

Universidad San Francisco de Quito

Transfromación Genética de la Naranjilla,
Solanum quitoense, mediante *Agrobacterium*
tumefaciens

María Betsabé Mantilla Pérez

Tesis de grado requisito para la obtención del
título de Licenciatura en Biotecnología

Quito, 2008

DERECHOS DE AUTOR

© Derechos de Autor

María Betsabé Mantilla Pérez

2008

DEDICATORIA

A mis padres, por su amor, comprensión y sacrificio.

A mi abuelita, por guiar mi camino a lo largo de estos años.

A mi hermano, Juan David, por estar a mi lado cuando

más lo he necesitado. A mis amigos y amigas, por

contribuir a mi desarrollo personal y profesional.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todas las personas que hicieron posible la realización de este proyecto, especialmente a María de Lourdes Torres y Venancio Arahana, no solo por todo el conocimiento que han compartido conmigo a lo largo de mi vida universitaria, sino también por sus consejos, por el ánimo y por los regaños, que me han hecho crecer como profesional y como ser humano. Quisiera también agradecer a todos los profesores que he tenido a lo largo de mi carrera, porque cada uno de ellos dejó huella importante en mí.

Agradezco a las autoridades de la Universidad San Francisco de Quito y a la directiva del Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales por facilitarme todo lo necesario para la realización del presente proyecto. También quisiera mencionar a mis compañeros de laboratorio, especialmente a Andrea Arias, Pedro González, Diana Ayala, Diana Trujillo, Nicolás Peñafiel, Nicolás Bastidas, Lenin Leiva, Antonio Cabrera, Lorena Mejía y Viviana Jaramillo, con quienes hemos formado un buen equipo de trabajo y que más que compañeros se han convertido en buenos amigos.

Finalmente quisiera agradecer a mi familia: mis padres, mi abuelita y mi hermano, por su entrega y amor. A mis amigos y amigas, especialmente a Gabriela, porque hemos estado juntas en todos los momentos importantes y cotidianos de nuestras vidas. A Nicolás Uzcátegui por su infinita paciencia y optimismo, así como a su familia, quienes me han acogido con los brazos abiertos.

RESUMEN

El presente estudio estableció un protocolo de transformación genética para peciolos de naranjilla, *Solanum quitoense*, mediante la utilización de la cepa *Agrobacterium tumefaciens* LB004 que contiene el plásmido pBI121.

Para lograr este objetivo se desarrollaron 11 ensayos de transformación genética en los cuales se analizó distintos factores que pudieran influir en la eficiencia de regeneración y transformación de plantas de naranjilla. En los cinco primeros experimentos no se obtuvo regeneración de retoños porque los explantes tuvieron una selección temprana (selección con kanamicina entre 0 y 2 semanas de cultivo). En el resto de los ensayos, los explantes fueron sometidos a una selección tardía (selección con kanamicina a las 3 semanas de cultivo) y de éstos se obtuvo un total de 30 plantas transformadas, de las cuales, 15 fueron positivas para el gen GUS y NPTII y 15 fueron positivas únicamente para el gen NPTII.

Los ensayos de transformación genética 6 y 11 fueron los más exitosos, con eficiencias de transformación del 6.25% y del 27.5% respectivamente. En ambos ensayos se emplearon peciolos de 1 a 1.5 cm de longitud, provenientes de plantas de 10 a 12 semanas de edad, a los cuales se les hizo los cortes S.C (sin cortes adicionales) y H.L (herida longitudinal).

Este trabajo reporta por primera vez a nivel nacional y mundial la transformación genética de la naranjilla. Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que es factible implementar en el país técnicas de biotecnología moderna, capaces de promover el mejoramiento vegetal de la naranjilla, así como de otras especies de importancia económica y cultural para el Ecuador.

ABSTRACT

This study established a transformation method mediated by *Agrobacterium thumefaciens* in naranjilla's petioles (*Solanum quitoense*) using pBI121 plasmid.

To achieve this objective 11 experiments were performed, each one analyzing different factors that could affect the naranjilla plant regeneration and transformation rate. In experiments #1 to #5, shoot regeneration was not obtained because petioles were selected early (kanamycin selection between 0 and 2 weeks after explant culture). In experiments #6 to #11, petioles were selected late (kanamycin selection 3 weeks after explant culture). 30 plants were positively transformed, 15 of them for both genes (GUS and NPTII) and the other 15 plants only for NPTII gen.

Experiments #6 and #11 were the best experiments in this study, with transformation rates of 6.25% and 27.5% respectively. Both experiments were performed using petioles of 1 to 1.5 cm in length, which came from 10 to 12 weeks old plants. Also, these petioles had two different incision types: SC (no additional incisions) and H.L (with 1 lengthwise incision).

This study constitutes the first successful attempt of genetic transformation of naranjilla in Ecuador and worldwide, since there are no reports of genetic transformation in this species. This study demonstrates the feasibility of using biotechnological tools to improve naranjilla and other Ecuadorian important crops.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
Derechos de Autor	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Resumen	vi
Abstract	vii
1. Introducción	1
1.1. Mejoramiento Vegetal	1
1.1.1. La Hibridación como Técnica de Mejoramiento Convencional	2
1.1.2. Las Limitaciones del Mejoramiento Convencional y las Perspectivas Futuras	3
1.1.3. La Biotecnología Moderna en el Mejoramiento Vegetal	5
1.1.3.1. Transformación Genética de Plantas	6
1.1.3.1.1. Métodos Físicos de Transformación	8
1.1.3.1.2. Métodos Biológicos de Transformación	8
1.1.3.1.2.1. Transformación Genética mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	9
1.2. Naranja Generalidades	12
1.2.1. Situación de la naranja en Ecuador	14
1.2.2. Mejoramiento Genético de la Naranja	16
2. Objetivo General	18
3. Objetivos Específicos	18
4. Justificación	19
5. Área de Estudio	20
6. Materiales, reactivos y equipos	21
6.1. Material Vegetal	21
6.1.1. Desinfección de Semillas	22
6.2. Cepa Bacteriana Utilizada para la Transformación	21

6.2.1. Medio para la germinación de semillas	22
6.2.2. Medio de cultivo para la bacteria <i>Agrobacterium tumefaciens</i> y equipos para su multiplicación y cuantificación	22
6.3. Transformación Genética para Explantes de Naranja.....	22
6.3.1. Medio de co-cultivo	22
6.3.2. Medio de regeneración de plantas de naranja	23
6.3.3. Medio de selección de células transformadas	23
6.4. Extracción de ADN de plantas de naranja	23
6.5. Cuantificación de ADN de naranja	24
6.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	24
6.7. Electroforesis en gel de agarosa	25
7. Metodología	25
7.1. Cultivo in Vitro de Naranja	25
7.1.1. Obtención de semillas de naranja	25
7.1.2. Desinfección de las semillas de naranja	26
7.1.3. Germinación de semillas de naranja	26
7.2. Cultivo de la bacteria <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	27
7.3. Proceso de Transformación Genética de Naranja, mediante <i>A. tumefaciens</i> usando Explantes de Pecíolo	28
7.3.1. Obtención de Explantes	28
7.3.2. Proceso de Inoculación y Agro-infección	28
7.3.3. Selección y Regeneración	29
7.3.4. Diferencias en los ensayos de transformación: Desde el ensayo de transformación 6 hasta el ensayo de transformación 11	30
7.3.5. Nomenclatura de identificación de retoños	31
7.4. Verificación del Proceso de Transformación Genética	31
7.4.1. Extracción de ADN de plantas de naranja potencialmente transformadas	31
7.4.2. Cuantificación y Dilución de ADN	33
7.4.2.1. Preparación de la Solución de Trabajo (Working Solution)	33
7.4.2.2. Preparación de las muestras de ADN para la cuantificación y dilución	33

7.5 Amplificación de Segmentos de los Genes GUS y NPTII mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	34
7.6. Resolución de Productos Amplificados mediante Electroforesis en Gel de Agarosa	35
8. Resultados	36
8.1. Regeneración de los explantes de peciolos sometidos a transformación	36
8.1.1. Ensayo de Transformación 6	36
8.1.2. Ensayo de Transformación 7	37
8.1.3. Ensayo de Transformación 8	38
8.1.4. Ensayo de Transformación 9	38
8.1.5. Ensayo de Transformación 10	38
8.1.6 Ensayo de Transformación 11	39
8.2. Pruebas moleculares de los retoños potencialmente transformados	40
9. Discusión	41
10. Conclusiones y Recomendaciones	46
10.1. Conclusiones	46
10.2. Recomendaciones	47
11. Bibliografía	50

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

	Página
12.1. Tablas	53
Tabla 1. Medios de cultivo para <i>A. tumefaciens</i> LB004/PBI 121	53
Tabla 2. Medios de regeneración empleados para los explantes de naranjilla luego de su inoculación con <i>A. tumefaciens</i>	54
Tabla 3. Tiempo que los explantes de peciolo permanecieron en medio de Regeneración previo a la Selección para cada ensayo de Transformación	55
Tabla 4. Factores considerados en los distintos ensayos de transformación genética de la naranjilla	56
Tabla 5. Reactivos y volúmenes empleados en la preparación de una reacción para PCR	57
Tabla 6. Secuencias de los primers empleados para la amplificación de los genes GUS y NPTII	58
Tabla 7. Programa para la amplificación del gen GUS	59
Tabla 8. Programa para la amplificación del gen NPTII	60
Tabla 9. Eficiencia de transformación para los diferentes ensayos de transformación genética de naranjilla	61
 12.2. Figuras	 62
Figura 1. Exportación en kilogramos de las presentaciones de naranjilla en los años 1998 a 2000	62
Figura 2. Variaciones en el precio por kilogramos de las presentaciones de naranjilla exportada en los años 1998 a 2000	63
Figura 3. Plásmido pBI121 empleado para el proceso de transformación genética	64
Figura 4. Tipos de cortes realizados a los peciolos de naranjilla para los diferentes ensayos de transformación genética	65
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados para el gen NPTII de los retoños del ensayo de transformación 6	66
Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados para el gen GUS de los retoños del ensayo de transformación 6	67
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados para el gen NPTII de los retoños del ensayo de transformación 10	68
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados para los genes GUS y NPTII de los retoños del ensayo de transformación 11	69

1. Introducción

1.1. Mejoramiento Vegetal

Desde que el ser humano dejó sus hábitos nómadas y se asentó en un lugar físico determinado se inicia la agricultura, hace aproximadamente diez mil años a.C. El cambio en el estilo de vida cazador-recolector al estilo de vida agrícola estuvo motivado por la necesidad de modificar las plantas y animales que en ese entonces eran considerados silvestres, pero que tuvieron un cercano contacto con el hombre. Estas técnicas de modificación se transmitieron de generación en generación y el proceso de mejoramiento continuó a través del tiempo (Cubero, 2003). En los primeros intentos de mejora, el agricultor hacía su propia selección, quedándose con los granos o semillas de las plantas que presentaban mejores características para, posteriormente, cultivarlos en la siguiente temporada de siembra (Benítez, 2005). Junto con la domesticación, la selección dio lugar a cambios significativos en la estructura de las plantas, permitiendo a la población satisfacer sus necesidades alimenticias (Cubero, 2003).

Más adelante, la selección tradicional produjo las primeras <variedades>, que pese a mantener caracteres idénticos a los de sus parentales, poseían ligeras variantes producto de cruzamiento con sus parientes, cruzamiento con especies silvestres y finalmente producto de mutaciones espontáneas. El mejoramiento fundamentado en la selección de características observables (semillas más grandes, plantas más altas, espigas fuertes, mayor número de frutos por árbol) se denominó

Selección Masal que fue la responsable del surgimiento de variedades locales, es decir, variedades que el propio agricultor obtuvo, conservó y mejoró. En el siglo XVIII aparece la *Mejora Científica* cuando surgió el conocimiento de la reproducción sexual, a partir de este momento, el cruzamiento de especies sexualmente compatibles se convirtió en la técnica de mejoramiento generalizada de las plantas (Benítez, 2005). Dos siglos más tarde, se tornó fundamental el conocimiento sobre las leyes de la herencia descritas por Gregorio Mendel, lo que permitió trabajar en la denominada *Mejora Genética*. Mediante estos estudios se logró explicar los efectos de la consanguinidad, además surge el término *cultivar*, para diferenciar las nuevas variedades obtenidas a partir de Mejora Genética no solo de las variedades locales, sino de las variedades modernas obtenidas en el siglo XIX, siendo más productivas que las anteriores, pero no suficientemente homogéneas (Cubero, 2003).

1.1.1. La Hibridación como Técnica de Mejoramiento Convencional

Las operaciones convencionales del fitomejoramiento, en la actualidad, incluyen el cruzamiento y la obtención de híbridos. El cruzamiento, que puede ser natural o artificial, permite introducir nuevas características a la descendencia, sin embargo los cruzamientos tienen la limitación de que sólo pueden hacerse entre variedades e incluso especies sexualmente compatibles. Pese a la limitación de la compatibilidad sexual, el cruzamiento ha sido una técnica fundamental en el fitomejoramiento, de tal forma que las variedades modernas son el resultado de una serie de cruzamientos (Cubero, 2003).

Como producto de las técnicas de cruzamiento, surgen individuos mejorados; éstos son más productivos, tienen características morfológicas superiores y muestran propiedades interesantes para el agricultor (resistencia a plagas, tolerancia a estrés abiótico, etc). Estos nuevos individuos, denominados *híbridos* son producidos por el cruzamiento de dos o más parentales elegidos, de tal forma que se garantice la máxima producción y la máxima homogeneidad fenotípica (Cubero, 2003).

