectrofotómetro

Genesys 30 Visible mediante absorbancia a 600nm con un blanco que contenía medio LB líquido + 25 mgL<sup>-1</sup> rifampicina + 5 mgL<sup>-1</sup> tetraciclina + 40 mgL<sup>-1</sup> estreptomicina y se midió la densidad óptica de las dos muestras. Se ajustó la OD<sub>600</sub> a 0,8. Se centrifugó a 5000 rpm durante 15 minutos para precipitar las bacterias. Se resuspendió los pellets en 10 mL de MES (pH 5.6) + 14 mL de agua destilada estéril + acetosiringona 100 uM + 1 mL de agrex-F diluido (1mL / 1L de agua). Se mantuvo a temperatura ambiente durante 3 horas y se midió nuevamente la densidad óptica en el espectrofotómetro Genesys 30 Visible. Se roció las plantas de tabaco con el espray rociador que contenía agrex-F diluido en la proporción 1 mL de agrex-F diluido para permeabilizar y humectar las hojas. Se esperó 30 minutos y se infiltró 1 mL de solución en el envés por cada hoja de tabaco con jeringas de 1 mL sin ajuga. Se mantuvo las plantas en oscuridad durante 5 días.

Se tomó fotos de las plantas en luz visible con la cámara Canon Rebel Ti2 desde el día cero hasta el día tres, de igual forma se tomó fotos desde el día cero hasta el día tres de las hojas en luz UV. Al quinto día se hizo cortes en el micrótopo de 2 μ de una hoja control y de una hoja agroinfiltrada con *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 pGWB402 Ω y se colocó en un portaobjetos. Las muestras se observaron en el microscopio Olympus BX61WIF con filtro para GFP con una amplificación de 10X.

## **7. RESULTADOS**

### **7.1 EXPERIMENTOS PARA LA REGENERACIÓN DE BROTES A PARTIR DE EXPLANTES DE TOMATE DE ÁRBOL**

El laboratorio de biotecnología vegetal de la USFQ ha tenido experiencia previa en el cultivo *in vitro* de tomate de árbol por lo que se comprobó mediante tres experimentos sin cambiar ninguna variable, que el medio MS (Murashige & Skooge) suplementado con 0.05 ppm ANA y 4 ppm de BAP promueve la callogénesis y regeneración de brotes en explantes de tomate de árbol.

En estos tres experimentos las variables mediadas fueron la formación de callo a las 4 semanas, y el número de brotes por explante hasta las 12 semanas de iniciado cada ensayo. Se replicó el experimento dos veces para verificar los resultados. Se ve en la **Tabla 2** que la tasa de callogénesis se mantuvo para los 3 experimentos, al 100% lo que indica que el medio suplementado con 0.05ppm ANA + 4ppm de BAP promueve la callogénesis exitosamente en explantes de tomate de árbol. Por otra parte, la tasa de formación de brotes no se mantuvo en los 3 experimentos, ya que en el primer experimento se obtuvo un 23 %, en el segundo un 45 % y en el tercero un 25 %. Dando como promedio global una tasa de formación de brotes de 31 % +- 12.17 %.

## **7.2 EXPERIMENTOS PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE KANAMICINA PARA LA REGENERACIÓN DE BROTES EN TOMATE DE ÁRBOL.**

### **7.2.1 Hojas**

Se analizó el efecto en la callogénesis y regeneración de brotes a partir de explantes de hoja de tomate de árbol en presencia y ausencia de kanamicina. Se utilizó el medio MS + 0.05 ppm ANA + 4 ppm BAP 4 + Kanamicina en diferentes concentraciones. Se usó 0 mgL<sup>-1</sup>, 25

mgL<sup>-1</sup>, 50 mgL<sup>-1</sup>, 75 mgL<sup>-1</sup> y 100 mgL<sup>-1</sup> de kanamicina para este ensayo. Las variables mediadas fueron la callogénesis a las 4 semanas, y el número de brotes por explante hasta las 12 semanas de iniciado cada ensayo.

Se observó a partir de la **Tabla 3** que los explantes sin kanamicina, así como los explantes suplementados con 25mgL<sup>-1</sup> tienen tasas de 100 % para callogénesis. Por otro lado, la tasa de regeneración de brotes de los explantes sin kanamicina es 15% más alta que los explantes en 25 mgL<sup>-1</sup> de Kan. Los explantes expuestos a concentraciones a partir de 50 mgL<sup>-1</sup> y superior no formaron callo ni regeneraron brotes.

### 7.2.2 Cotiledones

Se analizó el efecto en la callogénesis y regeneración de brotes a partir de explantes de cotiledones de tomate de árbol en presencia y ausencia de kanamicina. Se utilizó el medio MS + 0.05 ppm ANA + 4 ppm BAP 4 + Kanamicina en diferentes concentraciones. Se usó nuevamente 0 mgL<sup>-1</sup>, 25 mgL<sup>-1</sup>, 50 mgL<sup>-1</sup>, 75 mgL<sup>-1</sup> y 100 mgL<sup>-1</sup> de kanamicina para este experimento. Las variables mediadas fueron la callogénesis a las 4 semanas, y el número de brotes por explante hasta las 12 semanas de iniciado cada ensayo.

La **Tabla 4** indicó que un 100% en las tasas de callogénesis utilizando cotiledones como explantes en ausencia de kanamicina, y en MS + 0.05 ppm ANA + 4 ppm BAP 4 + 25 mgL<sup>-1</sup> Kanamicina. Mientras que los explantes expuestos a 50 mgL<sup>-1</sup>, 75 mgL<sup>-1</sup> y 100 mgL<sup>-1</sup> de kanamicina no formaron callo a las 4 semanas.

En cuanto a las tasas de regeneración de brotes, los explantes en ausencia de kanamicina sorprendentemente no regeneraron brotes mientras que los explantes expuestos a 25 mgL<sup>-1</sup> Kanamicina sí regeneraron brotes en un 20%. En los explantes expuestos a 50 mgL<sup>-1</sup>, 75 mgL<sup>-1</sup> y 100 mgL<sup>-1</sup> de kanamicina no hubo regeneración de brotes.

### 7.2.3 Tamaño del explante

Se realizó un experimento factorial 2X5, en donde los factores a analizar fueron el tamaño de la hoja teniendo dos niveles: pequeño es de 0.5 cm<sup>2</sup> y grande es de 1 cm<sup>2</sup>; y la concentración del marcador de selección kanamicina que tuvo cinco niveles: 0 mgL<sup>-1</sup>, 25 mgL<sup>-1</sup>, 50 mgL<sup>-1</sup>, 75 mgL<sup>-1</sup> y 100 mgL<sup>-1</sup>.

La **Tabla 5** indica que la callogénesis en explantes pequeños (0.5 cm<sup>2</sup>) y grandes (1 cm<sup>2</sup>) en ausencia de kanamicina tienen tasas altas de 99% y 100% respectivamente. De igual forma, los explantes pequeños (0.5 cm<sup>2</sup>) y grandes (1 cm<sup>2</sup>) en concentración de 25 mgL<sup>-1</sup> tienen tasas de 29% y 22% respectivamente. En las concentraciones de kanamicina de 50 mgL<sup>-1</sup>, 75 mgL<sup>-1</sup> y 100 mgL<sup>-1</sup> no hubo formación de callo para ningún tipo de explante.

