



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**Estandarización del método de transfección de callo y suspensiones celulares de tabaco
(*Nicotiana tabacum*) mediante *Agrobacterium tumefaciens***

Cajas Cajas, Israel Estuardo

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Dra. Proaño Tuma, Karina Isabel Ph.D.

12 de agosto de 2020

Document Information

Analyzed document	FINAL TESIS ISRAEL CAJAS (1).docx (D77657343)
Submitted	8/11/2020 12:23:00 AM
Submitted by	PROAÑO TUMA KARINA ISABEL
Submitter email	kiproanio@espe.edu.ec
Similarity	6%
Analysis address	kiproanio.espe@analysis.orkund.com

Sources included in the report

SA	Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE / Tesis_Expresióndetripsinaheterologaensuspensionescelularesdetabaco.docx Document Tesis_Expresióndetripsinaheterologaensuspensionescelularesdetabaco.docx (D54032025) Submitted by: kiproanio@espe.edu.ec Receiver: kiproanio.espe@analysis.orkund.com	 18
SA	Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE / Tesis Jessica Sanchez Urkund (1).docx Document Tesis Jessica Sanchez Urkund (1).docx (D39993690) Submitted by: mbjadan@espe.edu.ec Receiver: mbjadan.espe@analysis.orkund.com	 15
SA	Urkund- JENNIFER TORRES.docx Document Urkund- JENNIFER TORRES.docx (D29569925)	 2
SA	Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE / TESIS_DANIELA_ROMERO_URKUND.docx Document TESIS_DANIELA_ROMERO_URKUND.docx (D30385322) Submitted by: mbjadan@espe.edu.ec Receiver: mbjadan.espe@analysis.orkund.com	 1
SA	Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE / Proyecto titulación Denisse Puebla Urkund (2).docx Document Proyecto titulación Denisse Puebla Urkund (2).docx (D24735626) Submitted by: mbjadan@espe.edu.ec Receiver: mbjadan.espe@analysis.orkund.com	 5
W	URL: https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/3298/optimizacion_protocolo... Fetched: 6/9/2020 4:36:45 AM	 4
W	URL: https://docplayer.es/55684767-Ingeniera-en-biotecnologia.html Fetched: 3/12/2020 4:31:59 AM	 2
W	URL: https://digital.csic.es/bitstream/10261/4008/1/petri_albaricoquero.pdf Fetched: 4/23/2020 12:32:00 PM	 4
W	URL: https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1023/364/1/Juan%20Uald... Fetched: 1/5/2020 7:27:52 AM	 6
W	URL: https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n4696_Radonic.pdf Fetched: 4/23/2020 6:42:53 PM	 3

W	URL: https://chapingo.mx/horticultura/pdf/tesis/TESISDCH2014063009127253.pdf Fetched: 12/14/2019 6:48:37 AM	 1
W	URL: https://patents.google.com/patent/ES2674674T3/es Fetched: 8/11/2020 12:23:00 AM	 1
SA	TESIS JUAN J. HERRERA V3.pdf Document TESIS JUAN J. HERRERA V3.pdf (D48316134)	 1
W	URL: https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/7735/1/T-ESPE-047633.pdf Fetched: 8/5/2020 3:55:09 PM	 2



Firmado electrónicamente por:
**KARINA
ISABEL**

.....

Karina Isabel Proaño Tuma, Ph.D.

C.C. 1707245104

Directora



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “ **Estandarización del método de transfección de callo y suspensiones celulares de tabaco (*Nicotiana tabacum*) mediante *Agrobacterium tumefaciens*** ” fue realizado por el señor **Cajas Cajas, Israel Estuardo** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 12 de agosto del 2020



Firmado electrónicamente por:
**KARINA
ISABEL**

Karina Isabel Proaño Tuma, Ph.D.

C.C. 1707245104



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Cajas Cajas, Israel Estuardo**, con cédula de ciudadanía n° 1722680897, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Estandarización del método de transfección de callo y suspensiones celulares de tabaco (*Nicotiana tabacum*) mediante *Agrobacterium tumefaciens*”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

Sangolquí, 12 de agosto del 2020

Firma:

Israel Estuardo Cajas Cajas

C.C. 1722680897



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

AUTORIZACIÓN

Yo, **Cajas Cajas Israel Estuardo** con cédula de ciudadanía n° 1722680897, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **Estandarización del método de transfección de callo y suspensiones celulares de tabaco (*Nicotiana tabacum*) mediante *Agrobacterium tumefaciens*** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 12 de agosto del 2020

Firma:

Israel Estuardo Cajas Cajas

C.C. 1722680897

Dedicatoria

A mis padres Estuardo y Guicela, a mi hermana Gabriela
por su apoyo incondicional en los momentos difíciles,
alegres, y tristes de mi vida y a mi sobrina
Jennifer por alegrarme mis días.

Israel Estuardo Cajas Cajas

Agradecimientos

A mis padres, porque siempre han estado conmigo en todo momento, por ser mi motor e inspiración para seguir creciendo como persona y profesional. Gracias por su cariño, confianza, trabajo y sobre todo su sacrificio durante todos estos años, los cuales han permitido que hoy cumpla una meta más en mi vida.

A mi hermana, a la cual considero como una segunda madre para mí, por todo su apoyo, cariño y consejos en todo momento.

De igual manera a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE y a mis profesores, quienes me supieron impartir su valioso conocimiento durante los años que duro mi etapa universitaria y que se verán reflejados en mi vida profesional.