El híbrido ideal debe ser obtenido a partir del cruzamiento de dos parentales homocigotos, denominados líneas puras. Al mismo tiempo, el híbrido no se debe utilizar más que en la primera generación, puesto que su descendencia no tendrá el mismo vigor y productividad ya que puede generar el 50% de gametos homocigóticos (Benítez, 2005).

El híbrido tiene un valor comercial importante, puesto que su alta productividad y su uniformidad fenotípica ha permitido que los agricultores obtengan beneficios económicos al garantizar una buena cosecha y un producto con características superiores. Sin embargo, no se debe emplear para la siembra la semilla cosechada del híbrido, siendo una desventaja para el agricultor, quien depende de la empresa productora de semilla para su siguiente siembra (Cubero, 2003).

1.1.2. Las Limitaciones del Mejoramiento Convencional y las Perspectivas Futuras

Gracias al mejoramiento convencional se ha conseguido transferir fragmentos de material genético entre variedades y, a veces, entre especies, generando nuevas

combinaciones, inexistentes hasta entonces, en la naturaleza. La vida de los seres humanos se ha desarrollado con nuevas variedades que son el producto de una extensa manipulación genética de las plantas originales; de esta manera, se puede decir que no existe nada en nuestro alrededor que no sea manipulado.

Si bien las técnicas tradicionales de mejoramiento vegetal han hecho posible el desarrollo de variedades de gran valor comercial y agronómico, éstas requieren de tiempo. Es indispensable realizar varios ensayos y contar con varias generaciones hasta conseguir la transferencia y estabilidad de un gen o un fragmento de ADN en una población de plantas. A este inconveniente se le añaden los extensivos cruzamientos que se han desarrollado en los últimos 60 años, generando una escasez de genes en las diferentes especies vegetales. Se torna indispensable y urgente contar con nuevos genes que confieran a las plantas características que incrementen su producción y que eviten pérdidas en los cultivos a causa de ciertos factores como el estrés biótico, el estrés abiótico, sustancias químicas, etc. (Benítez 2005).

Gracias al desarrollo de las técnicas de la *ingeniería genética* generadas a partir de los años 70's, los fitomejoradores y los investigadores han encontrado un camino para introducir genes de interés agronómico, ambiental, nutricional y farmacéutico en las plantas, rompiendo las barreras de la compatibilidad sexual y las barreras de la filogenia. Gracias a este conjunto de técnicas, denominadas *Mejoramiento Moderno*, es posible introducir un gen o un fragmento de él de cualquier especie en el genoma de otra especie. Fruto del gran trabajo detrás de estas técnicas modernas de mejoramiento, las posibilidades de obtener variedades vegetales más eficientes y con valores agregados

es infinita y con un gran potencial para el futuro del mejoramiento vegetal (Cubero, 2003).

1.1.3. La Biotecnología Moderna en el Mejoramiento Vegetal

De acuerdo con Benítez (2005) el mejoramiento vegetal biotecnológico mediante la ingeniería genética tiene cuatro objetivos principales:

1. Modificar la expresión de genes naturalmente presentes en la planta
2. Actuar como una herramienta auxiliar de las técnicas de hibridación convencional, al introducir genes de interés en las plantas
3. Introducir genes nuevos provenientes de especies no emparentadas
4. Conseguir la producción de compuestos de interés

La base de las técnicas modernas de fitomejoramiento es el cultivo *in vitro*, el mismo que puede definirse como el cultivo de tejidos, órganos o células vegetales en un medio que contiene los factores necesarios para su desarrollo, el mismo que se encuentra bajo condiciones estables de laboratorio, controladas y estériles (Pierik, 1987).

Las aplicaciones del cultivo *in vitro* son múltiples, de éstas se puede mencionar las siguientes: La *micropropagación* que permite generar un sin número de plantas genéticamente idénticas en poco tiempo y espacio a partir de una planta madre o una parte de ella. La *regeneración de explantes*, fundamentado en el principio de la totipotencia, consiste en inducir la formación de nuevas plantas a partir de un explante, es decir, a partir de un tejido, órgano o célula vegetal. Esta inducción suele hacerse con

factores de crecimiento o fito-hormonas junto con un medio rico en nutrientes y bajo el control de factores externos como el pH, la temperatura, la luz, etc. La *variación somaclonal* es un acontecimiento que se presenta por las condiciones del medio de cultivo en la regeneración de explantes. Consiste en pequeñas mutaciones a nivel cromosomal que surgen en las células que van a dar lugar a una nueva planta, lo que ocasiona que las plantas provenientes de un mismo tejido, tengan pequeñas diferencias genéticas entre sí. Estas mutaciones pueden aparecer por algunos componentes del medio de cultivo, como las hormonas vegetales, químicos adicionados al medio, exposición a radiación, entre otros (Mendoza de Gyves, 2001).

A diferencia de las técnicas tradicionales de cultivo, el cultivo *in vitro* es una valiosa herramienta en la obtención de plantas libres de patógenos, plantas homocigotas, plantas en peligro de extinción, en estudios de ingeniería genética, entre otras. (Benítez, 2005) El gran potencial de esta metodología ha favorecido al incremento del número de laboratorios de cultivo de tejidos en diferentes países del mundo, especialmente enfocados hacia la producción y comercialización de plantas ornamentales, frutales y diversos cultivos, esto ha permitido un avance notorio en el mejoramiento vegetal de muchas especies. (Mendoza de Gyves, 2001).

1.1.3.1. ***Trasformación Genética de Plantas***

Con el avance de la ingeniería genética y el desarrollo del ADN recombinante en la década de los 70's, se pensó en introducir genes de interés en las células de los explantes vegetales, las mismas que, mediante técnicas de cultivo *in vitro*, sean capaces de regenerar plantas portadoras de dichos genes.

Los mayores retos de las estrategias de transformación genética son conseguir la integración permanente del ADN foráneo en el genoma de la planta y lograr la expresión exitosa del transgen. Cuando ambos parámetros se consiguen, se dice que la transformación fue estable o integrativa, lo que permite mantener indefinidamente líneas transgénicas, capaces de transmitir el transgen a las siguientes generaciones. Sólo entre el 1 y el 9% del ADN transferido y expresado en las células vegetales se integra finalmente al genoma de la planta (Benítez, 2005).

De acuerdo a Benítez (2005) para conseguir una transformación eficiente de un tejido vegetal es importante cumplir con los siguientes requisitos:

- Debe ser posible la propagación y regeneración del tejido que se pretende transformar
- Debe existir un método eficiente de introducción de ADN en el tejido vegetal
- Debe existir un marcador que permita seleccionar los tejidos y plantas transformadas
- Deben regenerarse plantas fértiles
- El proceso de transformación debe ser simple, eficaz y reproducible

Se debe tomar en cuenta, además, que la planta transgénica ideal es aquella que contiene copias funcionales del transgen en sus células, las mismas que se encuentran insertadas en el genoma sin interrumpir ninguna región funcional de la planta (Benítez 2005).

1.1.3.1.1. Métodos Físicos de Transformación

Dentro de las técnicas de transformación físicas se encuentran aquellas técnicas que pretenden hacer que el ADN foráneo ingrese a las células a través del uso de aparatos especializados, el uso de sustancias químicas, etc.

El método físico de transformación genética de plantas más exitoso es la *biolística* que consiste en la entrada directa del ADN desnudo en el interior de la célula a través de microproyectiles de oro o tungsteno, los mismos que son disparados a los tejidos vegetales por propulsores de helio. Otro método empleado en la actualidad es la *microinyección* de ADN en cigotos o en células diferenciadas, que consiste en la introducción directa de las moléculas de ADN a las células vegetales bajo el control óptico del operador. Es uno de los métodos más laboriosos y difíciles, pero tiene la ventaja de poder controlar el número y cantidad de moléculas que se introducen. Además, se introduce el ADN a una única célula, sin necesidad de grandes cantidades de tejido y es más sencillo monitorear el desarrollo de cada una de las células transformadas (Siemens y Shieder, 1996).

1.1.3.1.2. Métodos Biológicos de Transformación

Dentro de las herramientas biológicas más utilizadas para la transformación genética de plantas se encuentran el uso de bacterias como *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium rhizogenes*. De ambas bacterias, *A. tumefaciens*, es la bacteria más empleada en los procesos de transformación genética de plantas, puesto que es capaz de

transferir material genético a diferentes explantes vegetales, tales como hojas, tallos, cotiledones, yemas, peciolos, embriones, etc. Es importante anotar que el método de transformación genética mediante *Agrobacterium tumefaciens* es el más exitoso frente a los otros métodos físicos y biológicos de transformación, puesto que su capacidad infectiva es de amplio espectro, lo que ha permitido transformar a un sin número de plantas dicotiledóneas y, recientemente, monocotiledóneas. Además, la transformación genética de plantas mediante *A. tumefaciens* es económica, reproducible y genera una eficiencia alta de transformación frente a los otros métodos empleados con el mismo propósito (Benítez 2005; Stanton, 2000).

1.1.3.1.2.1. Transformación Genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

A pesar de que a principios del siglo XX se descubrió que una bacteria del género *Agrobacterium* era la responsable de la enfermedad de la agalla de la corona, fue hasta la década de los 70's que se descubrió que esta bacteria era capaz de insertar algunos de sus genes en el genoma de las plantas (Hooykaas y Schilperoort, 1992). Más adelante se supo que los genes que desarrollaban los tumores se transportaban en un plásmido de *A. tumefaciens*, al que se le denominó *Plásmido Ti* por sus siglas en inglés, *tumor inducing* (Espinoza, 2002; Valderrama et al, 2005).

La enfermedad del tumor o agalla de la corona se caracteriza por una excesiva proliferación celular entre la base del tallo y el inicio de la raíz (corona) de varias especies vegetales, la cual produce una protuberancia en forma de bulbos que impide la circulación de la savia, generando pérdidas en la productividad y, en algunos casos, la muerte de las plantas a los dos o tres años (Espinoza, 2002). Esta enfermedad es inducida por un plásmido de 200 kb presente en el citoplasma bacteriano, denominado

Plásmido Ti (Hooykaas y Schilperoort, 1992; Siemens y Pickardt, 1996). Este plásmido se transfiere a la célula vegetal gracias a la presencia de un grupo de genes infectivos, denominados *genes vir*. El fragmento de ADN que se inserta en el genoma de la planta, conocido como *T-DNA* contiene diversos oncogenes, conocidos como *onc* (Valderrama et al, 2005). Una vez transcritos los oncogenes por la célula vegetal, se codifican varias proteínas involucradas en la síntesis de auxinas y citoquininas, hormonas vegetales que participan en la proliferación celular, dando lugar al tumor de la corona. Al mismo tiempo, en el *T-DNA* se localiza un gen involucrado en las síntesis de opinas, sustancias secretadas por la planta que son fuente de alimento para las bacterias, las cuales incrementan en número y generan mayor infección a las plantas (Benitez, 2005; Hooykaas y Schilperoort, 1992).

La infección de *A. tumefaciens* a la planta se consigue cuando la bacteria entra en contacto con heridas presentes en la misma. Estas heridas son ocasionadas por laceraciones en los tejidos como consecuencia del clima, las herramientas agrícolas, la manipulación de los trabajadores o por la acción de depredadores o plagas, las mismas que generan la secreción de ciertos exudados vegetales. Dentro de estos exudados, los compuestos fenólicos son de gran importancia en la activación de la patogenicidad de *A. tumefaciens*, ya que activan los genes *chv*, presentes en la región de virulencia en el plásmido Ti pero fuera del *T-DNA*. Una vez activados los genes *chvA* y *chvB* la bacteria empieza a producir sustancias que facilitan la adhesión de las paredes celulares vegetal y bacteriana, abriendo el camino a la transferencia del *T-DNA* (Hooykaas y Schilperoort, 1992; Stanton, 2000). Esta transferencia se consigue gracias a la presencia de dos regiones conservadas a los extremos de *T-DNA* de 24 a 25 pb cada una, las cuales constituyen las señales de reconocimiento para la transferencia del material

genético bacteriano al genoma celular de la planta. Una vez que el fragmento del plásmido bacteriano ingresa a la célula vegetal, se consigue su integración al genoma de dicha célula por un proceso de recombinación. Finalmente, la infección bacteriana resulta exitosa con la expresión de los genes productores de fitohormonas y opinas en las células vegetales, gracias a la presencia de señales reguladoras de expresión eucariotas presentes en el *T-DNA*, como la caja de iniciación de transcripción, TATA, y la secuencia terminadora de transcripción AATAAA (Hooykaas y Schilperoort, 1992).

En la actualidad, gracias a técnicas de ingeniería genética ha sido posible manipular la información contenida dentro del *T-DNA*, extrayendo los genes de virulencia e insertando genes de interés agronómico, además de introducir genes de selección temprana y genes reporteros (Benítez, 2005). Dentro de los genes de interés se puede mencionar a los genes de resistencia a plagas, genes de resistencia a herbicidas, genes de resistencia a estrés abiótico, genes codificadores de agregados nutricionales como vitaminas, proteínas, enzimas, entre otros. Dentro de los genes de selección se encuentran los genes que confieren resistencia a antibióticos, metales pesados o sustancias tóxicas. Finalmente, como genes reporteros suelen utilizarse genes de detección colorimétrica con la utilización de un sustrato específico, tal es el caso de los genes de la β -glucuronidasa y la β -galactosidasa provenientes de bacterias; así como también genes fluorométricos como el gen GFP (Green Fluorescent Protein) proveniente de medusas (Stanton, 2000; Benítez, 2005).