## 7.3 VERIFICACIÓN DE GFP EN VECTORES PGWB402 Y PGWB402Ω

Se realizó un PCR comprobatorio para visualizar que los plásmidos binarios pGWB402 y pGWB402Ω en *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 efectivamente tengan en el gen reportero GFP. Se observó mediante el gel de agarosa la banda esperada de

aproximadamente 750 pb en todas las muestras, así como en el control positivo que contenía el plásmido pGWB402 (**Figura 1**). Por lo que todas las colonias de las bacterias contienen el gen reportero GFP.

#### 7.4 AGROINFILTRACIÓN EN TABACO

En el último experimento se realizó una agroinfiltración en hojas de tabaco para ver la expresión del GFP en plantas. La **Figura 2** indicó que la infiltración con *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 pGWB402 y *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 pGWB402  $\Omega$  fue exitosa ya que se observa zonas verdosas en las hojas de tabaco con luz UV. A partir del tercer día se observó la expresión de la proteína del GFP en luz UV de forma macroscópica. Por lo tanto, se realizó cortes de una hoja control y una hoja agroinfiltrada con *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 pGWB402 $\Omega$  al quinto día para visualizar microscópicamente (**Figura 3**).

### 8. DISCUSIÓN

El tomate de árbol es un frutal de importancia comercial en los países andinos, donde se consume su fruta fresca y procesada (Chacón et al, 2013). Tradicionalmente se propaga por semillas y estacas, pero enfrenta problemas de heterogeneidad y calidad (Chacón et al, 2013; Lobo, 2001). Una alternativa a la propagación convencional, así como a sus limitantes, es la utilización de protocolos de cultivo in vitro, que permiten multiplicar de forma rápida y rentable material élite en cualquier época del año (Chacón et al, 2013). Aspectos como la calidad del explante, el protocolo de desinfección, la asepsia, el medio de cultivo utilizado y las condiciones de crecimiento son fundamentales para el desarrollo exitoso de esta técnica

(Calva y Pérez, 2005). Todos estos factores, en conjunto, permiten la reproducción de plantas completas logrando tener material axénico, viable y vigoroso para una adecuada manipulación (Correia et al, 2011; Chacón et al, 2013).

El cultivo in vitro en tomate de árbol ha sido reportado por Contreras y Almeida (2003) quienes cultivaron cotiledones e hipocótilos de semillas de tomate de árbol germinadas en medio Murashige & Skoog (1962) suplementado con BAP (2,0; 3,5 y 5,0 mg/L) más AIA (ácido indol 3-acéito) (0,5; 0,75; 1,0 mg/L) como inductores de morfogénesis y en dos meses obtuvieron organogénesis de yemas que fueron pasadas a MS sin reguladores de crecimiento. Apraez et al (2012) regeneraron plantas de tomate de árbol utilizando MS + 5mg/L de 2,4 D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) a partir de callos. Guimarães et al (1996) obtuvieron plántulas de tomate de árbol in vitro por organogénesis utilizando como explantes iniciales hipocótilos y cotiledones de tomate de árbol en presencia de ANA y AIB (ácido indol butírico). Sin embargo, el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ ha tenido experiencia previa en el cultivo in vitro de tomate de árbol, por lo que basado en los resultados de Arias (2007) y Borrero (2007) se utilizaron tres protocolos. El primer protocolo para la desinfección de semillas de tomate de árbol descrito en la sección 6.1.2, el segundo protocolo para la germinación de semillas descrito en la sección 6.1.3; y el tercer protocolo para la formación de callo y regeneración de brotes a partir de explantes de tomate de árbol fue probado en los experimentos 1, 2 y 3. Se verificó que los tres protocolos son exitosos ya que no hubo contaminación en la germinación de semillas, que se dio de 4 a 6 semanas, dando como resultado plantas viables y de muy buen aspecto. Así mismo, se logró formar callo a partir de hojas y cotiledones de tomate de árbol en el medio MS + 0.05 ppm ANA + 4 ppm BAP y también se obtuvo regeneración de brotes a partir de hojas de tomate de árbol.

Por ello se puede afirmar que los reguladores de crecimiento ANA (Ácido naftalenoacético) y BAP (Benzilaminopurina) indujeron la callogénesis in vitro en explantes de hojas y cotiledones a las 4 semanas en las concentraciones de 0.05 ppm de ANA y 4 ppm de BAP suplementadas al medio MS (Murashige y Skoog, 1962) bajo un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a temperatura ambiente. Los callos generados tanto en las hojas, como en los cotiledones se originaron principalmente en los bordes (sitios de corte). En los callos formados a partir de hojas, al alcanzar aproximadamente el 75 % de superficie foliar se empezó a regenerar brotes. En los tres primeros experimentos (**Tabla 2**), se replicó un experimento de regeneración de hojas de tomate de árbol in vitro sin cambiar ninguna variable debido a limitaciones del proyecto. Las tasas de regeneración de brotes difieren entre sí principalmente por el experimento 2 que tiene una tasa más elevada de 45 %, en comparación con el experimento 1 que tiene 23 % y con el experimento 3 que tiene 25 %. Esto se debe, a que el experimento 2 se realizó con hojas más jóvenes. La edad del tejido influye en la capacidad regenerativa, por lo que hojas más jóvenes tienen una capacidad regenerativa superior.

Una vez que se verificó el protocolo de inducción de callos y regeneración de brotes, se estandarizó el protocolo de cultivo in vitro que inhibe la callogénesis en hojas de tomate de árbol con el fin de poder usarlo en futuras aplicaciones de transformación genética para la selección de explantes potencialmente transformados. En el experimento 4, se evaluó durante 12 semanas, la respuesta de explantes de hojas de tomate de árbol en presencia de kanamicina en diferentes concentraciones (0 mgL<sup>-1</sup>, 25 mgL<sup>-1</sup>, 50 mgL<sup>-1</sup>, 75 mgL<sup>-1</sup> y 100 mgL<sup>-1</sup>) para determinar el nivel adecuado para la selección de futuras células vegetales

transgénicas dentro del tejido del explante no transgénico. Se observó a través de la tasa de callogénesis que 25 mgL<sup>-1</sup> no inhibe a la formación de callo en explantes de hoja de tomate de árbol (**Tabla 3**), ya que se obtuvo una tasa de 100 % al igual que en la concentración control de 0mgL<sup>-1</sup>. A partir de la concentración de 50 mgL<sup>-1</sup> de kanamicina, los explantes no formaron callo a las 4 semanas, por lo que 50 mgL<sup>-1</sup>, 75mgL<sup>-1</sup> y 100 mgL<sup>-1</sup> de kanamicina suplementados en el medio de regeneración inhiben la callogénesis a partir de explantes de hoja de tomate de árbol. Por otra parte, para la regeneración de brotes en (**Tabla 3**) se vio que la concentración de 25 mgL<sup>-1</sup> de kanamicina es suficiente para influir en la tasa de regeneración de brotes reduciendo un 15 % al comparar con el control 0 mgL<sup>-1</sup>. En este experimento si hubo regeneración de brotes a partir de callos en las concentraciones de 0 mgL<sup>-1</sup> de kanamicina y de 25 mgL<sup>-1</sup> de kanamicina. No hubo formación de callo ni regeneración de brotes en las concentraciones de 50 mgL<sup>-1</sup>, 75 mgL<sup>-1</sup> y 100 mgL<sup>-1</sup> de kanamicina. Esto se puede atribuir al efecto fitotóxico que provoca del antibiótico, ya que a partir de 50 mgL<sup>-1</sup>, los explantes se pusieron de color verde pálido o marrón y dejaron de crecer. Estos resultados sugieren que la concentración de 50 mgL<sup>-1</sup> de kanamicina sería efectiva para la selección de transformantes en futuros experimentos de transformación en hojas de tomate de árbol. Sin embargo, se recomienda usar más de 50 mgL<sup>-1</sup> debido a que la regeneración del tomate de árbol se logra fácilmente, por lo que para asegurar la selección de transformantes la concentración del agente selectivo debe ser superior.