A mi directora de tesis, Dra. Karina Proaño, por haberme permitido formar parte de su laboratorio y por su confianza al permitirme haber realizado la presente investigación. Gracias por su dirección y enseñanzas tanto en lo académico como personal. Por el ambiente cálido que brinda en el laboratorio, lo cual ha permitido que se convierta como mi segundo hogar. A la técnica de laboratorio, Gabriela Miño por tus enseñanzas y preocupación que tuviste hacia mi persona cuando se me presentó alguna dificultad durante el desarrollo del presente trabajo.

A la Dra. Mónica Jadán, por su orientación, conocimiento, apoyo incondicional y principalmente por permitirme haber desarrollado parte de mi investigación en su laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio, Kevin, Paúl, Dominique y Rosita por los momentos compartidos; a mi amigo Diego por su guía y conocimientos impartidos en el presente trabajo y a mis pasantes, principalmente a Melany y Mike por su aporte en esta investigación.

A mis amigos, Angy, Giulliete, Pedro, Richard, Andrea, Naty, Sophia y Marjorie, quienes me brindan su amistad, su apoyo moral y humano. Gracias por todas las vivencias compartidas dentro y fuera de las aulas.

¡Gracias a todos!

Israel Cajas

Índice de Contenido

Certificación	2
Responsabilidad de Autoría	3
Autorización	4
Dedicatoria	5
Agradecimientos	6
Índice de Contenido	8
Índice de Tablas.....	11
Índice de Figuras	13
Listado de Abreviaturas	16
Resumen.....	17
Abstract.....	18
Capítulo 1: Introducción.....	19
Formulación del Problema.....	19
Justificación del Problema	21
Objetivos	23
Objetivo General	23
Objetivos Específicos	24
Marco Teórico	24
Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)	24
Callogénesis.....	27
Métodos de Transfección de Genes en Plantas	35
Transfección de Plantas Mediante Agrobacterium	37
Hipótesis	48

	9
Capítulo 2: Materiales y Métodos	49
Participantes	49
Zona de Estudio	49
Duración de la Investigación	49
Material Vegetal	50
Siembra y Mantenimiento de Plantas de Tabaco	50
Desinfección del Material Vegetal	51
Obtención de Callo	53
Establecimiento de Suspensiones Celulares de Tabaco a Partir de Callo	55
Transfección Genética	56
Aislamiento y Purificación de los Plásmidos pSiM24-eGFP y pSiM24-GUS	56
Preparación de Células Electrocompetentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	58
Electroporación de <i>A. tumefaciens</i> con los Plásmidos pSiM24-eGFP y pSiM24-GUS.....	58
Colony PCR de Colonias de <i>Agrobacterium</i> Electroporadas	59
Verificación de Colonias de <i>Agrobacterium</i> Electroporadas Mediante Colony PCR	61
Selección de Colonias Electroporadas Mediante PCR Directa	61
Ensayo de Transfección en Suspensión Celular de Tabaco	64
Ensayo de Transfección de Callos de Tabaco.....	68
Capítulo 3: Resultados	72
Ensayos de Desinfección e Inducción de Callos en Hojas de Tabaco	72
Establecimiento del Protocolo de Desinfección de Explantes de Hojas de Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>).....	72
Inducción de Callos en Explantes de Hojas de Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>).....	87

	10
Establecimiento de Suspensiones Celulares de Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>).....	91
Ensayos de Transfección Genética.....	92
Extracción de los Plásmidos pSiM24-eGFP y pSiM24-GUS de E. coli.....	92
Inserción del Plásmido pSiM24 en <i>A. tumefaciens</i> Mediante Electroporación	94
Transfección de Suspensiones Celulares de Tabaco.....	98
Transfección de Callos de Tabaco.....	106
Capítulo 4: Discusión.....	113
Inducción de Callos en Hojas de Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>).....	113
Transfección Genética	117
Transfección de Suspensiones Celulares de Tabaco.....	118
Transfección de Callos de Tabaco.....	123
Capítulo 5: Conclusiones.....	130
Capítulo 6: Recomendaciones	132
Capítulo 7: Bibliografía	133
Capítulo 8: Anexos.....	165

Índice de Tablas

Tabla 1 <i>Reguladores de crecimiento usados en cultivo de tejido de plantas</i>	31
Tabla 2 <i>Tratamientos de desinfección de explantes de hojas jóvenes de tabaco con hipoclorito de sodio a diferentes tiempos de inmersión</i>	51
Tabla 3 <i>Tratamientos de medios de cultivo con combinaciones de ANA y Kinetina, para la inducción de callos en hojas de tabaco (Nicotiana tabacum)</i>	54
Tabla 4 <i>Master mix de la Colony PCR</i>	60
Tabla 5 <i>Programa de la Colony PCR de los genes GUS y GFP de colonias de Agrobacterium electroporadas</i>	60
Tabla 6 <i>Programa de la PCR directa de los genes GUS y GFP de colonias de Agrobacterium electroporadas</i>	62
Tabla 7 <i>Master mix de la PCR directa</i>	63
Tabla 8 <i>Tratamientos del ensayo de transfección de la suspensión celular de tabaco con A. tumefaciens</i>	65
Tabla 9 <i>Tratamientos de transfección de callos de tabaco con A. tumefaciens</i>	69
Tabla 10 <i>Tabla de contingencia del porcentaje de explantes contaminados respecto a los tratamientos de desinfección</i>	78
Tabla 11 <i>Prueba de Shapiro-Wilks modificado con los residuos del ANOVA de la variable contaminación</i>	80
Tabla 12 <i>Tabla de contingencia del porcentaje de explantes necrosados respecto a los tratamientos de desinfección</i>	83
Tabla 13 <i>Prueba de Shapiro-Wilks modificado con los residuos del ANOVA de la variable necrosamiento</i>	85