1. 2. Naranjilla. Generalidades

La naranjilla (*Solanum quitoense*), es un arbusto andino de fruto exótico perteneciente a la familia Solanaceae que prospera en los valles andinos húmedos, entre los 1200 y los 2100 m.s.n.m. (SICA, 2001). Fuera de las zonas similares a las de origen, la naranjilla es de difícil adaptación, reportándose casos en los que la planta llega a la florecencia, pero produce polen estéril (Durán, 1988 en Fori, 2005). Los específicos requerimientos para el cultivo de la naranjilla hacen que este arbusto sea de difícil adaptación en zonas templadas. La temperatura apropiada para su desarrollo varía entre 11°C y 20°C, además, requiere de escasa luminosidad y una precipitación anual de 1500 a 3000 mm que permita alcanzar una humedad relativa del 80% (Lobo y Medina, 2000 en Fori, 2005).

La planta se propaga por semilla o por estacas, alcanza la fructificación entre los 10 y 12 meses y se mantiene en producción de dos a cuatro años, generando hasta 135 frutos por año. Una vez cumplido el año desde su siembra, la producción se mantiene por un año y medio, con un rendimiento de 10 t/ha/año (SICA, 2001). Pese a estas características de producción, la naranjilla se encuentra aún en fase de domesticación, puesto que posee rasgos característicos que corresponden a individuos clasificados como “maleza-silvestres”. Dentro de estas características se pueden citar: frutos con elevado número de semillas, dispersión de semillas ineficiente, latencia en semillas, presencia de espinas en los tallos, pedúnculos, peciolos y hojas, presencia de tricomas en los frutos (Lobo, 2000 en Fori, 2005).

Desafortunadamente, el cultivo de naranjilla enfrenta problemas fitosanitarios, siendo una planta susceptible a varias plagas. Dentro de las plagas más importantes se reportan el nemátodo nodulador (*Meloidogyne incognita*) que genera nódulos y agallas en las raíces de la planta, dando lugar a ataques secundarios de otros microorganismos (Tamayo, 2001 en Fori, 2005); el gusano del fruto (*Neoleucinodes elegantalis*) un lepidóptero que produce la muerte de la planta y la caída del fruto (Revelo, 2000). Además, es susceptible al barrenador del tallo y ramas (*Alcidion* sp); al barrenador del cuello, (*Faustinus apicalis*); al gusano de la hoja, (*Machanitis isthma*); al áfido (*Myzus persicae*); a los hongos causantes de la lancha, (*Phytophthora infestans*); la mancha de la hoja, (*Septoria solanicola*); y la marchitez causada por *Fusarium* sp. (SICA, 2001).

Pese a los problemas fitosanitarios del cultivo de la naranjilla (conocida también como lulo en Colombia y como morella en Perú), esta fruta tropical es una de las más apetecidas como fruta fresca y como pulpa congelada en los mercados internacionales, especialmente en países como Estados Unidos, Japón y los países europeos (Lobo y Medina, 2000 en Fori, 2005). Es una fruta rica en vitaminas A y C; además, cada 100 g de parte comestible de naranjilla aporta a los consumidores 23 calorías y en promedio 5.7 g de carbohidratos; 0.6 g de proteína; 2.5 g de fibra; 9.15 mg de calcio; 28 mg de fósforo; 0.49 mg de hierro; 1.5 mg de niacina, entre otras vitaminas del complejo B. La naranjilla no solo es una fruta exótica de sabor especial y apetecido, sino que también cuenta con cualidades nutricionales que la convierten en una fruta con un gran potencial de comercialización en los mercados internacionales (SICA, 2001).

1.2.1. Situación de la naranjilla en Ecuador

La naranjilla es una fruta tradicional de Ecuador que se cultiva en la zona oriental del país, especialmente en los alrededores de Baños, Baeza, Puyo, Archidona, Loreto, Lago Agrio, Sucúa, Zamora, Lita, Nanegalito, Los Bancos, Chiriboga y Pallatanga, así como en el valle del río Quijos y alrededor del volcán Reventador. Dentro del país, el consumo de esta fruta es en estado fresco, principalmente para la elaboración de jugos, helados y mermeladas. Sin embargo, por su rápida perecibilidad, la exportación de la fruta en estado natural no ha tenido éxito, aunque sí se ha logrado la exportación en presentaciones de jugo, concentrado (pulpa) y fruta congelada (SICA, 2001).

Si se analizan los valores de exportación de todas las presentaciones, se aprecia que entre el año 1998 y 1999 éstas se incrementaron en alrededor del 70% y de 1999 al 2000 este valor se duplicó (Figura 1). Los principales países de destino de las distintas presentaciones de naranjilla ecuatoriana son Estados Unidos, Holanda y España, aunque se aprecia un incremento en los países europeos, por la demanda de los compatriotas residentes en dichos países. Por tratarse de un producto “exótico” cuyo mercado no se encuentra posesionado a nivel internacional, el precio de la naranjilla es variable; pese a esto, se puede estimar cierta tendencia a elevarse con el pasar de los años (Figura 2). Considerando el precio por kilogramo de todas las presentaciones en conjunto, se puede apreciar que el precio de exportación del año 1998 al año 1999 incrementó en un 17.2%, mientras que el precio del año 1999 al 2000 incrementó en 6.5% (SICA, 2001).

En Ecuador la fruta está disponible durante todo el año, pero la época de mayor demanda en países europeos es entre los meses de noviembre y mayo, la cual está relacionada con la baja oferta de frutas debido a la estacionalidad de estos países. Para que la fruta pueda ser exportada, debe cumplir con ciertos requisitos tales como: poseer un color intenso, tener una apariencia fresca y consistencia firme, tener total ausencia de picaduras de insectos, manchas por golpes o señales de marchitamiento. Para cumplir con la madurez requerida para la exportación, se cosechan las frutas cuando han alcanzado un color entre verde y amarillo, de tal manera que las frutas estén frescas y puedan resistir la manipulación que implica la exportación. El tamaño que la fruta de exportación debe alcanzar es de 5 a 6 cm de diámetro y un peso entre 90 y 140 g, de tal manera que se pueda asegurar que en las cajas ingresen de 20 a 30 frutas, con un peso por caja de 2.75 a 3 Kg. Debido a los convenios internacionales de preferencias arancelarias, la importación de la naranjilla ecuatoriana no está sujeta a la aplicación de aranceles. Por aplicación del Sistema Generalizado de Preferencias para los Países Andinos (SGP), Europa no aplica arancel en las exportaciones ecuatorianas de naranjilla. En el mismo orden, Estados Unidos no impone aranceles al producto ecuatoriano bajo el amparo de la Ley de Preferencias Arancelarias Andinas (LPAA). Por su parte, las exportaciones a los países de la Comunidad Andina de Naciones (CAN) están libres de gravámenes, según los acuerdos suscritos (SICA, 2001).

Debido que la naranjilla ecuatoriana y sus derivados tienen acogida a nivel internacional, vale la pena promocionar este producto a otros países del mundo. Sería importante hacer conocer a los consumidores sus cualidades de sabor, aroma y sus características nutricionales. Pero para lograr que la exportación de naranjilla ecuatoriana sea superior a la de sus competidores (Colombia, como el competido más

fuerte, Perú, Venezuela y Costa Rica) es necesario superar los problemas fitosanitarios que enfrenta este cultivo, así como también los problemas de perecibilidad de la fruta. Para ello, deben fomentarse programas de mejoramiento vegetal, capaces de satisfacer las necesidades de producción de los agricultores y las necesidades de calidad de los consumidores. En cuanto a las presentaciones de naranjilla procesadas (pulpa, jugo, fruta congelada) es indispensable fomentar técnicas agroindustriales que permitan hacer una mayor y mejor explotación de la naranjilla, generando un producto competitivo en el mercado internacional.

1.2.2. Mejoramiento Genético de la Naranjilla

El mejoramiento genético de la naranjilla ha sido escaso a nivel mundial, sin embargo, existen algunos reportes de mejoramiento convencional, a partir de la producción de híbridos. El primer híbrido interespecífico fue realizado por primera vez en Ecuador por el granjero Raúl Viteri, quien obtuvo el híbrido denominado “Puyo” entre *S. quitoense* y *S. sessiliflorum*. Este híbrido es altamente productivo y vigoroso, sin embargo, presenta ciertas desventajas, como la producción de semillas estériles, por lo que se debe reproducir vegetativamente por estacas; además, es un fruto pequeño que requiere la aplicación de la hormona 2- 4 D para incrementar su tamaño (Torre y Camacho 1981; Heiser y Anderson, 1999). Años más tarde, Heiser, de la Universidad de Indiana (USA) junto con el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) de Ecuador, obtuvieron el híbrido “Palora” que pesenta un fruto más grande, que no requiere el uso de 2 - 4 D, y cuyo jugo empieza a oxidarse pasadas las 24 horas desde su preparación, es decir, mucho después del jugo de la naranjilla convencional y que el jugo del híbrido “Puyo”. Sin embargo, el híbrido “Palora” no tuvo la aceptación

esperada en los consumidores, puesto que el color de la pulpa es blanco y el consumidor prefiere la pulpa de color verde (Heiser y Anderson, 1999).

Por otro lado, en Colombia se encuentra un híbrido mejorado, denominado lulo “La Selva” obtenido a partir del cruzamiento entre una variedad colombiana, *S. quitoense* Var Septentrional (una planta con muchas espinas, de fruto pequeño, pulpa amarilla e insípida y vellosidades en el fruto) y el doble retrocruzamiento con *S. quitoense* sin espinas proveniente de Ecuador. El híbrido resultante, “La Selva”, es una planta sin espinas, tolerante a nemátodos, que se puede sembrar a libre exposición solar, de frutos medianos, pulpa de color verde, con buen sabor y aroma, y con vellosidades en el fruto de fácil desprendimiento (Lobo, 2000 en Fori, 2005). El híbrido “La Selva” se comercializa únicamente a nivel local en Colombia puesto que es muy sensible al estropeamiento, haciéndolo inapropiado para su comercialización internacional (Fori, 2005).

Como se puede apreciar, los híbridos mejorados no logran satisfacer las necesidades de los agricultores y consumidores, puesto que aún poseen características indeseables, tales como la susceptibilidad a plagas, una coloración de pulpa poco apetecida, problemas de rápida perecibilidad y estropeamiento, así como un tamaño inadecuado del fruto. Todas estas características son heredadas de los parentales como consecuencia del cruzamiento sexual, lo que demuestra que el mejoramiento convencional en la naranjilla no ha solucionado los problemas de su cultivo y producción. Con los avances en el área de la biotecnología vegetal, se abre la posibilidad de incorporar características deseables a la naranjilla, pudiendo conseguirse

un mejoramiento dirigido y ajustado a satisfacer las necesidades específicas de los agricultores, así como las de los consumidores nacionales e internacionales.

En este estudio se estableció un protocolo de transformación genética para *Solanum quitoense* mediante el uso de *Agrobacterium tumefaciens*, con plásmido pBI121, logrando introducir a células de explantes de peciolo de naranjilla los genes GUS y NPTII, alcanzando una eficiencia de transformación genética de hasta el 27.5%.

2. Objetivo General

Establecer un protocolo de transformación genética para la naranjilla, *Solanum quitoense*, mediante la utilización de la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LB004, con plásmido pBI121

3. Objetivos Específicos

Establecer un protocolo de regeneración in vitro de naranjilla a partir de explantes de peciolo.

Determinar las condiciones apropiadas para la transformación genética de naranjilla utilizando la cepa bacteriana *Agrobacterium tumefaciens* LB004 que contiene el plásmido pBI121.

Verificar el éxito del proceso de transformación en plantas de naranjilla usando técnicas moleculares.

4. Justificación

En vista de que la naranjilla es un cultivo nativo y tradicional del Ecuador; dado que esta fruta tiene un gran potencial de comercialización en el exterior; y siendo conscientes de que el mejoramiento convencional no ha logrado satisfacer las necesidades de los agricultores y consumidores; es importante establecer técnicas biotecnológicas modernas de mejoramiento vegetal que ayuden a superar las limitaciones de producción, comercialización y exportación de la naranjilla.

Es necesario encontrar, a través de la biotecnología, mecanismos dirigidos al desarrollo sostenible de la agricultura, que sean amigables con el ambiente. Indiscutiblemente, la investigación biotecnológica ha traído consigo el impulso económico de las naciones, tanto para países desarrollados como para países en vías de desarrollo. Tal es el caso de Argentina, un país que después de la crisis económica del 2002 pudo salir adelante gracias a las exportaciones de cultivos modificados genéticamente como la soya, el maíz y el algodón, generados a partir de estas técnicas modernas de mejoramiento vegetal; convirtiéndose en el segundo país mega-productor de transgénicos (ISAA, 2007). En esta época, en la que hemos sido testigos de las innumerables pérdidas de alimento a causa de las inclemencias del clima, la seguridad alimentaria en los países más pobres se ve amenazada (FAO, 2008). Es por ello que, estos países deben emplear los mecanismos existentes para mejorar la producción interna de los alimentos tradicionales de consumo. Si la situación actual se mantiene, resulta irrefutable que el uso de las herramientas biotecnológicas puede lograr satisfacer, en parte, las necesidades de producción de alimento, puesto que son técnicas dirigidas e implican menor tiempo que las técnicas de mejoramiento convencional.

Ecuador, como un país en vías de desarrollo y como un país dependiente de la agricultura, no puede quedarse atrás de otros países en cuanto a los avances tecnológicos y a las innovaciones en el campo agrícola. Es imperativo para nuestro país establecer centros de investigación biotecnológica, que sigan procesos de bioseguridad, capaces de garantizar el desarrollo sostenible de la agricultura y preparados para asegurar la calidad de los productos tradicionales de consumo nacional, con proyección a su comercialización internacional. Consecuente con las necesidades expuestas con anterioridad, el presente proyecto pretende establecer un protocolo de transformación genética para la naranjilla haciendo uso de un gen reportero y de un gen de selección, con el propósito final de poder emplearlo como herramienta de mejoramiento vegetal para el futuro.