El experimento 5 (**Tabla 4**) tuvo las mismas condiciones que el experimento 4, con el único cambio el tipo de explante. El experimento 4 se hizo con hojas, y el experimento 5 se hizo con cotiledones. El objetivo del experimento es evaluar la sensibilidad del antibiótico para la callogénesis y regeneración de brotes a partir de explantes cotiledóneos de tomate de árbol, ya que usualmente en los protocolos de transformación genética se usa hipocótilos y

cotiledones como material vegetal de partida. Nuevamente se observa que la tasa de calogénesis no se ve afectada en  $25 \text{ mgL}^{-1}$  de kanamicina suplementada al medio de regeneración porque se obtuvo un 100 % de callos al igual que en el control de  $0 \text{ mgL}^{-1}$  de kanamicina. A partir de  $50 \text{ mgL}^{-1}$  de kanamicina los explantes no forman callo a las 4 semanas, por lo que  $50 \text{ mgL}^{-1}$ ,  $75 \text{ mgL}^{-1}$  y  $100 \text{ mgL}^{-1}$  de kanamicina inhiben la calogénesis en hojas y cotiledones de tomate de árbol.

En cuanto a la regeneración de brotes los explantes control ( $0 \text{ mgL}^{-1}$  de kanamicina) no formaron brotes mientras que los explantes expuestos a  $25 \text{ mgL}^{-1}$  de kanamicina sí. Esto es un resultado inesperado, ya que previamente los controles siempre habían dado brotes hasta las 12 semanas de iniciados los ensayos. Los explantes control presentaron raíces, por lo que hubo organogénesis, pero no de brotes. Muchos investigadores relacionan el tipo de callo con la respuesta organogénica y embriogénica que se pueda presentar, y afirman que es altamente dependiente de la especie (Rodríguez et al, 2014). En consecuencia, el tipo de callo, así como el color es un indicador importante que considerar. Normalmente los callos que no tienen un color verde tienen una apariencia oxidada y se les conoce como callos fenólicos (Bandyopadhyaya et al., 1999; Ainsley et al., 2000). En la **figura 4** se puede observar el color de los callos control del experimento 5, que posiblemente son callos fenólicos. Esta característica podría explicar porque no hubo regeneración de brotes, pero sí de raíces en los callos control del experimento 5 (Smith 2012).

La producción de callo necesita de un explante inicial, el que puede tener una alta diferenciación en sus tejidos, como un trozo de raíz, tallo u hoja, o bien la utilización de tejidos menos diferenciados como los hipocótilos y cotiledones de plántulas recién germinadas

(Correia y Canhoto, 2010). En cualquier caso, la inducción de callo es un proceso de desdiferenciación y división celular que depende particularmente del explante, genotipo, medio de cultivo, tipo de regulador de crecimiento, así como su concentración y combinación. (Larson et al, 2006; Feeney et al, 2007). Al no ver diferencia entre hojas (experimento 4) y cotiledones (experimento 5) para la formación de callo, se concluye que la callogénesis debe atribuirse a otros factores que deben ser analizados. Por ello, en el experimento 6 se analizó una nueva variable: el efecto del tamaño del explante. La inducción de callo de los experimentos previos permitió evidenciar que el callo se forma inicialmente en los bordes de los explantes, donde hubo incisión con el bisturí. George, (2008) sugiere que los callos se forman a partir de las heridas como una reacción de defensa natural (George, 2008). Por estas razones, se consideró el tamaño como nuevo factor a analizar. La relación herida/superficie foliar en un explante de  $0.5 \text{ cm}^2$  es mayor a la de un explante de  $1 \text{ cm}^2$ , por ello se definió dos niveles para el factor tamaño, siendo pequeño  $0.5 \text{ cm}^2$  y grande  $1 \text{ cm}^2$ . Además de esto, se siguió analizando la concentración mínima inhibitoria para la callogénesis y regeneración de brotes con las 5 diferentes concentraciones de kanamicina ( $0 \text{ mgL}^{-1}$ ,  $25 \text{ mgL}^{-1}$ ,  $50 \text{ mgL}^{-1}$ ,  $75 \text{ mgL}^{-1}$  y  $100 \text{ mgL}^{-1}$ ) suplementadas en el medio de regeneración.

El experimento 6 se considera un diseño experimental factorial  $2 \times 5$ , donde los factores son: tamaño de explante y concentración de kanamicina. El diseño factorial  $2 \times 5$  más sencillo contiene 10 corridas, pero para que tenga mayor soporte estadístico se recomiendan hacer réplicas. En base a los recursos disponibles, se realizó el diseño factorial  $2 \times 5$  con dos réplicas. La **tabla 5** muestra los resultados del experimento 6, para callogénesis. Los explantes pequeños y grandes en  $0 \text{ mgL}^{-1}$  de kanamicina y  $25 \text{ mgL}^{-1}$  de kanamicina formaron callo a las 4 semanas. No obstante, es importante recalcar que los explantes pequeños ( $0.5 \text{ cm}^2$ )

formaron callo a partir de todo el explante mientras que los explantes grandes (1 cm<sup>2</sup>) formaron callo solo en el borde. A pesar de esta observación cualitativa, los análisis estadísticos (**Figura 5**) permiten afirmar con un 95% de confianza que no hay diferencia significativa para la formación de callo entre la distribución de datos obtenidos a partir de los explantes pequeño de 0.5 cm<sup>2</sup> vs la distribución de datos de los explantes grande de 1 cm<sup>2</sup>. Es decir, la diferencia en el tamaño del explante considerado para este experimento, no afecta a la formación de callo.

De igual manera, los análisis estadísticos (**Figura 6**) permiten afirmar con un 95% de confianza que existe diferencia significativa entre las cinco diferentes concentraciones de kanamicina suplementadas al medio de regeneración. Por ello, la tasa de formación de callo se ve directamente afectada por el factor concentración de kanamicina. Este resultado es lógico, puesto que las cinco concentraciones de kanamicina usadas en este trabajo son progresivas (0 mgL<sup>-1</sup>, 25mgL<sup>-1</sup>, 50 mgL<sup>-1</sup>, 75mgL<sup>-1</sup> y 100 mgL<sup>-1</sup>) y a medida que la concentración va aumentando, la tasa de formación de callo va disminuyendo. Por ello se reconfirma que a partir de 50 mgL<sup>-1</sup> de kanamicina se inhibe la formación de callo en explantes de tomate de árbol. Basado en estos resultados se determina que la concentración de kanamicina a usar como sistema de selección de futuros explantes transformados de tomate de árbol debe ser igual o superior a 50 mgL<sup>-1</sup> de kanamicina.