Tabla 14 <i>Prueba de Shapiro-Wilks modificado con los residuos del ANOVA de la variable formación de callo</i>	91
Tabla 15 <i>Concentraciones y absorbancias de DNA plasmídicos pSiM24-GUS y pSiM24-eGFP extraídos de E. coli</i>	94
Tabla 16 <i>Concentraciones y absorbancias de DNA plasmídicos pSiM24-GUS y pSiM24-eGFP extraídos de A.tumefaciens GV3101 electroporado</i>	97
Tabla 17 <i>Prueba de Shapiro-Wilks modificado con los residuos del ANOVA de la variable expresión de GFP en suspensiones celulares de tabaco transfectadas</i>	105
Tabla 18 <i>Eficiencias de transfección en callos regenerados de Nicotiana tabacum BY-2 a partir de suspensiones celulares transfectadas con Agrobacterium tumefaciens</i>	106

Índice de Figuras

Figura 1 <i>Ilustración de <i>Nicotiana tabacum</i>.</i>	26
Figura 2 <i>Ilustración de tipos de callo de plantas.</i>	29
Figura 3 <i>Representación esquemática del plásmido Ti.</i>	38
Figura 4 <i>Ilustración de los pasos del proceso de infección y transfección de plantas mediada por <i>A. tumefaciens</i>.</i>	40
Figura 5 <i>Representación esquemática de vectores: A) Co-integrados y B) Binarios.</i> ...	43
Figura 6 <i>Representación esquemática del vector binario pSiM24</i>	45
Figura 7 <i>Plantas de tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>) de tres meses de edad.</i>	50
Figura 8 <i>Evaluación de la variable de respuesta de contaminación. (A) Explante contaminado; (B) Explante no contaminado.</i>	52
Figura 9 <i>Evaluación de la variable de respuesta necrosamiento. (A) Explante necrosado; (B) Explante viable.</i>	53
Figura 10 <i>Callogénesis en explantes de hojas de tabaco. (A) Explante con tejido desdiferenciado; (B) Explante sin presencia de callo.</i>	55
Figura 11 <i>Explantes de hojas de tabaco con diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio y tiempos de inmersión</i>	73
Figura 12 <i>Porcentaje de explantes de hojas de tabaco contaminados respecto a la concentración de hipoclorito de sodio (NaClO)</i>	75
Figura 13 <i>Porcentaje de explantes contaminados respecto al tiempo de inmersión en diferentes concentraciones de NaClO.</i>	77
Figura 14 <i>Gráfica de interacción para el porcentaje de explantes contaminados respecto a la concentración de hipoclorito de sodio (NaClO) y el tiempo de inmersión.</i>	79

Figura 15 <i>Gráfica de normalidad con los residuos de la variable contaminación en hojas de tabaco (Nicotiana tabacum)</i>	80
Figura 16 <i>Porcentaje de explantes de hojas de tabaco necrosados con los tratamientos de desinfección</i>	82
Figura 17 <i>Gráfica de interacción para el porcentaje de explantes necrosados respecto a las concentraciones de hipoclorito de sodio (NaClO) y el tiempo de inmersión.</i>	84
Figura 18 <i>Gráfica de normalidad con los residuos de la variable necrosamiento en hojas de tabaco (Nicotiana tabacum)</i>	85
Figura 19 <i>Porcentaje de explantes viables y no contaminados de cada uno de los tratamientos de desinfección</i>	87
Figura 20 <i>Tratamientos de callogénesis en explantes de hojas de tabaco</i>	88
Figura 21 <i>Porcentaje de callos formados en explantes de hojas de tabaco</i>	89
Figura 22 <i>Gráfica Q-Qplot con los residuos de la variable formación de callo en hojas de tabaco (Nicotiana tabacum)</i>	90
Figura 23 <i>Establecimiento de suspensiones celulares de tabaco. A. Suspensión celular de N. tabacum. B. Suspensión celular de N. tabacum BY-2</i>	92
Figura 24 <i>Electroforesis de los plásmidos extraídos pSiM24-GUS y pSiM24-eGFP de E. coli con el kit PureLink® Quick Plasmid Miniprep</i>	93
Figura 25 <i>Colonias de A. tumefaciens GV3101 electroporado con plásmidos pSiM24-eGFP y pSiM24-GUS en medio LB con 100 mg/L de Ampicilina</i>	95
Figura 26 <i>Amplificación por Colony PCR de los genes GUS y GFP en colonias de A. tumefaciens GV3101 electroporadas con los plásmidos pSiM24-GUS y pSiM24-eGFP</i>	96