El presente proyecto es de suma importancia puesto que se trata de un proyecto innovador a nivel nacional y mundial, que pretende demostrar que es factible lograr el mejoramiento vegetal de la naranjilla a partir de la transformación genética. A la vez, este proyecto podrá ser utilizado como el punto de partida para nuevas investigaciones en el mejoramiento de la naranjilla, abriendo la posibilidad de superar las limitaciones en cuanto a la producción, manejo y comercialización de la fruta.

5. Área de Estudio

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

6. Materiales, reactivos y equipos

6.1. Material vegetal

Naranjilla proveniente de semillas adquiridas en el Mercado “La Ofelia” al norte de la ciudad de Quito. Estas semillas se desinfectaron y se sembraron in vitro para promover su germinación. Con plantas de 10 a 12 semanas de edad se extrajo explantes de peciolo para los ensayos de transformación.

6.1.1. Desinfección de Semillas

Solución de alcohol potable al 70%

Solución de Hipoclorito de Sodio al 2.5%

Tween 20

Agua destilada estéril

Cámara de flujo laminar LABCONCO *Horizontal Clean Beach*

Vasos de precipitación de 250ml y 1000 ml

Pinzas estériles

Cedazo metálico estéril

Cajas petri de vidrio estériles

6.2. Cepa Bacteriana utilizada para la Transformación Genética

Cepa *Agrobacterium tumefaciens* LB004, con plásmido pBI121, con gen reportero GUS (β -glucoronidasa) y gen de selección NPTII (neomycinphosphotrasnferasa) que otorga resistencia al antibióticokanamicina (Figura 3).

6.2.1. Medio para la germinación de semillas

Medio MS (Murashige y Skoog, 1962) 30 gL⁻¹ de sacarosa, 7 gL⁻¹ de agar y pH 5.8

6.2.2. Medio de cultivo para la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* y equipos para su multiplicación y cuantificación

Medio LB de invitrogen

Estreptomicina 100mgL⁻¹

Sulfato de Kanamicina 100mgL⁻¹

Rifampicina 100mgL⁻¹

Incubadora Labline *Imperial II*

Espectrofotómetro Pharmacia Biotech *Ultraspec 2000*

Celdas de cuarzo

Baño María con Agitación Labline *Orbit*

6.3. Transformación Genética de Explantes de Naranjilla

Peciolos provenientes de naranjillas germinadas de 10 a 12 semanas de edad

Cepa de *Agrobacterim tumefaciens* LB004 con plásmido pBI121

Medio MS (Murashige y Skoog, 1962) líquido, 30 gL⁻¹ de sacarosa y pH 5.8

Cámara de flujo Laminar LABCONCO *Horizontal Clean Beach*

Centrífuga Eppendorf *5415D*

Agitador Orbital Bellcobiotechnology *DHLJD-1933*

6.3.1. Medio de co-cultivo

Medio MS (Murashige y Skoog, 1962) 30 gL⁻¹ de sacarosa, 7 gL⁻¹ de agar y pH 5.8

Benzil amino purina (BAP) 4.5 mgL⁻¹

Ácido naftalén acético (NAA) 0.01 mgL^{-1}

Ácido giberélico (GA_3) 0.1 mgL^{-1}

6.3.2. Medio de regeneración de plantas de naranjilla

Medio MS (Murashige y Skoog, 1962) 30 gL^{-1} de sacarosa, 7 gL^{-1} de agar y pH 5.8

Benzil amino purina (BAP) 4.5 mgL^{-1}

Ácido naftalén acético (NAA) 0.01 mgL^{-1}

Ácido giberélico (GA_3) 0.1 mgL^{-1}

Cefotaxima 300 mgL^{-1}

6.3.3. Medio de Selección de células transformadas

Medio MS (Murashige y Skoog, 1962) 30 gL^{-1} de sacarosa, 7 gL^{-1} de agar y pH 5.8

Benzil amino purina (BAP) 4.5 mgL^{-1}

Ácido naftalén acético (NAA) 0.01 mgL^{-1}

Ácido giberélico (GA_3) 0.1 mgL^{-1}

Cefotaxima 300 mgL^{-1}

Sulfato de Kanamicina 100 mgL^{-1}

6.4. Extracción de ADN de plantas de naranjilla

Hojas de plantas de naranjilla regeneradas em médio de selección

CTAB 2X

β -mecaptoetanol ($10 \text{ }\mu\text{L/mL}$ de CTAB2X)

Cloroformo/Alcohol Isoamílico 24:1

Alcohol Isorpopílico

Etanol al 76%

Tris EDTA pH 8 estéril

Baño de arena Thermolyne *DB104435*

Centrífuga Eppendorff *5415D*

6.5. Cuantificación de ADN de naranjilla

Muestra de ADN

Fluorómetro Invitrogen/ Qubit®

Kit de cuantificación Invitrogen *Quant-iT dsDNA BR*

6.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Agua DNAsa/RNAsa free estéril

Buffer 10X para PCR invitrogen

MgCl₂ 1.5 mM invitrogen

dNTP's 20mM

Taq Polimerasa invitrogen

Primers gen GUS 10mM cada uno

Secuencia 5' – 3' CCC GCT TCG AAA CCA ATG CC

Secuencia 3' – 5' ACG TCC TGT AGA AAC CCC AA

Primers gen NPTII 10 mM cada uno

Secuencia 5' – 3' TAT TCG GCT ATG ACT GGG CA

Secuencia 3' – 5' GCC AAC GCT ATG TCC TGA T

Blue Juice 10X invitrogen

Tubos Eppendorf de 1.5 mL

Tubos de 100 uL

Termociclador Techne *TC -412*

Centrífuga Eppendorff *5415D*

6.7. Electroforesis en gel de agarosa

Tris Borato EDTA (TBE) 1X

Agarosa 1% Seakem

Sybr™ Safe Invitrogen DNA gel stain 10.000X

Marcador de peso molecular Invitrogen TrackIt 100 bp DNA ladder

Cámara de electroforesis horizontal *MGU 502 T*

Cámara Digital Kodak *DC 290 Zoom*

Transiluminador Vilber Lourmat *TFX 35 M*

Software Kodak ID

Fuente de Poder para cámara de electroforesis Fisher Scientific *FB300*

7. Metodología

7. 1. Cultivo in vitro de Naranjilla

7.1.1. Obtención de semillas de naranjilla

Se tomaron tres frutos maduros de naranjilla adquiridos en uno de los mercados de Quito, con apariencia, color y tamaño similar. Se cortó los frutos y se extrajo con mucho cuidado las semillas junto con la placenta. Tras varios lavados y con sumo cuidado se separó las semillas y se las colocó en un tamiz hasta que se elimine toda el agua. A continuación se colocó las semillas en papel absorbente por 48 horas, tras lo

cual se tomó una por una las semillas y se las colocó en un frasco de vidrio limpio y seco.

7.1.2. Desinfección de las semillas de naranjilla

Dentro de una cámara de flujo laminar, se colocó las semillas en una vaso de precipitación que contenía 150 mL de alcohol al 70% por 3 minutos. A continuación se lavó las semillas con agua destilada estéril y se las colocó en 150 mL de hipoclorito de sodio al 2.5% con 4 gotas de tween 20 por 15 a 18 minutos, con agitación cada 5 minutos. Posteriormente se hizo cuatro lavados con agua destilada estéril hasta eliminar por completo los residuos de detergente en las semillas. A continuación las semillas fueron colocadas en cajas petri de vidrio estériles con papel absorbente estéril para su posterior siembra en el medio MS.

7.1.3. Germinación de semillas de naranjilla

Para lograr la germinación de semillas se utilizó el medio estéril MS (Murashige y Skoog, 1962) 30 gL⁻¹ de sacarosa, 7 gL⁻¹ de agar y pH 5.8, el mismo que se repartió en frascos de vidrio. Dentro de la cámara de flujo laminar, con ayuda de pinzas estériles, se colocó de 10 a 12 semillas por frasco, se los selló con ayuda de papel plástico y se los rotuló apropiadamente, señalando la fecha de cultivo, el medio de cultivo, el nombre de la planta y el nombre de quien efectuó el trabajo. Finalmente, los frascos fueron llevados al cuarto de cultivo para la germinación de las semillas y el posterior desarrollo de las plantas con un fotoperiodo de 16 horas luz / 8 horas oscuridad.

7.2. Cultivo de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*

La cepa de *A. tumefaciens* utilizada para este ensayo fue la cepa LB004 con el plásmido pBI112, la misma que fue donada por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Castelar, Argentina.

En vista de que la cepa de *A. tumefaciens* LB004/pBI121 se encontraba en glicerol a -80°C , se procedió a reactivar a las bacterias en medio LB líquido por 18 a 20 horas a 28°C de temperatura. Al día siguiente, las bacterias fueron colocadas, a manera de cultivo denso, en un medio LB sólido selectivo, que contenía estreptomicina (100mgL^{-1}), rifampicina (100mgL^{-1}) y sulfato de kanamicina (100mgL^{-1}) por 24 horas a 28°C . Las bacterias que crecieron en el medio sólido selectivo, fueron resuspendidas en 2 mL de TE estéril e inmediatamente se transfirió 1 mL de esta suspensión bacteriana a 90 mL del medio selectivo líquido. Este medio líquido selectivo junto con la suspensión bacteriana fue colocado en baño maría a 28°C y con agitación de 200 rpm, durante 4 horas, con el propósito de que las bacterias se encontraran en fase exponencial de crecimiento, es decir, cuando la suspensión bacteriana alcanzaba una O.D de 0.9 - 1 a 600 nm (Para detalles de los medios empleados, ver Tabla 1).

Luego de este período de incubación, se tomaron 10 tubos eppendorff estériles de 1.5 mL y se colocó en cada uno de ellos 1 mL de la suspensión bacteriana. A continuación se centrifugó a 7000 rpm por 5 minutos con el objetivo de precipitar las bacterias en el fondo de cada tubo. Finalmente, las bacterias fueron resuspendidas en 1 mL de medio MS líquido, para iniciar el proceso de transformación genética.

7.3. Proceso de Transformación Genética de Naranjilla, mediante *A. tumefaciens* usando Explantes de Peciolo

Este protocolo de transformación genética está basado en el método de transformación genética de tomate de árbol *Solanum betacea*, descrito por Arias (2007), con ciertas modificaciones. Es importante señalar que se hicieron once ensayos de transformación genética, en los que se modificaron ciertos factores (Tabla 4).

7.3.1. Obtención de Explantes

Dentro de la cámara de flujo laminar, se separó con mucho cuidado los peciolo de los tallos y las hojas de plantas de naranjilla provenientes de cultivo in vitro, de 10 a 12 semanas de edad, cuyos peciolo se encontraban en un tamaño entre 1.0 y 1.5 cm de longitud. De un total de 80 peciolo, para cada experimento, 40 peciolo sólo tuvieron las heridas laterales, producto de la separación del tallo y de la hoja denominados S.C (sin cortes adicionales), mientras que a los 40 peciolo restantes se les provocó una herida longitudinal, denominada H.L (herida longitudinal) o tres cortes perpendiculares denominada C.P (Figura 4).

7.3.2. Proceso de Inoculación y Agro-infección

Los 80 peciolo fueron colocados en 4 cajas petri de vidrio estériles: 2 cajas petri con 20 peciolo S.C cada una y 2 cajas petri con 20 peciolo H.L/C.P cada una. Cada caja petri contuvo 18 mL de medio MS líquido estéril, y una vez que los 20 peciolo se encontraban en la caja, se prosiguió a colocar 2 mL de la suspensión bacteriana. Los

peciolos estuvieron en contacto con la bacteria en esta solución durante 5 minutos en luz y por 15 minutos en oscuridad a 20 rpm. A continuación, los peciolos fueron secados en papel absorbente estéril, y colocados en medio de co-cultivo (Tabla 2) por 48 horas.

7.3.3. Selección y Regeneración

En los primeros cinco ensayos de transformación, se hizo una selección temprana de los explantes de peciolo después del periodo de co-cultivo, cuyos detalles se encuentran especificados en la Tabla 3. En términos generales, algunos explantes de peciolo fueron colocados directamente en medio selectivo, con kanamicina, después del co-cultivo, mientras que otros explantes de peciolo, fueron primero colocados durante un periodo máximo de 2 semanas en medio de regeneración antes de ser colocados en un medio selectivo que contenía 100 mgL^{-1} de kanamicina.

En los posteriores ensayos de transformación, se hizo una variante en cuanto al tiempo que los peciolos permanecieron en medio de regeneración con cefotaxima antes de pasarlos a medio selectivo (Tabla 3). Para esto, se siguió el protocolo de transformación genética en papa descrito por López y Chaparro (2007), en el que se sugiere dejar más tiempo a los explantes transformados en medio de regeneración antes de pasarlos al medio de selección. De tal manera que para los siguientes ensayos de transformación (del ensayo 6 al 11), los 80 peciolos que estuvieron en co-cultivo pasaron al medio de regeneración (Tabla 2) en el cual permanecieron por 3 semanas, y, una vez cumplido este lapso de tiempo, fueron transferidos al medio selectivo, el mismo que fue renovado cada 3 semanas. Por otro lado, se tomaron 20 peciolos adicionales: 10 S.C y 10 H.L/C.P que se utilizaron como control. Estos últimos 20 peciolos nunca

estuvieron en contacto con *A. tumefaciens* y pasaron directamente al medio de regeneración, en el que permanecieron durante tres semanas. Cuando los peciolo transformados fueron colocados en medio selectivo, la mitad de los 20 peciolo control (5 S.C y 5 H.L/C.P) fueron colocados en medio selectivo para comparar los efectos de la kanamicina entre los peciolo no transformados y transformados; mientras que la otra mitad de los peciolo control (5 S.C y 5 H.L/C.P) continuaron su desarrollo en el medio de regeneración para comparar la regeneración de los peciolo no transformados y los que pasaron por un proceso de transformación.