Por último, se realizó se realizó la agroinfiltración en hojas de tabaco para comprobar que *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 pGWB402 y *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 pGWB402Ω sean capaces de entrar en células vegetales y puedan expresar los genes contenidos en los plásmidos, siendo GFP el gen reportero. La agroinfiltración se ha convertido

en un método rápido, confiable y económico para la expresión génica transitoria (Bashandy et al., 2015). Este método se basa en el más antiguo sistema de transformación genética vegetal, *Agrobacterium tumefaciens*. La expresión se basa en un transgen sin la integración estable del mismo, por lo que su principal ventaja es que la proteína de interés se expresa en pocos días. (Gleba et al, 2005; Lacroix et al, 2013; Krenex et al, 2015). Esto permite el uso de plantas como biofabricas (molecular pharming) para la producción de proteínas recombinantes, por lo que es de gran interés para la industria farmacéutica, alimentaria, entre otras.

En este experimento se comprobó que la principal barrera para la penetración foliar, la cutícula de la hoja puede ser flanqueada mediante el surfactante tensoactivo Agrex-F. Los agroquímicos se usan porque solubilizan esta barrera natural y permiten el ingreso de la solución bacteriana para infiltrar (Valero, 2015). En este ensayo, se observó la expresión de la proteína GFP a los 3 días de la agroinfiltración en luz UV en hojas de tabaco (**Figura 2**). Adicionalmente al quinto día se hizo cortes de las hojas infiltradas de 2 micras en el micrótopo para poder observar microscópicamente la expresión del GFP en el microscopio de fluorescencia confocal (Figura 3). Demostrando así que los constructos de los plásmidos pGWB 402 y pGWB 402 $\Omega$  pueden ser utilizados para transformar células vegetales.

## 9. CONCLUSIONES

- Se concluye que el medio de regeneración MS + 0.05 ppm ANA + 4 ppm BAP induce a la formación de callo y regeneración de brotes a partir de plantas de tomate de árbol en *cultivo in vitro*

- La concentración mínima inhibitoria para seleccionar futuros explantes transformados de tomate de árbol debe ser igual o superior a  $50\text{mgL}^{-1}$  de kanamicina.
- El tamaño de los explantes de tomate de árbol analizados no influye en la formación de callo ni regeneración de brotes.
- *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 pGWB402 y pGWB402 $\Omega$  contienen el gen GFP, y pueden ser utilizados en experimentos de transformación genética.
- La agroinfiltración permitió comprobar la expresión del GFP, por lo que se verificó nuevamente la funcionalidad de los vectores binarios pGWB402 y pGWB402 $\Omega$  construidos con la tecnología Gateway.

## 10.RECOMENDACIONES

- Se recomienda hacer subcultivos más seguidos para obtener mejores tasas de regeneración de brotes y evitar la formación de callos fenólicos.
- Se recomienda realizar experimentos de transformación genética utilizando *Agrobacterium tumefaciens* y agroinfiltración en el tomate de árbol.

## 11.LITERATURA CITADA

- Ainsley P, G Collins, M Sedgley. (2000). Adventitious shoot regeneration from leaf explants of almond (*Prunus dulcis* Mill.). *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 36: 470-474.
- Albornoz, G. (1992) El tomate de árbol (*Cytophandra betacea* Sendt) en el Ecuador. Universidad Central Ecuador Fundagro, Quito, Ecuador.
- Apraez, J., J. Romo y T. Lagos. (2012). Regeneración de plantas de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.) mediante organogénesis inducida a partir de callos. *Rev. Cienc. Agric.* 29(2), 108-115.
- Arias, A. (2007). Transformación genética de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Universidad San Francisco de Quito.
- Atkinson, R., Candy, C., & Gardner, R. (1990). *Agrobacterium* infection of five New Zealand fruit crops. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 18, 153–155.
- Ávila, E. (2005) Manual de tomate de árbol. Cámara de comercio de Bogotá. Pp 1- 50.
- Balbás, P. y Lorence, A. (2004). *Gene Transfer and Expression in Plants*. Totowa: Human Press Inc.
- Bandyopadhyay S, C Karen, R Gillian, D John. (1999). Efficient plant regeneration from seedling explants of two commercially important temperate eucalypt species *Eucalyptus nitens* and *E. globulus*. *Plant Science* 140: 189-198.

- Bashandy, H., Jalkanen, S., & Teeri, T. H. (2015). Within leaf variation is the largest source of variation in agroinfiltration of *Nicotiana benthamiana*. *Plant Methods*, 11(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13007-015-0091-5>
- Bhat, R.; Srinivasan, S. (2002). Molecular and genetic analyses of transgenic plants: Considerations and approaches. *Plant Sci. (Holanda)*. 163:673-681.
- Binns, A. N. (2002). T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens*: 25 years and counting, 7(5), 231–233.
- Bohs, L. (1989). Ethnobotany of the Genus *Cyphomandra* (Solanaceae). *Economic Botany*, 43(2), 143–163.
- Borrero, E. (2007). Protocolo para la Regeneración de Plántulas a partir de Explantes de Hojas de Cinco Variedades Ecuatorianas de Tomate de Árbol (*Solanum betaceum*). Universidad San Francisco de Quito.
- Brasileiro, A. and Aragão, F. (2001). Marker genes for in vitro selection of transgenic plants. *Plant Biotechnology* 3 (3): 113-121.
- Bushman, W., Thompson, J. F., Vargas, L., and Landy, A. (1985). Control of Directionality in Lambda Site Specific Recombination. *Science* 230, 906-911.
- Calva, G. y J. Pérez. (2005). Cultivo de células y tejidos vegetales. *Rev. Digital Univ.* 6(11), 1-16.
- Calvo, I. (2009). Cultivo de tomate de árbol. Proyecto microcuenca Plantón, Pacayas (Vol. 8)
- Chacón, R., D. Mora, L. Marchena, A. Schmidt y C. Ulloa. (2013). Cultivo in vitro del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (Fenotipo naranja) proveniente de Costa Rica. *Rev. VI Encuentro Investig.* 6(4), 45-55.

- Chalfie, M., Y. Tu, G. Euskirchen, Ww. Ward, D. Prasher (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. 263 (5148): 802-805
- Chen Q, Lai H, Chen Q, Lai H. (2015). Gene Delivery into Plant Cells for Recombinant Protein Production, *Gene Delivery into Plant Cells for Recombinant Protein Production*. BioMed Res. Int. BioMed Res. Int. 2015, 2015:e932161
- Correia S, J Canhoto. (2010). Characterization of somatic embryo attached structures in Feijoa sellowiana Berg. (Myrtaceae). *Protoplasma* 242: 95-107. DOI: 10.1007/s00709-010-0130-z.
- Criollo, H., Insuasti, K., & Delgado, W. (2016). Regeneración in vitro de plántulas de tomate de árbol [*Solanum betaceum* (Cav.) Sendt.]. *Ciencias Agrícolas*, 10(2), 252–261.
- Danilova, S. (2007). The technologies for genetic transformation of Cereals. *Russian J. Plant Physiol.* 54(5):569-581.
- Diaz-Granados C., & Chaparro-Giraldo, A. (2011). Concentración mínima inhibitoria de Kanamicina para callos de cuatro variedades colombianas de arroz. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(2), 210–220.
- Diaz-Granados, C., & Chaparro-Giraldo, A. (2012) Métodos de transformación genética en plantas. Artículo técnico *Revista U.D.C.A* 15(1): 49-61
- El Comercio. (4 de Julio del 2018) El tomate de árbol, listo para viajar a Estados Unidos; el aguacate espera. Recuperado de <https://www.elcomercio.com/actualidad/tomate-aguacate-exportacion-estadosunidos-precios.html>
- Feeney M, B Bhagwat, J Mitchell, W Lane. (2007). Shoot regeneration from organogenic callus of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 90: 201–214.