Figura 27 Amplificación mediante PCR directa de los genes GUS y GFP en DNA plasmídicos pSiM24-GUS y pSiM24-eGFP extraídos de <i>A. tumefaciens</i> GV3101 electroporado.....	98
Figura 28 Fluorescencia GFP en suspensiones celulares de tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i> BY-2) transfectadas con <i>A. tumefaciens</i> LBA4404 con pSiM24-eGFP.....	100
Figura 29 Porcentaje de suspensiones celulares transfectadas con expresión del gen GFP con respecto a la concentración de Acetosiringona y el tiempo de co-cultivo	102
Figura 30 Gráfica de interacción para el porcentaje de suspensiones celulares de tabaco con expresión de GFP.....	103
Figura 31 Gráfica de normalidad con los residuos de la variable expresión de GFP en suspensiones celulares de tabaco transfectadas.	104
Figura 32 Callos de tabaco transfectados con <i>A. tumefaciens</i> con pSiM24-GUS en medio de selección MS con 50 mg/L de Kanamicina y 250 mg/L Cefatoxima.	108
Figura 33 Porcentaje de callos de tabaco transfectados viables en medio de selección MS con 50 mg/L de Kanamicina y 250 mg/L de Cefatoxima.....	109
Figura 34 Gráfica de interacción para el porcentaje de suspensiones celulares de tabaco con expresión de GFP.....	111

Listado de Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza
mg	Miligramo
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MS	Murashige & Skoog
ANA	Ácido Naftalenacético
KIN	Kinetina
PCR	Polymerase chain reaction, Reacción en cadena de la polimerasa
μl	Microlitro
°C	Centígrado

Resumen

En la actualidad existen diferentes métodos físicos o químicos para transfectar plantas, pero la mayoría presentan desventajas durante la inserción de genes de interés. La transfección mediada por *A. tumefaciens* es un método ampliamente empleado a nivel de laboratorio por su facilidad y costo. El tabaco (*Nicotiana tabacum*) ha sido ampliamente empleada para protocolos de transfección por su facilidad y eficiencia de transfección con *Agrobacterium*. Por ello, la presente investigación tuvo como objetivo estandarizar un protocolo de transfección de callos y suspensiones celulares de tabaco mediante *A. tumefaciens*. Para lo cual, se realizó la desinfección de explantes de hojas de *N. tabacum* de 3 meses de edad con 0.5 % (v/v) de NaClO durante 2 minutos. La inducción de callos tipo friable (100%) en los explantes desinfectados se logró con la adición de 2 mg/L de ANA y 0.2 mg/L de Kinetina en el medio MS. La transfección de los callos de tabaco mediante *A. tumefaciens* GV3101 ($OD_{600nm}=0.6$) con el plásmido pSiM24-GUS con 20 minutos de inmersión y 3 días de cocultivo, permitió obtener callos con resistencia al marcador de selección Kanamicina (50 mg/L). No se observó la expresión del gen reportero GUS debido al necrosamiento que presentaron los callos. Las condiciones ideales para obtener un 100% de suspensiones celulares de tabaco con resistencia a la Kanamicina (50 mg/L) y expresión del gen reporte GFP, fueron la adición de 10mM de Acetosiringona en el medio de cocultivo y 3 días de cocultivo con *A. tumefaciens* LBA4404 ($OD_{600nm}=0.8$) con el plásmido pSiM24-eGFP.

PALABRAS CLAVES:

- **AGROBACTERIUM TUMEFACIENS**
- **TRANSFECCIÓN**
- **NICOTIANA TABACUM**

Abstract

Currently there are different physical or chemical methods to transfect plants, but most have disadvantages during the delivery of genes of interest. Transfection mediated by *A. tumefaciens* is a method widely used at the laboratory level for its ease and cost. Tobacco (*Nicotiana tabacum*) has been widely used for transfection protocols for its efficiency of transfection with *Agrobacterium*. Therefore, the present investigation aimed to standardize a protocol for transfection of callus and cell suspensions of tobacco by using *A. tumefaciens*. For this, the disinfection of explants from 3-month-old *N. tabacum* leaves was done with 0.5% (v / v) NaClO and 2 minutes of immersion. The induction of calluses friable type (100%) in disinfected explants was achieved with the addition of 2 mg/L of ANA and 0.2 mg/L of Kinetin in the MS medium. Transfection of tobacco calluses by *A. tumefaciens* GV3101 (OD_{600nm} = 0.6) with the plasmid pSiM24-GUS with 20 minutes of immersion and 3 days of co-culture, allowed to obtain calluses with resistance to the Kanamycin selection marker (50 mg / L). The expression of the GUS reporter gene was not observed due to the necrotization of the calluses. The ideal conditions to obtain 100% tobacco cell suspensions with resistance to Kanamycin (50 mg / L) and expression of the GFP reporter gene, were the addition of 10mM of Acetosyringone in the co-culture medium and 3 days of co-culture with *A. tumefaciens* LBA4404 (OD_{600nm} = 0.8) with plasmid pSiM24-eGFP.

KEYWORDS:

- **AGROBACTERIUM TUMEFACIENS**
- **TRANSFECTION**
- **NICOTIANA TABACUM**

Capítulo 1: Introducción

Formulación del Problema

Actualmente, el área de biotecnología vegetal ha desarrollado herramientas innovadoras no solo para obtener nuevos rasgos y variedades de plantas, sino también para producir biomoléculas importantes como metabolitos y proteínas recombinantes (Bhatia, Sharma, Dahiya, & Bera, 2015). El desarrollo de técnicas de ingeniería genética y cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, ha permitido el mejoramiento genético de plantas (Azcon-Bieto & Talón, 2013) mediante la introducción y expresión de genes de foráneos en las células vegetales con diferentes métodos de transfección (Herrera-Estrella, Simpson, & Martínez-Trujillo, 2004). Por lo cual, la producción de moléculas biológicas de interés comercial jugará un papel importante en el futuro tanto en la alimentación de la población mundial como en el desarrollo industrial.