Finalmente, los retoños regenerados fueron llevados a medio MS sólido con 100 mgL⁻¹ de sulfato de kanamicina. Las plantas que sobrevivieron por 21 días en kanamicina, fueron llevadas durante 2 semanas a medio MS con 2 mgL⁻¹ de IBA para promover su enraizamiento y una vez transcurrido este tiempo, las plántulas fueron colocadas en medio MS donde continuaron con su desarrollo en condiciones in vitro.

7.3.4. Diferencias en los ensayos de transformación: Desde el ensayo de transformación 6 hasta el ensayo de transformación 11

En vista de que el objetivo de este proyecto es establecer un protocolo de transformación genética, se tomaron en consideración ciertos factores que podían incrementar la eficiencia de regeneración y transformación. Estos factores se encuentran detallados en la Tabla 4.

7.3.5. Nomenclatura de identificación de retoños

Cada ensayo de transformación fue enumerado, y, en cada uno de los ensayos se le asignó un número a los explantes de peciolo, desde el número 1 hasta el número 80. En el caso de que de un mismo callo surgía más de un retoño, éstos fueron enumerados desde el 1 para el primer retoño, 2 para el segundo y así sucesivamente. En el caso de las plántulas obtenidas, cada una de ellas fue identificada por tres números separados por un punto, el primer número correspondía al ensayo de transformación, el segundo número correspondía al explante de peciolo del cual provino y el tercer número correspondía al número de retoño de dicho explante. Así por ejemplo, el número 6.32.2, quiere decir que esa es una planta proveniente del ensayo de transformación 6, del peciolo 32 y que se trata del segundo retoño del peciolo 32.

7.4. Verificación del Proceso de Transformación Genética

Se evaluó el proceso de transformación genética de las plantas potencialmente transformadas a través de la técnica molecular PCR, empleando primers para la amplificación de fragmentos de los genes GUS (1028 pb) y NPTII (517pb).

7.4.1. Extracción de ADN de plantas de naranjilla potencialmente transformadas

De todas las plantas que sobrevivieron en medio selectivo con 100 mg/ml de kanamicina por 21 días se tomaron 2 a 4 hojas jóvenes y se prosedió a la extracción de ADN, siguiendo el protocolo descrito por Shagai Maroof, et al (1984), con ciertas modificaciones.

Dos hojas de plántulas potencialmente transformadas se colocaron en morteros que contenían 800 μL de CTAB 2X y se trituraron hasta obtener un líquido de color verde. A continuación, el contenido de cada mortero fue colocado en un tubo eppendorff rotulado con el número de la planta correspondiente y se agregó 8 μL de β -mercatoetanol dentro de una campana de extracción de gases. Posteriormente, los tubos fueron colocados en baño de arena a 62°C durante una hora, con agitación cada 15 minutos. Una vez transcurrida la hora en el baño de arena, se colocó en cada tubo 500 μL de la solución Cloroformo: Alcohol Isoamílico 24:1, se los agitó y se los dejó reposar por 20 minutos. Seguidamente, los tubos fueron llevados a centrifugación durante 20 minutos a 13000 rpm. Con ayuda de una micropipeta se extrajo el sobrenadante de color transparente de cada tubo y se lo transfirió a un nuevo tubo eppendorff correctamente identificado; mientras que el resto del líquido del tubo original, de color verde, fue descartado. A los tubos que contenían el sobrenadante recuperado se les agregó un volumen de isopropanol frío (4°C) y se los invirtió con suavidad hasta observar los hilos de ADN y su posterior agregación. Con el propósito de juntar todas las moléculas de ADN, se puso los tubos a centrifugar a 5000 rpm durante 2 minutos. Se retiró el sobrenadante, dejando en cada frasco únicamente el pellet de ADN y sobre éste se puso 800 μL de etanol al 76% con el propósito de lavar el pellet de ADN y eliminar los restos del buffer de extracción. Posteriormente se retiró el alcohol y se resuspendió el pellet de ADN en 50 μL de TE estéril.

7.4.2. Cuantificación y Dilución de ADN

Para la cuantificación de ADN se empleó el fluorómetro Invitrogen / Qubit® y el respectivo kit de cuantificación Invitrogen Quant – iT dsDNA BR.

7.4.2.1. Preparación de la Solución de Trabajo (Working Solution)

Para cada una de las muestras de ADN que se pretendía cuantificar, era necesario preparar la solución de trabajo (working solution). Ésta se obtuvo con 199 μL del componente B del kit (dsDNA BR buffer) y 1 μL del componente A del kit (fluoróforo, reagent 200X). Es decir, para cada muestra de ADN que se pretendió analizar, se preparó 200 μL de solución de trabajo.

7.4.2.2. Preparación de las muestras de ADN para la cuantificación y dilución

Dentro del kit de cuantificación se incluyen dos estándares que sirven para la cuantificación de las muestras de ADN. Los estándares 1 y 2 se preparan con 190 μL de la solución de trabajo más 10 μL del componente C y D respectivamente. Una vez reconocidos los estándares por el fluorómetro, se procedió a cuantificar el ADN de las muestras, para lo cual se colocó 198 μL de solución de trabajo y 2 μL del ADN de la planta potencialmente transformada en los tubos de cuantificación. Este contenido se mezcló con vortex y se dejó reposar por 2 minutos, a temperatura ambiente, antes de medir la cantidad de ADN.

Cuando se cuantificaron todas las muestras, se procedió a hacer las respectivas diluciones, con el objetivo de obtener una concentración final de 20ng/μL para el ADN de cada planta potencialmente transformada.

7.5. Amplificación de Segmentos de los Genes GUS y NPTII mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Con el propósito de verificar eventos de transformación, se procedió a realizar la búsqueda de la presencia de los genes GUS y NPTII en el ADN de las plantas potencialmente transformadas. Esta búsqueda molecular utilizó como herramienta la reacción en cadena de la polimerasa, PCR. Los primers utilizados fueron sintetizadas por Invitrogen, cuyas secuencias se obtuvieron de Arias (2007); Chávez (2003); Martínez, et al (2006) y se encuentran detalladas en la Tabla 6. Para la PCR se preparó la denominada “master mix”, un grupo de reactivos que junto con el ADN y un buen programa en el termociclador, permiten la amplificación de una región particular de ADN. Las cantidades de cada reactivo utilizado para preparar la “Master Mix” se encuentran detalladas en la Tabla 5.

Para cada PCR se empleó 8μL de Master Mix y 2 μL de la muestra diluida (20ng/μL) de ADN de la planta potencialmente transformada, de tal manera que el volumen final para cada reacción de PCR fue de 10 μL. Todos los PCR's que se efectuaron tuvieron dos controles: un control negativo, correspondiente a una planta de naranjilla crecida in vitro sin transformar, y un control positivo, correspondiente al plásmido pBI121. Los programas empleados en el termociclador fueron tomados de

Arias (2007) para el gen GUS y de Chávez (2003) y Martínez, et al (2006) para el gen NPTII. Estos programas se detallan en la Tabla 7.

7.6. Resolución de Productos Amplificados mediante Electroforesis en Gel de Agarosa

El producto resultante de la PCR para los genes GUS y NPTII fue analizado en gel de agarosa al 1%. Cada gel de agarosa fue preparado con 100 mL de TBE 1X y 1 g de agarosa. La agarosa se disolvió por calentamiento en el horno microondas por 2 minutos y medio, agitando cada 30 segundos, hasta lograr una solución cristalina. Luego se dejó enfriar a una temperatura tolerable al tacto y se colocó 8 μ L de Sybr Safe. A continuación se armó la cámara de electroforesis y se vertió la solución de agarosa en el molde de la cámara y se la dejó solidificar junto con el peine que da lugar a los pocillos de carga. Una vez frío el gel, se colocó en toda la cámara el buffer o solución tampón TBE 1X, cubriendo al gel. A los tubos que contenían los productos de PCR se les colocó 2 μ L de blue juice (buffer de carga) y a continuación se procedió a cargar 10 μ L de esta mezcla en cada uno de los pocillos del gel. El primer posillo siempre contuvo 3 μ L de Ladder Tracklt 100 bp, el segundo posillo contenía al control negativo (ADN de naranjilla no transformada), los siguientes posillos contenían cada una de las muestras y el último posillo contenía el control positivo (pBI121). El gel se corrió a 80 voltios durante 1 hora y media. Una vez concluido el proceso, se tomó una foto al gel y se lo descartó, siguiendo las normas de bioseguridad establecidas en el laboratorio.

8. Resultados

8.1. Regeneración de los Explantes de Pecíolo sometidos a Transformación

En los primeros 5 ensayos de transformación genética no se obtuvo retoños provenientes de los explantes de pecíolos sometidos al proceso de transformación genética. Los pecíolos que fueron colocados en medio selectivo directamente después del co-cultivo murieron en su totalidad en un periodo máximo de 2 semanas. Los pecíolos que fueron colocados en medio de regeneración por 2 semanas empezaron a mostrar formación de callo, sin embargo, cuando se les pasó al medio de selección murieron en su totalidad a las 3 semanas. Por otro lado, de los 20 pecíolos empleados como control, 10 fueron colocados en medio selectivo con kanamicina directamente, los mismos que mostraron necrosis a partir del séptimo día. Los otros 10 pecíolos control fueron colocados en medio de regeneración en el que tuvieron un desarrollo normal y hubo regeneración de retoños a partir del día 22.

En los posteriores ensayos de transformación (6 al 11) en los cuales los explantes de pecíolo tuvieron un tratamiento de selección tardía (después de 3 semanas), se pudo apreciar la regeneración de retoños en algunos pecíolos, aunque también hubo pecíolos que murieron.

8.1.1. *Ensayo de Transformación 6*

En el ensayo de transformación número 6, de los 80 explantes de pecíolo empleados para la transformación genética, 56 murieron a las 3 semanas de estar en

contacto en el medio que contenía kanamicina y 24 mostraron callo. De estos 24 explantes con callo, 13 regeneraron un total de 15 retoños. De estos 15 retoños, 5 sobrevivieron por más de 21 días en medio MS con kanamicina (100 mgL^{-1}) y 10 murieron. Por su parte, los 10 explantes de peciolo control que fueron colocados en medio con kanamicina se necrosaron y murieron entre el día 12 y 17. Los 10 explantes de peciolo control restantes que permanecieron en medio de regeneración mostraron los primeros brotes a partir de los días 21 a 28. De estos 10 peciolos control en medio de regeneración se obtuvo un total de 24 retoños, además, todos los peciolos control mostraron callo y regeneraron por lo menos un retoño.

8.1.2. *Ensayo de Transformación 7*

En el ensayo de transformación 7, de los 80 explantes de peciolo sometidos a transformación, 63 murieron a las 3 semanas de permanecer en el medio selectivo y 19 se mantuvieron viables. De estos 19 explantes con callo, 8 regeneraron un total de 10 retoños. De estos 10 retoños, 6 sobrevivieron por 21 días al efecto de la kanamicina y 5 murieron. Los 10 explantes de peciolo control que fueron colocados en medio con kanamicina murieron en su totalidad en el día 18. De los otros 10 explantes de peciolo control que permanecieron en el medio de regeneración, regeneraron un total de 9 explantes, 7 de los cuales provinieron de los 5 peciolos con corte S.C (Sin cortes adicionales), mientras que los 2 restantes provinieron de 2 peciolos con cortes C.P (Cortes perpendiculares)

8.1.3. Ensayo de Transformación 8

De los 80 explantes de peciolo inoculados con *A. tumefaciens*, 43 murieron al estar en contacto con el medio delectivo durante 6 semanas, 31 mostraron callo pero no regeneraron y 6 explantes de peciolo con callo regeneraron un total de 8 retoños. Una vez colocados los 8 retoños en medio MS con kanamicina durante 21 días, ninguno sobrevivió y todos murieron. De los 20 peciolos que se emplearon como control, 10 fueron colocados en kanamicina, los cuales murieron en su totalidad; de los otros 10 peciolos colocados en medio de regeneración solo regeneraron 6 peciolos.

8.1.4. Ensayo de Transformación 9

De los 80 explantes de peciolo empleados para la transformación, 41 murieron después de permanecer en medio selectivo con kanamicina durante 6 semanas, 26 formaron un callo sin indicios de regeneración y 10 regeneraron un total de 13 retoños. Cuando los retoños fueron colocados en medio MS con kanamicina sobrevivieron 7 por 21 días y 6 murieron. Por su parte, los peciolos empleados como control tuvieron en medio selectivo con kanamicina murieron entre los 12 y 17 días, mientras que 8 de 10 peciolos en medio de regeneración formaron un total de 13 retoños.

8.1.5. Ensayo de Transformación 10

En este ensayo de transformación, 57 explantes de peciolo de 80 murieron al estar en medio con kanamicina durante 6 semanas, además se obtuvo un total de 18 explantes con callos que no regeneraron y 10 explantes de peciolo que regeneraron un

total de 14 retoños. De estos 14 retoños 7 sobrevivieron en medio MS con kanamicina por 21 días y 7 murieron. Los peciolo empleados como control tuvieron un comportamiento similar al del ensayo de transformación 7, ya que los 10 peciolo en kanamicina murieron a los 16-18 días y los 5 peciolo en medio de regeneración cuyo corte fue S.C (Sin cortes adicionales) regeneraron en su totalidad, mientras que de los 5 peciolo de corte C.P (corte perpendicular) únicamente regeneraron 2. De estos controles se obtuvo un total de 10 retoños.