- Ferl, R. y A. Paul. (2000). Genome organization and expression. pp. 312-357. En: Buchanan B., W. Gruissem y R. Jones. (eds.). Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD.
- Franco, A., Longart, M. (2009) Aplicaciones de la proteína verde fluorescente (GFP) en la biología celular y en la visualización del sistema nervioso. Revista de estudios transdisciplinarios 1 (2). Serie verde julio-diciembre 2009.
- George, E. (2008). Plant Tissue Culture Procedure – Background. pp. 1-28 in George pp. 1-28 in George,E; Hall, MA; De Klerk, G. (eds).2008. Plant propagation by tissue culture. 3 ed. Springer. Dordrecht, Netherlands.
- Gleba Y, Klimyuk V, Marillonnet S. (2005). Magniflection: a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. Vaccine 23. Vaccines and Immunisation:2042-2048.
- Guimarães, M., M. Tomé y G. Cruz. (1996). *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (tamarillo). Biotecnol. Agr. For. 35(4), 120-137.
- Gutiérrez, A., Santacruz, F., Cabrera, J., Rodríguez, B. (2003). Mejoramiento genético vegetal in vitro. E-Gnosis 1(1) Art 4.
- Hartley, J. L., Temple, G. F., and Brasch, M. A. (2000). DNA Cloning Using in vitro Site-Specific Recombination. Genome Research 10, 1788-1795.
- Herrera-Estrella, L., M. De Block, M. Van Montagu y J. Schell. (1983). Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. EMBO J. 2:987-990
- Hooykaas, P., Schilperoort, R. (1992). Agrobacterium and plant genetic engineering. Plant Molecular Biology, 19, 15–38. <https://doi.org/10.1007/BF00015604>
- Hoyos, J., C. Perea y R. Velasco. (2008). Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de fitohormonas. en la micropropagación del plátano Dominico Hartón (Musa AAB Simmonds). Fac. Cienc. Agropec. 6(2), 99-104

- Huang, F., Klaus, S., Herz, S., Zou, Z., Koop, H. (2002) Efficient plastid transformation in tobacco using aphA-6 gene and kanamycin selection. *Mol Genet Genomics* 268: 19-27.
- INEC (Instituto Nacional Ecuatoriano Censo) (2015) “Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua” [Base de datos en línea] [<http://www.ecuadorencifras.gob.ec/encuesta-de-superficie-y-produccion-agropecuaria-continua-2015>]
- Jauhar, P. (2006). Modern biotechnology as an integral supplement to conventional plant breeding: the prospects and challenges. *Crop Sci. (Estados Unidos)*. 46:1841-1859.
- Karimi, M.; Bleys, A.; Vanderhaeghen, R.; Wilson, P. (2007). Building blocks for plant gene assembly. *Plant Physiol. (Estados Unidos)*. 145:1183- 1191.
- Kothari, S., A. Joshi, S. Kachhwaha y N. Ochoa. (2010). Chilli peppers. A review on tissue culture and transgenesis. *Biotechnol. Adv.* 28, 35-48. Doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.08.005
- Krenek P, Samajova O, Luptovciak I, Duskocilova A, Komis G, Samaj J. (2015). Transient plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: Principles, methods and applications. *Biotechnol. Adv.* 33. BioTech 2014 and 6th Czech- Swiss Biotechnology Symposium:1024–1042.
- Lacroix B, Citovsky V. (2013). The roles of bacterial and host plant factors in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. *Int. J. Dev. Biol.* 57:467–481.
- Landy, A. (1989). Dynamic, Structural, and Regulatory Aspects of Lambda Site-specific Recombination. *Ann. Rev. Biochem.* 58, 913-949

- Larik, A.; Ahmed Siddiqui, K.; Ahmed Soomro, Z. (2004). Novel vistas of gene transfer to cereals. *Proc. Pakistan Acad. Sci.* 41(2):153-164.
- Larson C, C Gómez, M Sánchez, D Ríos. (2006). Inducción de caulogénesis indirecta en *Eucalyptus globulus*. *Bosque* 27(3): 250-257.
- Lewis, D. H., & Considine, J. A. (1999). Pollination and fruit set in the tamarillo (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.) 1. Floral biology. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 27(2), 101–112. <https://doi.org/10.1080/01140671.1999.9514086>
- Livermore, M. (2002). The role of modern biotechnology in developing country agriculture. *Brit. Nutr. Found. Nutr. Bull.* 27:47-50
- Lodge, J., Lund, P., Minchin, S. (2007) *Gene Cloning: principles and applications*. Oxon: Taylor and Francis.
- Manimaran, P., Ramkumar, G., Sakthivel, K., Sundaram, R., Madhav, M. and Balachandran, M. (2011). Suitability of non-lethal marker and marker-free systems for development of transgenic crop plants: Present status and future prospects. *Biotechnology Advances*
- Meadows L. (2005) *Growing Tamarillo Relatives in the New Zeland Home Garden*. Enero 2002.
- Mendoza de Gyves. (2001) *Agrobiotecnología*. México D.F: Grupo Editorial Iberoamérica.
- Miki, B. and McHugh, S. (2004). Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *Journal of Biotechnology*
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473–497.
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., ... Kimura, T. (2007). Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient

construction of fusion genes for plant transformation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104(1), 34–41. <https://doi.org/10.1263/jbb.104.34>

Nakagawa, T., Ishiguro, S., Kimura, T. (2009). Gateway vectors for plant transformation. *Plant Biotechnology* (26) 275-284.

Penna, S., Sage, L. and Swennen, R. (2002). Positive selectable marker genes for routine

Pierik, R. (1987). *In Vitro Culture of Higher Plants*.pdf. Wageningen, The Netherlands.: Martinus Nijhoff Publishers.

Prasher D.C., V.K. Eckenrode, W.W. Ward, F.G. Prendergast, M.J. Cormier (1992). *Gene*. Volumen 111 pp. 229-233.

Ptashne, M. (1992). *A Genetic Switch: Phage (Lambda) and Higher Organisms* (Cambridge, MA: Cell Press).

Ramírez, T. (2009). Perfil de tomate de árbol. *Perfiles de producto: Perfil de tomate de árbol*.

Revelo, J., Pérez, E., & Maila, M. (2004). *Cultivo ecológico del tomate de árbol en Ecuador*. INIAP.

Riofrío, L., Arias, A., Arahana, V., & Torres, M. L. (2009). Regeneración de plantas de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) A partir de protoplastos, 75–78.