Desde la década de 1980, se han descrito diversos métodos (Darbani, *et al.*, 2008) para introducir DNA foráneo en el genoma de una planta (Potrykus, 1991). Estos métodos incluyen sistemas biológicos (indirectos) empleando las bacterias patógenas *Agrobacterium tumefaciens* o *A. rhizogenes*, y sistemas directos (físicos y químicos) como polietilenglicol, microinyección, electroporación y bombardeo con microproyectiles (Potrykus, 1991), para introducir nuevos rasgos, estudiar procesos biológicos o producir proteínas recombinantes de interés en plantas (Darbani, *et al.*, 2008).

La mayoría de los protocolos de los métodos de transfección directa presentan baja reproductibilidad (polietilenglicol o electroporación), son laboriosos y demandan

mucho tiempo porque requieren una manipulación tediosa con equipos sofisticados y costosos (electroporación y microinyección) (Herrera-Estrella, *et al.*, 2004). Además, tienen una baja eficiencia de transfección por las múltiples copias de los genes introducidos, convirtiéndose en métodos poco rentables al momento de expresar proteínas a nivel *in vitro* (Rivera, Gómez-Lim, Fernández, & Loske, 2012). Estos métodos de transfección físicos pueden producir silenciamiento genético y variación de expresión del transgén de interés una vez incorporado en el genoma de la planta (Cluster, O'Dell, Metzloff, & Flavell, 1996), lo que disminuye su eficiencia.

La transfección de las plantas mediada por *A. tumefaciens*, se ha convertido en el método más utilizado para la introducción de genes foráneos en las células de las plantas (De la Riva, González-Cabrera, Vazquez-Padron, & Ayra-Pardo, 1998). Los investigadores han utilizado la capacidad de *Agrobacterium* de transferir de manera natural un segmento de ADN particular (T-DNA) del plásmido inductor de tumor (Ti) al núcleo de las células infectadas, para integrar de manera estable en el genoma del huésped y transcribir genes de interés, a partir del descubrimiento de la enfermedad agalla de la corona en plantas dicotiledóneas (Nester, Gordon, Amasino, & Yanofsky, 1984; Binns & Thomashow, 1988).

Aunque actualmente existen diversos protocolos de transfección con *A. tumefaciens*, es necesario estandarizar la metodología bajo las condiciones específicas del laboratorio para cada especie vegetal en estudio. Es importante tomar en cuenta ciertos parámetros a nivel de cultivo *in vitro* que pueden afectar la eficiencia de transfección. Estos parámetros incluyen el explante (tipo, tamaño y edad), el medio de cultivo (fitoreguladores, fuente de carbono, macro y micronutrientes) y condiciones

ambientales (temperatura, luz y pH) (Herrera-Estrella, *et al.*, 2004; Bhatia, Ashwath, Senaratna, & Midmore, 2004). Por ende, es necesario establecer un protocolo propio que sea eficiente y reproducible, para que en futuras investigaciones se lo pueda emplear para la producción masiva de principios bioactivos de interés comercial para nuestro país.

Justificación del Problema

Hoy en día, los diferentes métodos de transfección genética se han convertido en una herramienta importante para mejorar genéticamente a las plantas. La introducción de genes de interés en el genoma de las plantas (Mubeen, Naqvi, Masood, Shoaib, & Raza, 2016) de manera precisa y sin involucrar la fusión de gametos u otras células (Kalia, 2018), ha permitido obtener plantas con mejores características como: rendimiento, resistencia a enfermedades, tolerancia al estrés y producción de nutrientes (Hawkins, 2017). Las plantas como biorreactores son una alternativa para producir proteínas recombinantes como una fuente barata y accesible de productos farmacéuticos de alto valor, que van desde vacunas y anticuerpos hasta péptidos terapéuticos (Murphy, 2004).

En las plantas, la transferencia de genes se puede lograr por varios métodos físico o químicos, pero presentan desventajas y baja eficiencia de transfección para entregar el DNA. Por lo cual, un método alternativo de transfección muy empleado a nivel de laboratorio para diversas especies vegetales es mediante el uso de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, por su eficiencia de transfección (Wang, 2015), bajo costo y facilidad de protocolo (Hansen & Wright, 1999).

La transfección mediada por *Agrobacterium* es una tecnología prometedora para obtener plantas transfectadas bioseguras (Mehrotra & Goyal, 2016), debido a las ventajas que tiene el proceso de transferencia del T-DNA sobre los métodos directos, incluida la posibilidad de transferir segmentos de DNA de gran tamaño (Ko & Korban, 2004). Este método inserta un menor número de copias del transgén en un solo locus en el cromosoma de la planta huésped (Rivera, *et al.*, 2012), lo que ayuda a minimizar el silenciamiento génico (Mehrotra & Goyal, 2016) y permite tener una herencia estable con expresión génica constante del transgén a lo largo de las generaciones (Rivera, *et al.*, 2012).