8.1.6. *Ensayo de Transformación 11*

En el ensayo 11, de los 80 explantes de peciolo empleados para la transformación genética, todos se mantuvieron viables en el medio de regeneración, pero 37 murieron a las 3 semanas de estar en contacto con kanamicina y 43 mostraron callo. De estos 43 explantes con callo, 20 regeneraron un total de 32 retoños. De estos 32 retoños, 27 sobrevivieron por más de 21 días en medio MS con kanamicina (100 mgL^{-1}) y 5 murieron. Por su parte, los peciolo empleados como control tuvieron un comportamiento similar al del ensayo de transformación 6, ya que los 10 explantes de peciolo control que fueron colocados en medio con kanamicina se necrosaron y murieron entre el día 12 y 17. Los 10 explantes de peciolo control restantes que permanecieron en medio de regeneración mostraron brotes entre los días 21 y 28. De estos 10 peciolo control en medio de regeneración se obtuvo un total de 28 retoños, además, todos los peciolo control mostraron callo y regeneraron entre 2 y 3 retoños por cada explante de peciolo.

8.2. Pruebas Moleculares de los Retoños Potencialmente Transformados

A todos aquellos retoños que sobrevivieron por más de 21 días en medio MS con kanamicina, se les hizo extracción de ADN, su cuantificación y su posterior análisis molecular a través de PCR para determinar la presencia de los genes GUS y NPTII en sus genomas. Se obtuvo un total de 30 retoños transformados genéticamente, de los cuales se encontró 15 retoños positivos para los genes GUS y NPTII y 15 retoños positivos únicamente para el gen NPTII.

De los 5 retoños analizados provenientes de la transformación 6, se encontró que todos fueron positivos para ambos genes; los retoños 6.11.1 - 6.16.1 – 6.32.1 – 6.39.1 y 6.41.1. Se generó una eficiencia de transformación del 6.25 % puesto que de 80 explantes de peciolo empleados para la transformación 6, 5 regeneraron plantas que recibieron el T-DNA de la bacteria a su genoma (Figura 5 y 6).

De los 6 retoños de la transformación 7 analizados molecularmente, se encontró 1 retoño positivo únicamente para el gen NPTII, generando una eficiencia de transformación del 1.25%. El retoño positivo fue el 7.4.1.

En el caso de la transformación 8, ninguno de los retoños regenerados sobrevivió al efecto de la kanamicina, y por lo tanto, hubo una eficiencia de transformación del 0%

En la transformación 9, de los 7 retoños analizados molecularmente, se obtuvo 1 retoño transformado. El retoño 9.57.1 presentó únicamente el gen NPTII en su genoma, generando una eficiencia de transformación del 1.25%.

De 7 retoños analizados molecularmente en la transformación 10, solo 1 retoño, el 10.64.1, resultó positivo para el gen NPTII, generando una eficiencia de transformación del 1.25% (Figura 7).

En el ensayo de transformación 11, de 27 retoños analizados, 10 resultaron positivos para ambos genes, GUS y NPTII, estos retoños son: 11.15.2; 11.15.3; 11.23.2; 11.25.1; 11.33.1; 11.34.1; 11.48.1 11.62.2; 11.68.1 y 11.70.1. Además, 12 retoños más resultaron positivos únicamente para el gen NPTII; estos retoños son: 11.4.1; 11.15.1; 11.20.1; 11.23.1; 11.28.1; 11.49.1; 11.55.1; 11.58.1; 11.62.1; 11.63.1; 11.64.1 y 11.65.1. Obteniéndose para este ensayo de transformación una eficiencia del 27.5% (Figura 8).

9. Discusión

De manera general se puede apreciar que los ensayos de transformación 6 y la transformación 11 obtuvieron los porcentajes de eficiencia de transformación más elevados (Tabla 9). Al mismo tiempo se puede apreciar que para ambas transformaciones se tomaron exactamente los mismos factores en cuanto a la edad de los explantes, su longitud, el número inicial de explantes y el tiempo de éstos en los diferentes medios. (Tablas 3 y 4) De acuerdo a Petri (2005) existen varios factores que influyen en la eficiencia de regeneración y transformación, entre los cuales se cita el tamaño del explante, la edad del explante y su respectivo estado fisiológico. Un tamaño muy pequeño o muy grande del explante puede inhibir la formación de callo y la regeneración de retoños al aprovechar de manera inadecuada las hormonas presentes en

el medio (Petri, 2005). Al trabajar con peciolo de 1 a 1.5 cm de longitud, se pudo apreciar que se obtuvo el mayor número de peciolo regenerando y la mayor cantidad de retoños. Por su parte, la edad del explante y su estado fisiológico también son importantes en el proceso de transformación y regeneración, puesto que se garantiza un mayor éxito al trabajar con tejidos que presentan una división activa o que se encuentran en un proceso de crecimiento (Petri, 2005; Pierik, 1987). Para el presente trabajo, se obtuvo mayor éxito en la regeneración y transformación al emplear peciolo provenientes de plantas germinadas de 10 a 12 semanas de edad. Además, el genotipo es un factor determinante en la transformación, ya que usando un protocolo establecido para una determinada especie no se obtienen los mismos resultados que para otra, incluso entre variedades las eficiencias de transformación varían de manera significativa (Petri, 2005).

Otra característica de la transformación 6 y transformación 11 es el tipo de heridas que se realizó en los explantes de peciolo; la herida S.C, sin cortes adicionales, que sólo consistió de los cortes laterales que separan al peciolo de la hoja por un extremo y del tallo por el otro extremo; y la herida longitudinal H.L, que consistió en un ligero corte a lo largo del peciolo (Figura 4). En todos los ensayos de transformación en los que se utilizó este tipo de corte, se pudo apreciar mayor regeneración respecto a los ensayos en los que se empleó el tipo de corte C.P (cortes perpendiculares), esto pudo deberse a que el tipo de corte C.P generó más heridas, lesionó al explante de peciolo y lo redujo en partes más pequeñas, impidiendo su regeneración. López y Chaparro (2007) afirman que muchos cortes en un mismo explante pueden ocasionar mayor ingreso de la bacteria a las células internas del explante, sin embargo, sostienen que

muchos cortes también pueden inducir efectos deletéreos en los explantes, especialmente si quedan porciones pequeñas de tejido vegetal entre cada corte.

En muchos protocolos de transformación genética mediada por *A. tumefaciens*, se da gran importancia al estado fisiológico de la bacteria, estableciéndose que las bacterias en estado de crecimiento exponencial incrementan la eficiencia de transformación (Atkinson y Gardner, 1994; Chávez et al, 2003; Petri, 2005; Millam, 2006; López y Chaparro, 2007). De acuerdo a diferentes protocolos de transformación genética mediante *A. tumefaciens* para diversas especies vegetales, se establece que la densidad óptica apropiada para llegar a la fase exponencial bacteriana se encuentra entre 0.8 y 1 en 600 nm (Chávez et al, 2003; Petri, 2005; Martínez, 2006; Millam, 2006; López y Chaparro, 2007). Para este protocolo de transformación genética se reporta una densidad óptica de 0.90 - 1.0 a 600 nm obteniéndose plantas transformadas, lo que permite atribuir una relación entre el estado fisiológico de la bacteria con su capacidad infectiva al tejido vegetal.

Otro aspecto importante en el presente protocolo de transformación de naranjilla, es el tiempo de 21 días que se deja a los explantes de peciolo en medio de regeneración con cefotaxima después del co-cultivo, en vista de que el paso inmediato de los explantes a medio selectivo con kanamicina no favoreció la regeneración de retoños. El efecto de que la kanamicina inhibe la regeneración de los explantes fue descrito por Visser *et al.* (1989) después de varios ensayos de transformaciones con *Solanum tuberosum sp. tuberosum*, en los cuales, partiendo de segmentos foliares o de entrenudos, se evaluó la transferencia directa del co-cultivo al medio de selección o dejando más de una semana en medio de regeneración sin kanamicina; como resultado

se obtuvieron mejores porcentajes de transformación cuando dejaban los explantes más de una semana sin presión de selección ya que se comenzaba a presentar división celular en los explantes sin estrés por la ausencia del antibiótico (Visser *et al.*, 1989) Este mismo procedimiento se ha descrito por Millam (2006) quien deja a los explantes de hoja de papa, (*Solanum tuberosum*) en medio de regeneración con cefotaxima durante 12 días después del co-cultivo, y a continuación los coloca en medio con kanamicina, puesto que reporta desventajas en la regeneración de retoños al colocar los explantes directamente en medio selectivo con kanamicina después del co-cultivo. A su vez, López y Chaparro (2007) dejan a los explantes de segmentos internodales de papa en medio de regeneración con cefotaxima durante 10 días antes de ser colocados en medio selectivo con kanamicina, puesto que se favorece la división celular y la callogénesis, hecho que no se apreció en los retoños colocados directamente en kanamicina.

En vista de que este es un trabajo inédito a nivel nacional y mundial, no existen reportes de transformaciones exitosas de naranjilla, *Solanum quitoense*, por lo que no se puede establecer una comparación directa con un trabajo del mismo tipo en la misma especie. Sin embargo, se pueden establecer comparaciones con ensayos de transformación genética realizados para otras especies dentro de la familia de las solanáceas. Sin duda alguna, la especie más estudiada dentro de la familia de las solanáceas es la papa y todas sus variedades, en las cuales se han desarrollado un sin número de ensayos de transformación genética mediados por *Agrobacterium tumefaciens*. El protocolo de transformación genética de papa *Solanum tuberosum* L mediada por *A. tumefaciens*, sin uso de acetociringona, con la mayor eficiencia de transformación es el descrito por Millam (2006), en el cual se obtuvo una eficiencia de transformación del 40%. En contraste, hay reportes de ensayos de transformación

genética de otras especies de solanáceas en los cuales la eficiencia de transformación genética es muy baja. Así por ejemplo, en el ensayo de transformación genética de *Solanum phureja*, conocida en Colombia como papa criolla o papa “yema de huevo” descrito por Carvajal y Chaparro (2004) la eficiencia de transformación genética fue del 0%. Por otro lado, en el ensayo de transformación genética de tomate de árbol, *Solanum betacea*, Atkinson y Gardner (1994) reportan una eficiencia de transformación del 2% al 9% sin acetociringona y del 34% al 35% con acetociringona. Así mismo, Arias (2007) reporta una eficiencia de transformación del tomate de árbol del 6% sin uso de acetociringona. Según Benítez (2005), entre el 1 y el 9% del ADN transferido y expresado en las células vegetales se integra finalmente al genoma de la planta. En el caso de este protocolo de transformación genética de *Solanum quitoense*, se ha logrado conseguir una eficiencia de transformación del 27.5%, la misma que se encuentra dentro de los parámetros reportados de transformación genética mediante *A. tumefaciens* que se encuentra alrededor del 20% (Staton, 2002).

Finalmente, es importante hacer notar que no todas las plantas transformadas que se obtuvieron, mostraron en su genoma la presencia del gen GUS y del gen NPTII, lo que muestra indicios de que el T-DNA fue fraccionado o no ingresó completo en el genoma de la célula vegetal (Figura 8). Según Staton (2002), la fragmentación o la inserción incompleta del T-DNA en experimentos de transformación con bacterias del género *Agrobacterium*, suele ser un hecho común, pero no deseado, especialmente en los casos en los que no ingresa al genoma vegetal la región de interés, como un promotor o un gen de importancia agronómica. El hecho de que en este trabajo se encontraran retoños positivos únicamente para el gen NPTII y no para el gen GUS, puede atribuirse al hecho de que las células que hayan incorporado únicamente el gen

GUS a sus genomas fueron incapaces de regenerar en el medio selectivo con kanamicina, puesto que no poseían el gen que confiere la resistencia a este antibiótico, NPTII, haciéndolas incapaces de generar retoños en dicho medio.

10. Conclusiones y Recomendaciones

10.1 Conclusiones

Mediante el presente protocolo se pudo demostrar que la transformación genética de la naranjilla, *Solanum quitoense*, mediante *Agrobacterium tumefaciens* es factible al emplear explantes de peciolo. Esto facilitaría la implementación de programas de mejoramiento vegetal en esta especie, mediante la inserción de genes de importancia agronómica, nutricional o ambiental.

Por otro lado, se pudo establecer que el protocolo de regeneración de naranjilla usando explantes de peciolo desarrollado en esta investigación es eficiente y brinda las condiciones necesarias para la regeneración de plantas después de un proceso de transformación genética.

Es importante mantener un buen estado fisiológico de las bacterias, por lo tanto, es fundamental que las bacterias se encuentren en fase logarítmica o exponencial de crecimiento al momento de inducir la agroinfección. Con esto es posible asegurar que las bacterias se encuentren en un proceso de división que incremente las posibilidades de infectar a las células vegetales y que permita la integración del T-DNA del plásmido bacteriano al genoma de la célula infectada.

Asimismo, es posible concluir que una buena eficiencia de transformación se puede conseguir al emplear explantes de peciolo provenientes de plantas germinadas de 10 a 12 semanas de edad, con un tamaño del explante de peciolo de 1 a 1.5 cm de longitud y con cortes S.C y H.L. Además, en este proyecto se vio claramente que los explantes de peciolo que permanecieron durante tres semanas sin el efecto del agente selectivo, kanamicina, mostraron regeneración de retoños.

10.2 Recomendaciones

Sería importante poder verificar la expresión de los genes introducidos durante el desarrollo de las plantas que han sido transformadas, mediante el desarrollo de pruebas moleculares como Northern blot y Western blot. También sería interesante analizar en los descendientes de varias generaciones la herencia y expresión del transgen, para poder afirmar que la característica introducida se hereda.