Rodríguez Beraud, M. M., Latsague Vidal, M. I., Chacón Fuentes, M. A., & Astorga Brevis, P. K. (2014). Inducción in vitro de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugni molinae*. *Bosque (Valdivia)*, 35(1), 21–22. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002014000100011>

- Siemens J, O. Schieder. (1996) Transgenic plants: transformation recent developments and the state of the art. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* (2): 66-75
- Smith R. (2012). *Plant tissue culture: Techniques and experiments*. Londres, UK. Academic Press Elsevier. 208.
- Stachel, S et al. (1985) Identification of signal molecules produced by wounded plant cell that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* (318): 624-629
- Takata N, Eriksson ME. 2012. A simple and efficient transient transformation for hybrid aspen (*Populus tremula* × *P. tremuloides*). *Plant Methods* 8:30
- Torres, M.L (2015) *Biología de Plantas. Segundo Semestre 2015-2016*. Universidad San Francisco de Quito. Quito-Ecuador.
- Tsien, R. (1998). The Green Fluorescent Protein. *Annual Review of Biochemistry*. 67, 509-544, doi:doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.509
- Twyman, R., Christou, P, Stöger, E. (2002) *Genetic transformation of plants and their cells*. Marcel Dekker
- Valderrama, A., Aranago, R., Afanador, L. (2005) Transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*: Ingeniería genética natural aplicada. *Fac. Nac. Agronomica* 58(1) 2569-2585.
- Valero, C. (2015). Optimización de la técnica de Agroinfección para la producción de proteínas en plantas de *N. benthamiana*. Universidad Politécnica de Valencia.
- Vasco, C., Avila, J., Ruales, J., Svanberg, U., Kamal-Eldin, A. (2009) Physical and chemical characteristics of golden-yellow and purple-red varieties of tamarillo fruit (*Solanum betaceum* Cav.) *Int J Food Sci Nutr* 60: 278-288

Vasil, I. 2007. A short history of plant biotechnology. *Phytochem. Rev.* (Holanda). 7:387-394

Zhang, J., R. Campbell, A. Ting, R. Tsien (2002). Creating new fluorescent probes for cell biology. 3: 906- 918.

## 12.TABLAS

**Tabla 1.** Lista de ImpGWBs

Vector name	Backbone	Bacterial selection <sup>a</sup>	Gateway cassette <sup>b</sup>	Marker for plant	Type
pGWB402	pPZP	Spe <sup>r</sup>	P <sub>35S</sub> -attR1-attR2-T <sub>NOS</sub>	P <sub>NOS</sub> :NPTII (Km <sup>r</sup> )	35S pro, no tag
pGWB402 Ω	pPZP	Spe <sup>r</sup>	P <sub>2x35S-Ω</sub> -attR1-attR2-T <sub>NOS</sub>	P <sub>NOS</sub> :NPTII (Km <sup>r</sup> )	2×35S-Ω pro, no tag

Fuente: Nakagawa, Ishiguro y Kimura (2009)

**Tabla 2.** Callogénesis y regeneración de brotes a partir de explantes de hoja de tomate de árbol en medio MS + 0.05ppm ANA + 4ppm BAP

Experimento	Tasa de Callogénesis	Tasa de Formación de Brotes
Experimento 1	100 %	23 %
Experimento 2	100 %	45 %
Experimento 3	100 %	25 %
Promedio	100 %	31 %
		S 12.17 %

**Tabla 3.** Callogénesis y regeneración de brotes a partir de explantes de hoja de tomate de árbol en medio MS + 0.05ppm ANA + 4ppm BAP + Kanamicina en diferentes concentraciones.

Tratamiento	Tasa de Callogénesis	Tasa de Formación de Brotes
0mgL <sup>-1</sup> Kan	100 %	40 %
25mgL <sup>-1</sup> Kan	100 %	25 %
50mgL <sup>-1</sup> Kan	0 %	0 %
75mgL <sup>-1</sup> Kan	0 %	0 %
100mgL <sup>-1</sup> Kan	0 %	0 %

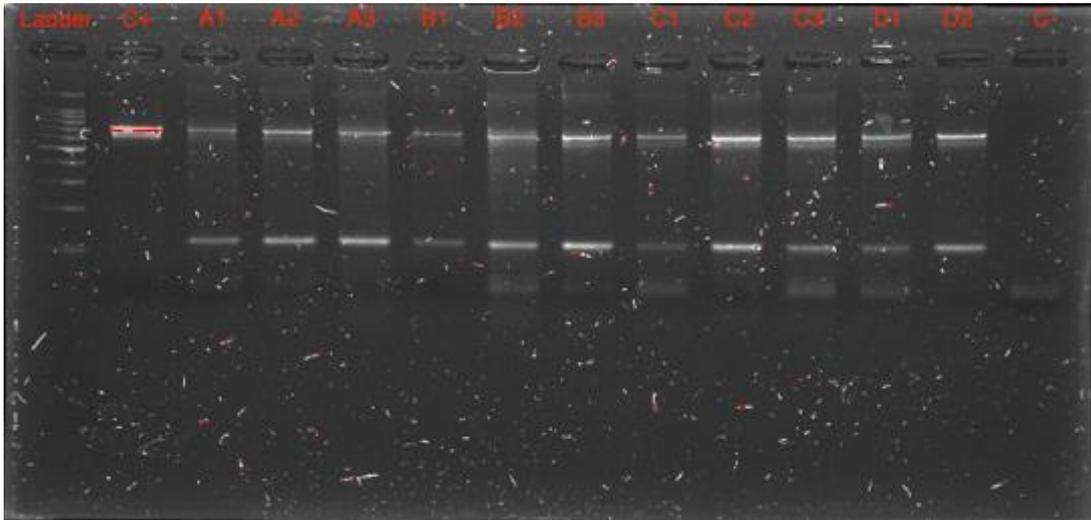
**Tabla 4.** Callogénesis y regeneración de brotes a partir de explantes cotiledóneos de tomate de árbol en medio MS + 0.05ppm ANA + 4ppm BAP + KAN en diferentes concentraciones.

Tratamiento	Tasa de Callogénesis	Tasa de Formación de Brotes
0mgL <sup>-1</sup> Kan	100 %	0 %
25mgL <sup>-1</sup> Kan	100 %	20 %
50mgL <sup>-1</sup> Kan	0 %	0 %
75mgL <sup>-1</sup> Kan	0 %	0 %
100mgL <sup>-1</sup> Kan	0 %	0 %

**Tabla 5.** Callogénesis y regeneración de brotes a partir de explantes de hojas pequeños (0.5cm<sup>2</sup>) y grandes (1cm<sup>2</sup>) de tomate de árbol en medio MS + 0.05ppm ANA + 4ppm BAP + KAN en diferentes concentraciones.