La mayoría de experimentos de transfección en plantas, se han llevado a cabo utilizando al tabaco como planta de estudio (Ganapathi, Suprasanna, Rao, & Bapat, 2004). La primera transformación genética se realizó en 1983, insertando en tabaco el gen de resistencia a kanamicina mediante *A. tumefaciens* (Horsch, *et al.*, 1985), convirtiendo al tabaco en un modelo adecuado para estudios de transfección genética (Stolarz, Macewicz, & Lörz, 1991). *Nicotiana tabacum* (tabaco) tiene una alta frecuencia de transfección debido a la alta susceptibilidad a *A. tumefaciens* y la capacidad de regeneración *in vitro* (Clemente, 2006), lo que la convierte en una planta muy usada para estudios de producción de proteínas recombinantes, anticuerpos y químicos especiales para su uso en la medicina e industria (Ganapathi, *et al.*, 2004).

Actualmente, el método de transfección mediante el disco de la hoja es el más utilizado para la transformación genética del tabaco (Horsch, *et al.*, 1985). Sin embargo, existen otros explantes como el callo de *N. tabacum* o suspensiones celulares que pueden facilitar la transfección con *Agrobacterium* mediante cocultivo (Su & Lee, 2007),

debido a que son células en crecimiento o en división activa (An, 1985). A partir de 1986 se logró expresar en callos transgénicos de tabaco y girasol la hormona de crecimiento humano (Sommergruber, *et al.*, 1986). Otras proteínas como la interleucina 2 (IL-2) y 4 (IL-4) (Magnuson, *et al.*, 1998), el antígeno de superficie para la hepatitis B (Mayo, Gonzales, & Mason, 2006), el anticuerpo de cadena sencilla Fv (scFv), entre otras se han logrado producir en suspensiones celulares a partir de callos transfectados de tabaco. Estos estudios muestran que diversas proteínas farmacéuticas bioactivas se pueden producir en plantas a partir de otros tipos de explantes, que pueden incrementar la eficiencia del proceso.

Por lo antes mencionado, se planteó la presente investigación con el objetivo de estandarizar el protocolo de transfección de callo y suspensiones celulares de tabaco (*Nicotiana tabacum*) mediante *A. tumefaciens* con los genes reporteros GUS y GFP con el fin de que en futuras investigaciones se pueda emplear este método para insertar y expresar genes de proteínas de interés en callos transfectados. Además, de establecer posteriormente suspensiones celulares como una biofábrica vegetal y producir numerosas proteínas recombinantes en nuestro país que puedan ser usadas en la industria farmacéutica, de enzimas o química sin la necesidad de regenerar plantas transgénicas.

Objetivos

Objetivo General

Estandarizar el método de transfección de callo y suspensiones celulares de tabaco (*Nicotiana tabacum*) mediante *Agrobacterium tumefaciens*.

Objetivos Específicos

- Establecer un procedimiento de desinfección de hojas de tabaco para la formación callo.
- Implementar una metodología de inducción de callo a partir de explantes de hojas de tabaco.
- Establecer un protocolo de transfección de callos y suspensiones celulares con *Agrobacterium tumefaciens* a partir de resultados preliminares mediante marcadores de selección y genes reporteros.

Marco Teórico

Tabaco (Nicotiana tabacum)

Generalidades. *Nicotiana tabacum* o tabaco, es una especie de importancia comercial a nivel mundial (Lewis & Nicholson, 2007), cuyo origen se encuentra en las tierras altas de los Andes, probablemente Bolivia o el norte de Argentina (Hirst, 2019). Actualmente, su cultivo se ha introducido ampliamente en el resto del mundo y está bien representado en las Indias Occidentales, Mesoamérica, América del Sur, en las Islas del Pacífico, así como en Asia, Europa y África (CABI, 2019).

En la actualidad el tabaco ya no se encuentra en estado silvestre en la naturaleza debido a la selección natural y a los sudamericanos aborígenes (Goodspeed, 1964), quienes tenían preferencias por sus genotipos para fumar, masticar o con fines medicinales por la acumulación de nicotina como el alcaloide predominante (Gerstel ,

1961). El tabaco se lo emplea principalmente para la producción de cigarrillos (Van, 2011), como sustancia psicoactiva, narcótico y analgésico (Hirst, 2019).

El tabaco ($2n=48$) es el resultado de la duplicación cromosómica por la hibridación entre *N. sylvestris* y *N. tomentosiformis* (Lewis & Nicholson, 2007). Es una planta dicotiledónea que pertenece a la familia de las solanáceas (Chaverri, 1995), género *Nicotiana* y especie *Nicotiana tabacum* (NCBI, 2020).

Descripción Botánica. *Nicotiana tabacum* es una planta herbácea perene o arbusto que mide entre uno a dos metros de alto según la variedad (Agyare, Obiri, Boakye, Osafo, & Kuete, 2013). La planta de tabaco (Fig.1) presenta hojas elípticas u obovadas sentadas en el tronco (Batoro & Ekowati, 2017); flores agrupadas al final de las ramas con un cáliz cilíndrico de color verdoso a rojizo en la parte superior (Higa de Landoni, 1990); un fruto con forma de cápsula ovoide (15-20 mm) y semillas marrones, estriadas, globosas o elipsoides, de 0.5 mm de largo (TRAMIL, 2017). El cultivo de tabaco requiere para su crecimiento una temperatura promedio de al menos 25 °C, tierras bajas tropicales de hasta 1800 m sobre el nivel del mar, con una mezcla de arcilla y arena para una buena capacidad de retención de agua (Batoro & Ekowati, 2017).

Figura 1

Ilustración de Nicotiana tabacum (Tabaco).