Podrían también realizarse pruebas histoquímicas para analizar la expresión del gen GUS con el uso del reactivo x-gluc. Con este ensayo es posible que el tejido vegetal de la planta transformada se tiña de color azul al existir una reacción entre la β -glucoronidasa, enzima que resulta de la expresión del gen GUS, y el sustrato x-gluc. Este ensayo histoquímico no pudo realizarse en esta investigación por el costo de los reactivos.

En vista de que en varios ensayos de transformación genética mediante *A. tumefaciens*, se reporta que el uso de la sustancia fenólica, acetociringona, incrementa la

eficiencia de transformación, por cuanto induce la activación de los genes *vir* (Atkinson y Gardner, 1994; Hooykaas y Schilperoort, 1992; Petri, 2005; Siekejs y Shieder, 1996), sería interesante hacer ensayos en naranjilla empleando acetociringona, con el objetivo de incrementar la eficiencia de transformación genética obtenida para este proyecto.

Se debería continuar con la investigación de nuevos medios de regeneración de la naranjilla que incluyan a otros explantes vegetales, tales como hojas, cotiledones, hipocótilos, protoplastos, etc, con el propósito de continuar con trabajos de mejoramiento vegetal en esta especie.

Este proyecto debería ser utilizado como el punto de partida para futuras investigaciones que faciliten el mejoramiento genético de la naranjilla. Sería favorable para el país que este trabajo sea aprovechado principalmente a nivel nacional, con el propósito de tomar la delantera a los países competidores del Ecuador en la comercialización de esta fruta como lo son: Colombia, Perú, Venezuela, Panamá, Costa Rica o Puerto Rico

Se debe tener la proyección de implementar esta técnica de biotecnología moderna a otros cultivos de interés nacional, principalmente para aquellos cultivos en los que el mejoramiento vegetal tradicional no haya logrado solucionar los problemas más importantes de dichos cultivos.

Finalmente, es de suma importancia que se sigan las normas de bioseguridad establecidas para la realización de trabajos en los que se manipula organismos modificados genéticamente. Asimismo es necesario que se haga el respectivo análisis de

riesgo en el caso de introducir plantas modificadas genéticamente al ambiente, tomando en cuenta, principalmente, que la naranjilla es una planta cuyo centro de origen es la Región Andina.

11. Bibliografía

1. Arias, A. S. Transformación Genética de Tomate de Árbol (*Solanum betacium*) mediante *Agrobacterium tumefaciens*. Universidad San Francisco de Quito. Tesis de Pregrado: 1-79. Quito, Ecuador (2007)
2. Benítez Burraco. A. Avances Recientes en Biotecnología Vegetal e Ingeniería Genética de Plantas. Barcelona: Editorial Reverté (2005)
3. Carvajal, D. A, A. Chaparro. Estudios orientados a la transformación de papa criolla (*solanum phureja*) mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Acta Biológica Colombiana. Vol 9. No. 2 (2004)
4. Cubero. J. I. Introducción a la mejora genética Vegetal. Barcelona: Segunda Edición. Ediciones Mundi-Prensa (2003)
5. Chávez, N. A, L. I. Chávez, E. Pérez. . Genetic Transformation Of Sour Orange Using *Agrobacterium Rhizogenes*. Revista Mexicana de Fitopatología. Vol. 24. No 1: 13-19. Aguascalientes, México (2003)
6. Espinoza. C. Descubrimiento de la transferencia de T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens*. Pontificia Universidad Católica de Chile. Doctorado en Ciencias Biológicas. Mención Genética Molecular y Microbiología. (2002)
<http://protein.bio.puc.cl/cardex/local/puc/seminarios/deptoGMM2002_1/informe_carmen.doc>
7. Doranie, Abraham. Map of pBI121 Plant Tissue Culture. Vol. 22. No.21: 07 (2002)
8. FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Declaración de la Conferencia de Alto Nivel Sobre la Seguridad Alimentaria Mundial: Los Desafíos del Cambio Climático Y la Bioenergía. 2008
<http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/foodclimate/HLCdocs/declaration-S.pdf>
9. Fori, P. A. Caracterización y análisis molecular de la Diversidad Genética de la Colección colombiana de Lulo (*Solanum quitoense* LAM) y seis especies relacionadas de la sección Lasiocarpa. Universidad Nacional de Colombia. Tesis de Postgrado: 1- 89.Palmira, Colombia (2005)
10. Heiser, C y G Anderson. “New” Solanums. Ed. J. Janick. ASHS Press. Alexandria, VA, USA: 379-384 (1999)
11. Hooykaas. P y R. Schilperoort. Agrobacterium and plant genetic engineering. Plant Molecular Biology: No. 19: 15-38 (1992)
12. ISAA. International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2007. 2007

- <<http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/37/executivesummary/default.html>>
13. López, A. y A. Chaparro. Propuesta de un sistema de transformación de plantas de papa (*Solanum tuberosum* sp. andigena var. Pastusa suprema) mediado por *Agrobacterium tumefaciens*. Agronomía colombiana. Vol 25. No. 1: 16-25. Bogotá, Colombia (2007)
 14. Madigan. M, J. Martinko, J. Parker. Biología de los Microorganismos. Madrid: Décima Edición. Editorial Pearson (2004)
 15. Martínez, M. J, R. Gutiérrez, E. García. Transformación de plantas de tomate Verde (*Physalis ixiocarpa* Brot. Var. Rendidora) con el gen OC-I (*Orizacistatina I*). Revista Mexicana de Fitopatología. Vol. 24. No 1: 13-19. Ciudad de Obregón, México (2006)
 16. Mendoza de Gyves. E. Agrobiotecnología. México. D.F: Grupo Editorial Iberoamérica (2001)
 17. Millam, Steve. Potato. (*Solanum tuberosum* L). Methods in Molecular Biology, vol 344: *Agrobacterium* Protocols, volume 2. edited by Kan Wang© Human Press Inc. Towona NJ. (2006)
 18. Murashige, T y F. Skoog. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*: No 15: 1026-1027 (1962)
 19. Petri, C. Transformación genética del albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.), mediada por *Agrobacterium*, y regeneración de plantas transformadas. Universidad de Murcia. Tesis Doctoral: 1-194. Murcia, España (2005)
 20. Pierik. R. L. M. In vitro Culture of Higher Plants. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers (1987)
 21. Revelo, J. Manejo Integrado de Plagas para el Mejoramiento de la Producción Sostenible de Frutas en la Zona Andina. Convenio BID -IICA-ATN/SF-6486-RG; FONTAGRO 5(28): 1-13. (2000)
 22. SICA. Servicio de Información Agropecuaria del Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador. Naranjilla, *Solanum quitoense* Lam. (2001)
<http://www.sica.gov.ec/agronegocios/productos%20para%20invertir/frutas/nanjilla/nanjilla_mag.pdf>
 23. Siemens. J y O. Shieder. Transgenic plants: genetic transformation-recent developments and state of the art. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*: No 2: 66 – 75 (1996)
 24. Siemens, J y T. Pickardt. Transformation of Plants. Institute of Applied Genetics, FU Berlin, Germany. (1996)

25. Stanton, G. Agrobacterium and Plant Genes Involved in T-DNA Transfer and Integration. Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol: No 51: 223-256 (2000)
26. Torre, R y S. Camacho. Campesino Fitomejorador de Naranjilla. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Quito. Carta de Frutales: No 14 (1981)
27. Shagai Maroof, et al. Ribosomal spacer length polymorphisms in barley: Proc Natl Acad. Sci. USA. 81: 8014-8019 (1984)
28. Valderrama, A. M. et al. Transformación de Plantas mediada por Agrobacterium. Ingeniería Genética Natural aplicada. Revista Agrícola de la Universidad Nacional de Colombia. Vol 58. No 1: 2569-2585. Medellín, Colombia (2005)
29. Visser, R., E.L. Jacobsen, A. Hesselting-Meinders, M.J. Schans, B. Witholt y W.J. Feenstra. Transformation of homozygous diploid potato with an agrobacterium tumefaciens binary vector system by adventitious shoot regeneration of leaf and stem segments. Plant Mol. Biol. 12, 329-337. (1989)

12. ANEXOS

12.1 Tablas

Tabla 1. Medios de cultivo para *A. tumefaciens* LB004/PBI 121.

Medio de Cultivo	Antibiótico	Concentración de antibiótico	Uso
LB líquido	-	-	Activar a la bacteria que se encontró a -80°C
LB sólido Selectivo	Estreptomicina	100 mgL ⁻¹	Selección de cepas de <i>A. tumefaciens</i> con plásmido pBI121
	Rifampicina	100 mgL ⁻¹	
	Kanamicina	100 mgL ⁻¹	
LB líquido Selectivo	Estreptomicina	100 mgL ⁻¹	Crecimiento en agitación a 2000 rpm de <i>A. tumefaciens</i> para su posterior uso en la transformación
	Rifampicina	100 mgL ⁻¹	
	Kanamicina	100 mgL ⁻¹	

Tabla 2. Medios de regeneración empleados para los explantes de naranjilla luego de su inoculación con *A. tumefaciens*

Medio de cultivo	Factores de Crecimiento	Antibióticos	Usos
Medio MS Co-cultivo y Regeneración	BAP 4.5 mgL ⁻¹	-	Infección de <i>A. tumefaciens</i> a los explantes de peciolo Regeneración de Explantes de Peciolo Control
	NAA 0.01 mgL ⁻¹		
	GA ₃ 0.1 mgL ⁻¹		
Medio MS Regeneración + Cefotaxima	BAP 4.5 mgL ⁻¹	Cefotaxima (300 mgL ⁻¹)	Eliminar <i>A. tumefaciens</i> Promover formación de callo en explantes de peciolo
	NAA 0.01 mgL ⁻¹		
	GA ₃ 0.1 mgL ⁻¹		
Medio MS Selectivo	BAP 4.5 mgL ⁻¹	Cefotaxima (300 mgL ⁻¹) Kanamicina (100 mgL ⁻¹)	Selección de explantes regenerados en medio con kanamicina 100 mgL ⁻¹
	NAA 0.01 mgL ⁻¹		
	GA ₃ 0.1 mgL ⁻¹		

Tabla 3. Tiempo que los explantes de peciolo permanecieron en medio de Regeneración previo a la selección para cada ensayo de transformación

Ensayo de Transformación	# Peciolo sometidos a Trasformación	Tiempo y # Peciolo que permanecieron en Medio de Regeneración previo a la Selección			
		Semanas			
		0	1	2	3
1	80	80	-	-	-
2	80	40	40	-	-
3	80	20	20	40	-
4	80	-	40	40	
5	80	-	-	80	
6 - 11	80	-	-	-	80

En los primeros cinco ensayos de transformación los explantes tuvieron una selección temprana, colocándolos en medio con kanamicina de 0 a 2 semanas después de permanecer en medio de regeneración. Los seis siguientes ensayos de transformación tuvieron una selección tardía, dejándolos en medio de regeneración por 3 semanas antes de colocarlos en medio selectivo.

Tabla 4. Factores considerados en los distintos ensayos de transformación genética de la naranjilla.

Ensayo de Transformación	Origen de las Plantas	Edad de las plantas (Semanas)	Longitud del Peciolo (cm)	Tipo de Corte
1	Semilla	6 a 8	0.5 a 0.8	S.C
2	Semilla	10 a 12	0.5 a 0.8	S.C
3 y 8	Subcultivo	6	1 a 1.5	S.C y H.L
4, 6 y 11	Semilla	10 a 12	1 a 1.5	S.C y H.L
5, 7 y 10	Semilla	10 a 12	1 a 1.5	S.C y C.P
9	Semilla	6 a 8	0.5 a 0.8	S.C y H.L

Cortes S.C (Sin Cortes adicionales); H.L (Herida Longitudinal); C.P (Cortes Perpendiculares).

Tabla 5. Reactivos y volúmenes empleados en la preparación de una reacción para PCR

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración Final
H ₂ O de PCR –DNasa/RNasa Free	6	
Buffer 10X	1	1X
MgCl ₂ 50 mM	0.3	1.5 mM
dNTP's 20mM	0.1	0.2 mM
Primer Forward 10 μM	0.2	0.2 μM
Primer Reverse 10 μM	0.2	0.2 μM
Taq Polimerasa 1U	0.2	0.02 U
Volumen Final por reacción Master Mix	8 μL	
Volumen de ADN colocado por reacción	2 μL	40 ng/uL
<i>Volumen Final por Reacción para PCR</i>	<i>10 μL</i>	

Tabla 6. Secuencias de los primers empleados para la amplificación de los genes GUS y NPTII.

Gen	Secuencia de los Primers
GUS	F: 5' CCC GCT TCG AAA CCA ATG CC 3'
	R: 5' ACG TCC TGT AGA AAC CCC AA 3'
NPTII	F: 5' TAT TCG GCT ATG ACT GGG AC 3'
	R: 5' GCC AAC GCT ATG TCC TGA T 3'

Tomados de: Arias (2007); Chávez (2003); Martínez et al (2006)

Tabla 7. Programa para la amplificación del gen GUS

Proceso	Temperatura	Tiempo
Calentamiento Tapa	104 °C	4 min
1. Desnaturalización Inicial	94 °C	3 min
2. Desnaturalización	94 °C	1 min
3. Annealing	66 °C	1 min
4. Extensión	72 °C	2 min
5. Regresar al paso 2 y realizar 10 ciclos con una disminución de la temperatura de 0.5 °C por ciclo en el paso tres		
6. Desnaturalización	94 °C	30 seg
7. Annealing	61 °C	30 seg
8. Extensión	72 °C	2 min
9. Realizar 22 ciclos desde el paso 6		

Tabla 8. Programa para la amplificación del gen NPTII

Proceso	Temperatura	Tiempo
Calentamiento Tapa	104 °C	4 min
1. Desnaturalización Inicial	94 °C	3 min
2. Desnaturalización n	94 °C	1 min
3. Annealing	54 °C	1 min
4. Extensión	72 °C	2 min
5. Realizar 30 ciclos desde el paso 1		
Extensión Final	72 °C	7 min

Tabla 9. Eficiencia de transformación para los diferentes ensayos de transformación genética de naranjilla

Ensayo de Transformación	# Peciolos iniciales	# Peciolos Regenerados	# Retoños Transformados	Eficiencia %
1, 2, 3, 4, 5	80	-	-	0
6	80	13	5	6.25
7	80	8	1	1.25
8	80	6	-	0
9	80	10	1	1.25
10	80	10	1	1.25
11	80	20	22	27.5

Para los ensayos de transformación 1, 2, 3, 4 y 5 no se obtuvo regeneración de retoños, por lo cual la eficiencia de transformación para estos ensayos es del 0%. Los valores más altos de eficiencia de transformación son los de los ensayos de transformación 6 y 11.