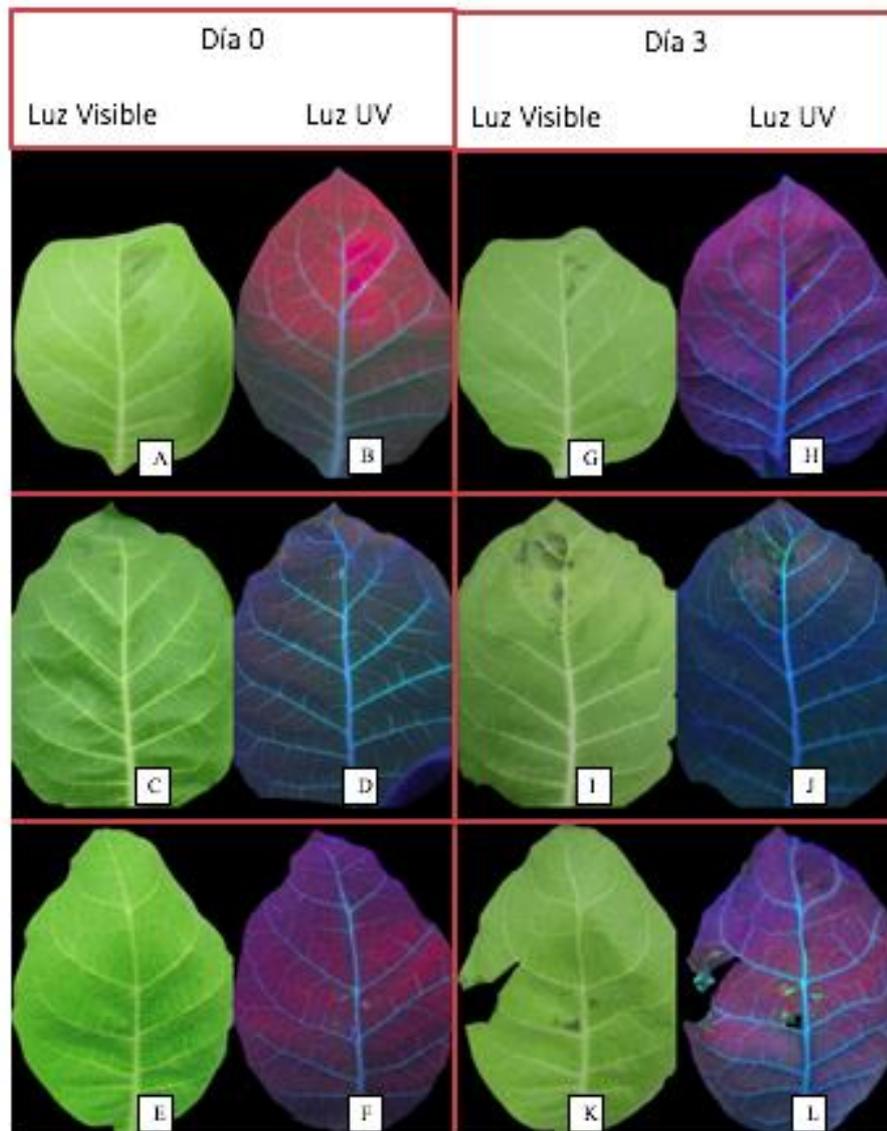
Tamaño del explante	[KAN] mgL <sup>-1</sup>	Tasa de Callogénesis
pequeño	0	99 %
pequeño	25	29,67 %
pequeño	50	0 %
pequeño	75	0 %
pequeño	100	0 %
grande	0	100 %
grande	25	22 %
grande	50	0 %
grande	75	0 %
grande	100	0 %

### 13.FIGURAS



**Figura 1.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % de los productos de PCR de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 pGWB402 (A1, A2, A3, B1, B2, B3) y *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 pGWB402  $\Omega$  (C1, C2, C3, D1, D2) para comprobar que contengan el gen GFP.

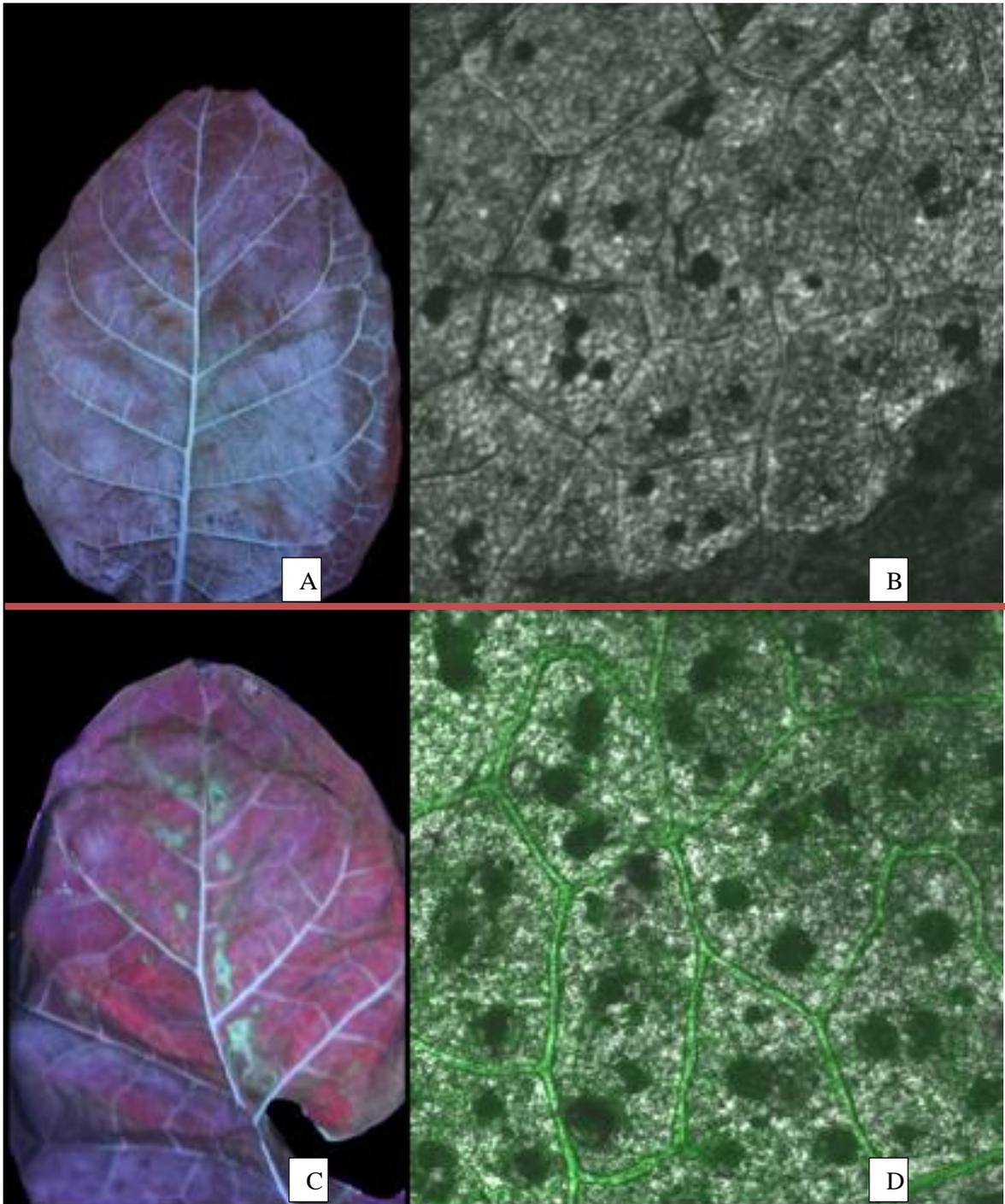
Carril 1: Ladder 100pb Invitrogen. Carril 2: Control +. Carril 3: Muestra. Carril 4: Muestra.  
 Carril 5: Muestra. Carril 6: Muestra. Carril 7: Muestra. Carril 8: Muestra. Carril 9: Muestra.  
 Carril 10: Muestra. Carril 11: Muestra. Carril 12: Muestra. Carril 13: Muestra. Carril 14:  
 Control –.