Nota. Tomado de *Medicinal plants. Being descriptions with original figures of the principal plants employed in medicine and an account of the characters, properties, and uses of their parts and products of medicinal value*, por Bentley & Trimen, 1880

Propiedades e Importancia. El uso de tabaco se remonta hace 8000 años, donde los indígenas en América del Norte lo utilizaban tanto para fines medicinales como ceremoniales (Koob, Arends, & Le Moal, 2014). A nivel medicinal, *N. tabacum* se utiliza para curar heridas, tratar diversas enfermedades de la piel, tratar úlceras (Jain & Borthakur, 1986), prevenir la fatiga, blanquear los dientes, tratar los abscesos, purgar las fosas nasales, aliviar la sed (Koob, *et al.*, 2014) e inclusive como pesticida (Villégier, Blanc, Glowinski, & Tassin, 2003).

El cultivo de tabaco (*Nicotiana*) es importante en el ámbito comercial (Villégier, *et al.*, 2003), porque las hojas secas se emplean como ingrediente principal para la elaboración de cigarrillos por su contenido de nicotina (0,6-9%) (Batoro & Ekowati, 2017). Sin embargo, la nicotina es una sustancia que produce metilación en el DNA, lo que puede resultar en tumores y cáncer (Christenhusz, Fay, & Chase, 2017).

El tabaco (*N. tabacum*) se ha convertido en un modelo de estudio durante las últimas décadas. En el área de cultivo de tejidos se lo ha empleado para la fusión de protoplastos, proporcionando información sobre el potencial de hibridación somática en otros cultivos (Ganapathi, *et al.*, 2004). A nivel de ingeniería genética, desde la primera planta transgénica obtenida en tabaco, se lo ha empleado en protocolos de transfección con *Agrobacterium* para estudios de expresión y estabilidad de genes por su alta susceptibilidad a *A. tumefaciens* y alta tasa de transfección (Clemente, 2006; Ganapathi, *et al.*, 2004; Ghag, Adki, Ganapathi, & Bapat, 2016). Esto ha permitido la producción de proteínas recombinantes, vacunas, anticuerpos y químicos para usos en la medicina e industria a partir de plantas transgénicas como biorreactores (Ganapathi, *et al.*, 2004).

Callogénesis

La callogénesis es un proceso que implica la formación de callo (Ogita, 2015), el cual consiste en una masa desorganizada de células no diferenciadas (Dey & Harborne, 1997). En general, el callo se induce en o sobre partes de una planta intacta por heridas, por la presencia de insectos o microorganismos, o como resultado del estrés (George, Hall, & De Klerk, 2008). A nivel *in vitro* se puede obtener callo, colocando

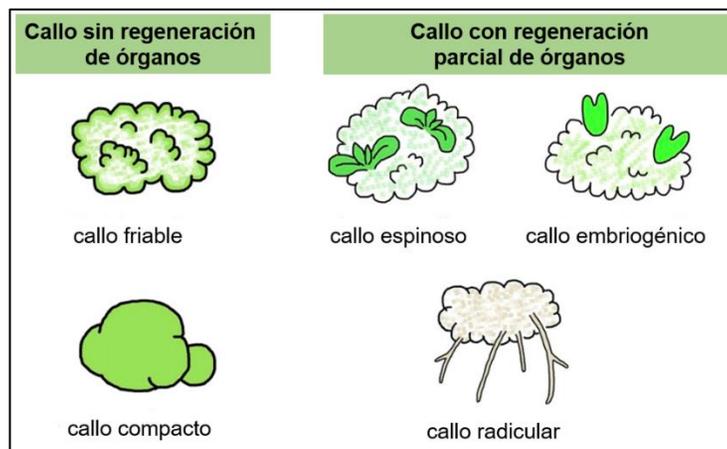
diferentes tipos de explantes vegetales en medio semisólido con la mezcla apropiada de hormonas de crecimiento vegetales (auxinas y citoquinas) bajo condiciones estériles (Murashige & Skoog, 1962), así como para cambiar el estado inactivo de las células y comenzar la división activa formando tejido indiferenciado (George, *et al.*, 2008).

El callo cuando se forma en los explantes originales toma el nombre de callo primario, mientras que cuando se inicia el callo a partir de una sección de tejido calloso primario se llama callo secundario (George, *et al.*, 2008). Los callos obtenidos pueden mantenerse por períodos indefinidos mediante subcultivos sucesivos en medio nuevo, pero a largo plazo pueden producir cambios genéticos y epigenéticos en las células, dando como resultado diferencias entre una cepa de callo y otra (Bhatia, *et al.*, 2015).

Existen diferentes tipos de callos (Fig. 2) de acuerdo a sus características macroscópicas (apariencia, color, grado de compactación) y potencial morfogénico (George, *et al.*, 2008). Los callos sin regeneración aparente de órganos generalmente se llaman callos friables o compactos. Otros callos que muestran algunos grados de regeneración de órganos se llaman callos radiculares, espinosos o embrionarios, dependiendo de los órganos que generan (Zimmerman, 1993).

Figura 2

Ilustración de tipos de callo de plantas.



Nota. Tipos de callos formados en explantes de hojas. Tomado de *Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression*, por Ikeuchi, Sugimoto, & Iwase, 2013, The Plant Cell.