12.2. Figuras

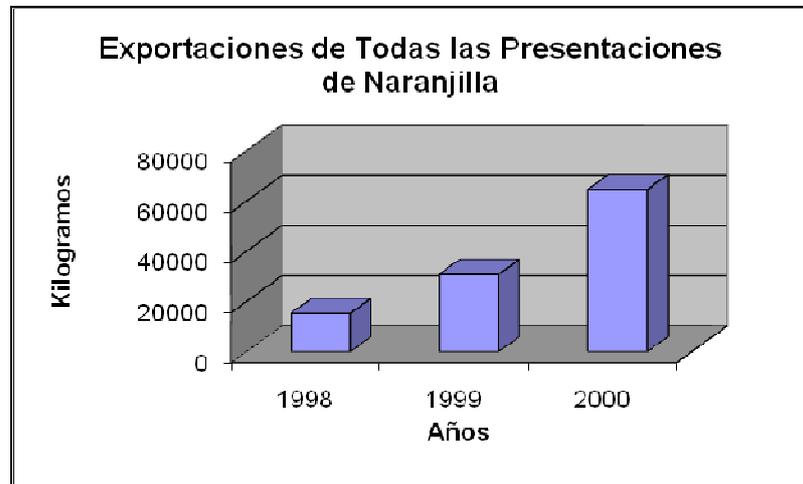


Figura 1. *Exportación en kilogramos de las presentaciones de naranja (jugo, pulpa y fruta congelada) en los años 1998 a 2000* (SICA, 2001).

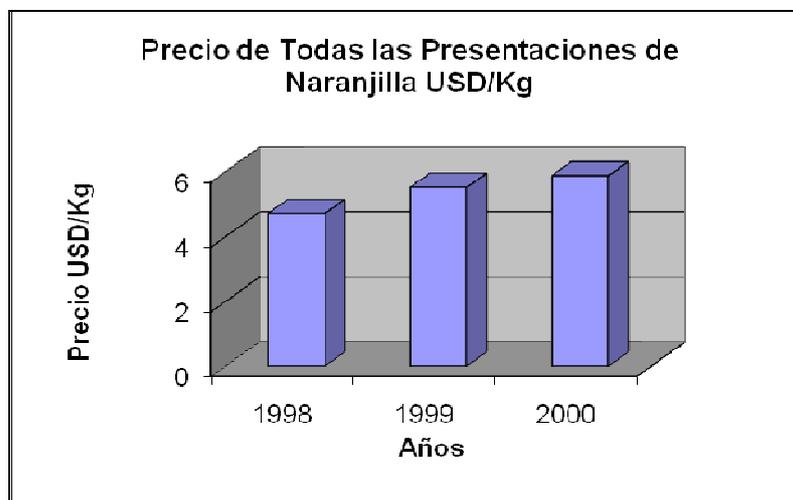


Figura 2. *Variaciones en el precio por kilogramo de las presentaciones de naranja (jugo, pulpa y fruta congelada) en los años 1998 a 2000 (SICA, 2001).*

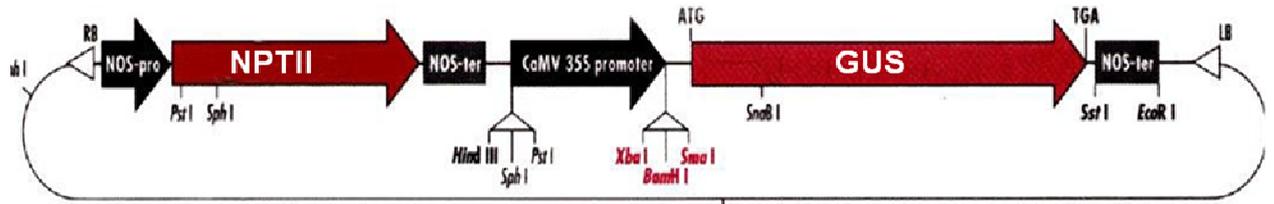


Figura 3. Plásmido pBI121 empleado para el proceso de transformación genética
Tomado de: Doranie, 2002.

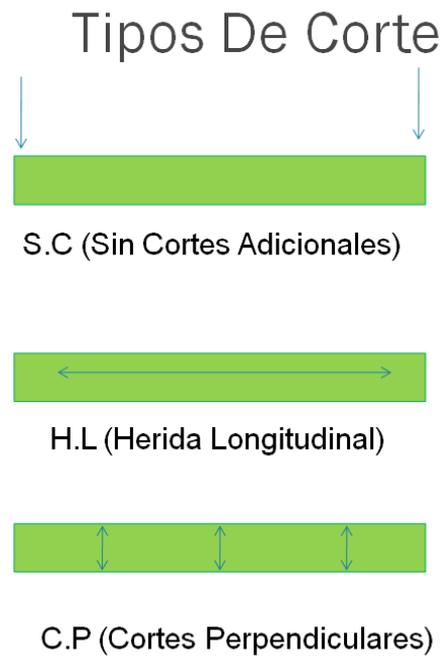


Figura 4. *Tipos de cortes realizados a los peciols de naranjilla para los diferentes ensayos de transformación genética*

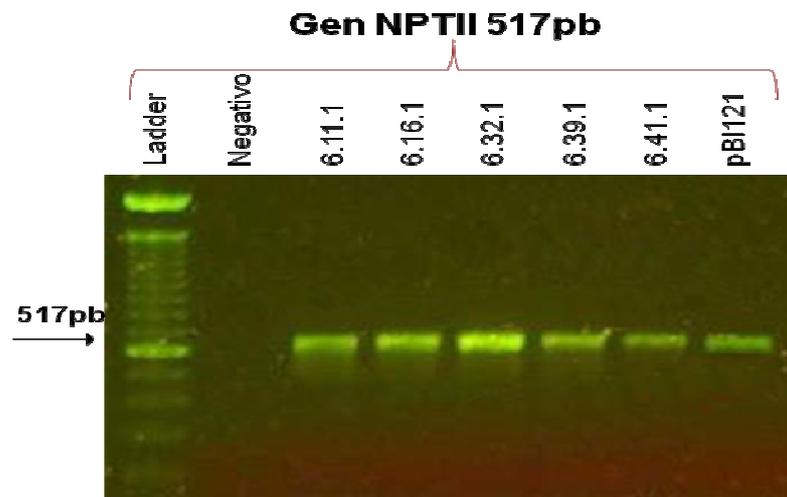


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados para el gen *NPTII* de los retoños del ensayo de transformación 6

Carril 1, ladder; carril 2, control negativo (ADN de naranjilla no transformada); carril 8, control positivo (ADN del plásmido pBI121); carriles 3 al 7, muestras de retoños potencialmente transformados. La flecha indica el tamaño esperado del fragmento.

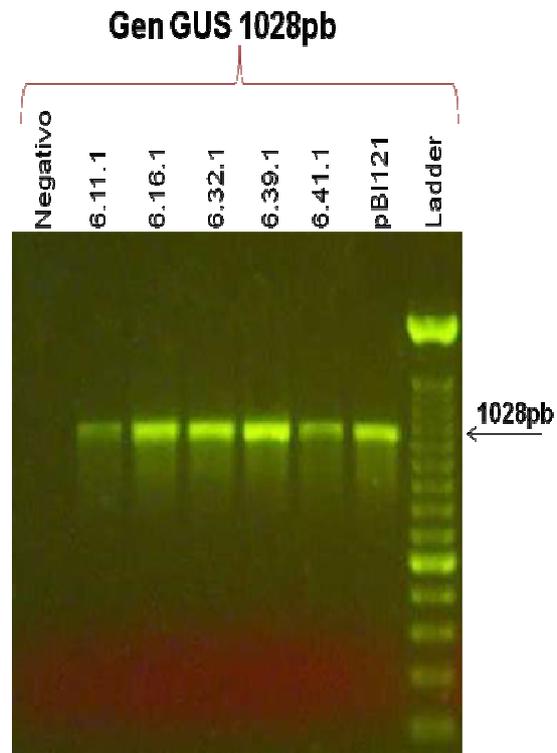


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados para el gen *GUS* de los retoños del ensayo de transformación 6

Carril 1, control negativo (ADN de naranjilla no transformada); carril 7, control positivo (ADN del plásmido pBI121); carril 8, ladder; carriles 2 al 5, muestras de retoños potencialmente transformados. La flecha indica el tamaño esperado del fragmento.

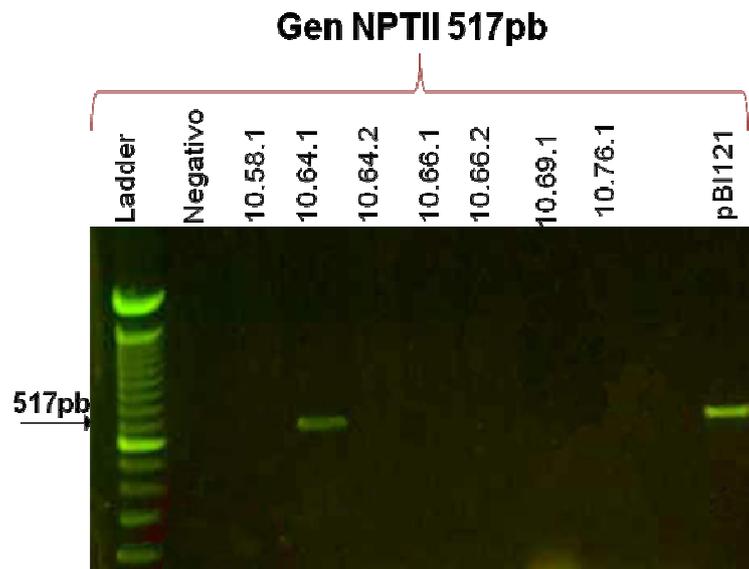


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados para el gen *NPTII* de los retoños del ensayo de transformación 10

Carril 1, ladder; carril 2, control negativo (ADN de naranjilla no transformada); carril 11, control positivo (ADN del plásmido pBI121); carril 10, vacío; carriles 3 al 9, muestras de retoños potencialmente transformados. La flecha indica el tamaño esperado del fragmento.

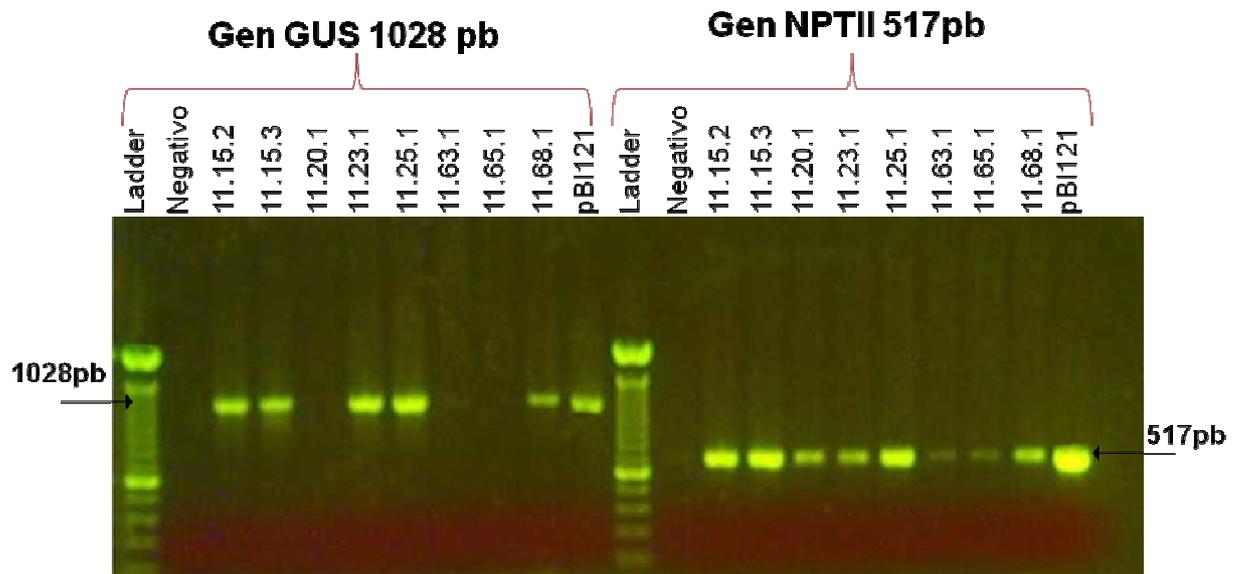


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados para los genes *GUS* y *NPTII* de los retoños del ensayo de transformación 11

Carriles 1 y 12, ladder; carriles 2 y 13, control negativo (ADN de naranjilla no transformada); carriles 11 y 22, control positivo (ADN del plásmido pBI121); carriles 3 al 10 y 14 al 21, muestras de retoños potencialmente transformados. La flecha indica el tamaño esperado del fragmento.