**Figura 2.** Agroinfiltración de hojas de tabaco a los 0 días (A, B, C, D, E, F) y a los 3 días (G, H, I, J, K, L) de la agroinfiltración en luz visible (A, C, E, G, I, K) y en luz UV de 302nm (B, D, F, H, J, L).

Las fotos A, B, G y H corresponden a una hoja control en la que se infiltró el medio de suspensión vacío, sin *Agrobacterium tumefaciens*. Las fotos C, D, I y J corresponden a una misma hoja, en la que se infiltró la suspensión con *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 pGWB402. Las fotos E, F, K y L corresponden a una misma hoja, en la que se infiltró la suspensión con *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 pGWB402Ω.

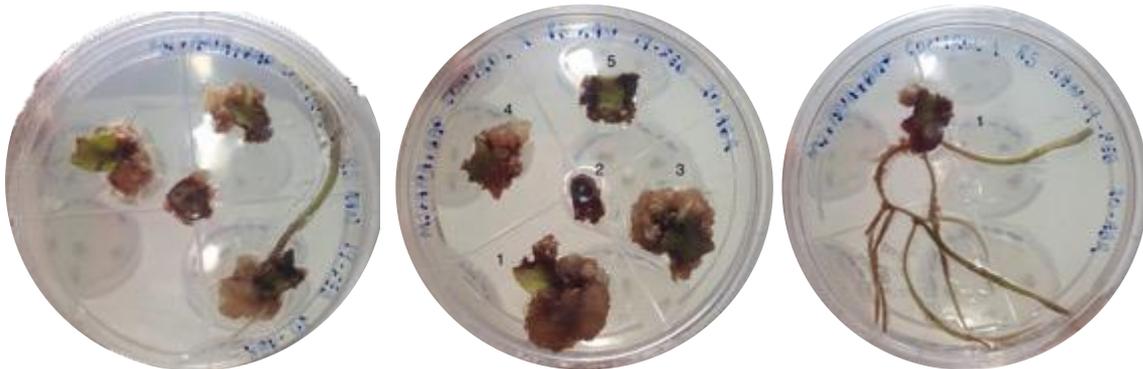
Se observa la expresión del gen GFP en hojas de tabaco *Nicotiana tabacum* en luz UV en la foto (J) por el vector pGWB402, así mismo en la foto (L) por el vector pGWB402 $\Omega$  donde se ven puntos verdes de fluorescencia cercanos al lugar de la agroinfiltración que no aparecen en el día 0 y si aparecen en el día 3.



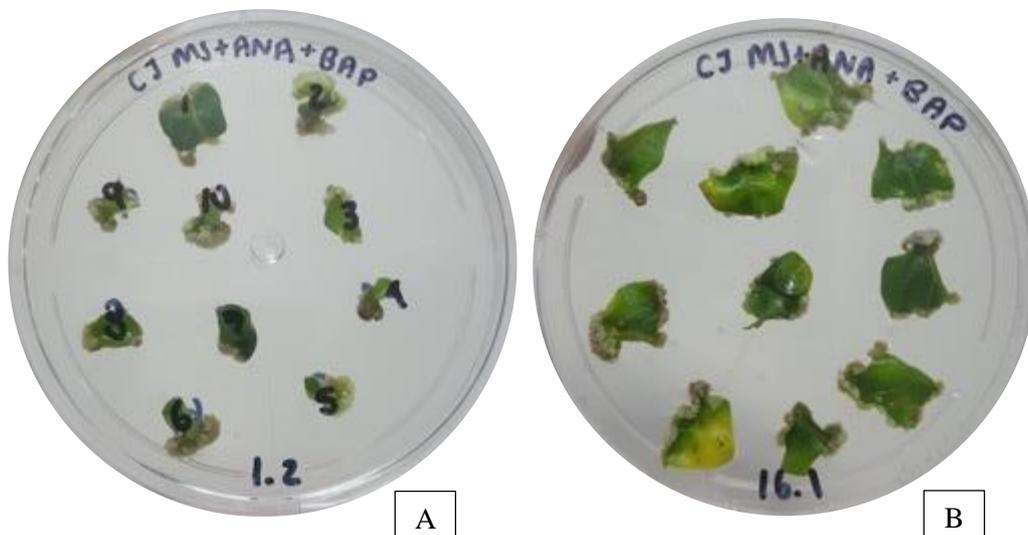
**Figura 3.** Agroinfiltración en hojas de tabaco a los 3 días. (A). Hoja control en luz UV. (B). Corte de hoja A en microscopio de fluorescencia. (C). Hoja agroinfiltrada con *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 pGWB402Ω. (D). Corte de hoja D en microscopio de fluorescencia. El microscopio de fluorescencia utilizado para estas fotos es Olympos BX61WI.

Se observa a través de la UV, que a los 3 días del experimento de agroinfiltración las hojas control no expresan el gen reportero GFP; mientras que las hojas agroinfiltradas si expresan

el gen reportero GFP. Se observó puntos de fluorescencia en la hoja C, por lo que se hizo un corte en el micrótopo para observar la fluorescencia y se obtuvo la imagen D. En comparación con el control que no presenta fluorescencia, se puede afirmar que los vectores son funcionales y que la técnica de agroinfiltración es eficiente.



**Figura 4.** Callos formados a partir de cotiledones de tomate de árbol a las 4 semanas en MS + 0.05 ppm ANA + 4 ppm BAP.



**Figura 5.** Callos a partir de hojas de tomate de árbol a las 4 semanas en medio MS + 0.05 ppm ANA + 4 ppm de BAP +  $0\text{mgL}^{-1}$  de kanamicina. **A.** Callos de explantes pequeños  $0.5\text{ cm}^2$ . **B.** Callos de explantes grandes  $1\text{ cm}^2$ .

### Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distributions of Tamaño de explante 0.5 cm <sup>2</sup> and Tamaño de explante 1 cm <sup>2</sup> are the same.	Related-Samples Friedman's Two-Way Analysis of Variance by Ranks	1.000	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .05.

**Figura 6.** Resultado de la prueba de Friedman para analizar si hay diferencia significativa en el tamaño 0.5 cm<sup>2</sup> y 1 cm<sup>2</sup> como fuente de explante hojas de tomate de árbol in vitro.

### Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distributions of Concentración Kanamicina 0 mg/L, Concentración Kanamicina 25 mg/L, Concentración Kanamicina 50 mg/L, Concentración Kanamicina 75 mg/L and Concentración Kanamicina 100 mg/L are the same.	Related-Samples Friedman's Two-Way Analysis of Variance by Ranks	.000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .05.

**Figura 7.** Resultado de la prueba de Friedman para analizar si hay diferencia significativa entre los 5 tratamientos de kanamicina (0mgL<sup>-1</sup>, 25mgL<sup>-1</sup>, 50mgL<sup>-1</sup>, 75mgL<sup>-1</sup>, 100mgL<sup>-1</sup>) en hojas de tomate de árbol in vitro.