Material Vegetal Para la Formación de Callos. La formación de callos se puede lograr en diferentes tipos de explantes como hojas, tallos o semillas (Smith, 2013). El éxito en la obtención de callos depende tanto de la especie de la planta utilizada como de las condiciones proporcionadas. Las plantas dicotiledóneas son bastante susceptibles a la inducción de callos, en comparación con las monocotiledóneas, mientras que en las plantas leñosas el crecimiento de callos es generalmente lento (Bhatia, *et al.*, 2015). Es recomendable seleccionar explantes jóvenes porque tienen una rápida respuesta *in vitro* para formar callos en relación a tejidos viejos. Se deben aplicar protocolos de desinfección a los explantes antes de colocar en el medio de cultivo solidificado y suplementado con los respectivos reguladores de crecimiento para evitar problemas de contaminación (Smith, 2013).

Medio de Cultivo Para la Formación de Callos. En general, para formar y mantener callos se emplea un medio de agar semisólido suplementado con nutrientes específicos, sales y vitaminas (Efferth, 2019). El medio comúnmente empleado para la formación de callos es el medio basal Murashige y Skoog (Murashige & Skoog, 1962). Este medio MS facilita el crecimiento de la mayoría de las células vegetales en cultivo *in vitro*, debido a la alta concentración de sales como nitrato, potasio y amonio en relación a otras formulaciones de medios (Smith, 2013; Husin, Hasan, & Taha, 2005). La formación del callo se puede estimular adicionando al medio MS las vitaminas mioinositol y tiamina (Dodds & Roberts, 1985) junto con reguladores de crecimiento de plantas como auxina y citoquininas. Se debe tomar en cuenta la especie de planta, la fuente del explante o genotipo de planta individual, edad, estado nutricional, entre otros factores (Smith, 2013).

La mayoría de las células no diferenciadas presentes en el callo suelen perder la capacidad de fotosíntesis provocando que su perfil metabólico no coincida con el de la planta donante. Por tal razón, se requiere la adición al medio de cultivo de vitaminas y fuentes de carbono (Hill, 2019) como la sacarosa o glucosa al 2-5% (p/v) (Smith, 2013). Se pueden usar otros carbohidratos como maltosa, galactosa o sorbitol por su costo, fácil disponibilidad, asimilación rápida y estabilidad (Sarkar, 2009).

Reguladores de Crecimiento Para la Formación de Callos. Las fitohormonas u hormonas vegetales son producidas en forma natural en las plantas e intervienen en los procesos fisiológicos (Davies, 2010). Cuando estas sustancias se producen sintéticamente, se denominan reguladores del crecimiento de las plantas (PGR) (Santner, Calderon-Villalobos, & Estelle, 2009). En la Tabla 1 se muestra una lista de

los reguladores de crecimiento de plantas que comúnmente se usan, así como su abreviación y su peso molecular.

Tabla 1

Reguladores de crecimiento usados en cultivo de tejido de plantas

Regulador de crecimiento en plantas	Abreviación	Peso Molecular (g/mol)
Ácido abscísico	ABA	264,3
Ácido indol-3-acético	IAA	175,2
Ácido naftalenacético	NAA	186,2
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	2,4-D	221
Ácido indol-3-butírico	IBA	203,2
6-Furfurilaminopurina	Kinetina	215,2
6-Bencilaminopurina	BA	225,2
N ⁶ (² -Isopentenil) adenina	2iP	203,2
Trans-6-(4-hidroxi-3-metilbut-2-enilamino) purina	Zeatina	219,2
Ácido giberélico	GA ₃	346,4
Thidiazurón	TDZ	220,2

Nota. Reguladores de crecimiento de plantas que se adicionan al medio de cultivo *in vitro*.

Tomado de *Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments* (p. 35), por Smith, 2013, Academic Press.

Los reguladores de crecimiento se suministran en el medio de cultivo para inducir la formación de callos en los explantes. Se pueden suplementar de tres maneras: solo auxina, solo citoquinina o tanto auxina como citoquinina (Bhatia, *et al.*, 2015). Una proporción intermedia de auxina y citoquinina promueve la inducción de callos, una alta proporción de auxina a citoquinina induce la regeneración de raíces y una alta proporción de citoquinina a auxina induce la regeneración de brotes (Skoog & Miller, 1957). Otras hormonas, como los brasinoesteroides o el ácido abscísico, también inducen callos y en algunas especies pueden sustituir la auxina o la citoquinina (Goren,

Altman, & Giladi, 1979). Sin embargo, la auxina y la citoquinina han sido las hormonas más utilizadas y estudiadas en la formación de callos y en la posterior regeneración de órganos (Ikeuchi, *et al.*, 2013).

Las auxinas se usan generalmente en cultivos de células vegetales en un rango de concentración de 0.01-10.0 mg/L (Sigma-Aldrich, 2020). El efecto de la auxina está implicada en la regulación del alargamiento, la división y la diferenciación celular (Dietz, Kutschera, & Ray, 1990), la hinchazón de los tejidos, la formación de raíces adventicias, la inhibición de la formación de brotes adventicios y axilares, el inicio y crecimiento de callo, y la inducción de embriogénesis (Sigma-Aldrich, 2020). Además, las auxinas hacen que el ADN se vuelva más metilado de lo habitual y esto podría ser necesario para la reprogramación de las células diferenciadas comenzando la división celular (George, *et al.*, 2008). La auxina comúnmente utilizada para la inducción de callos es 2,4-D pero también se usan ANA e IAA (Chawla, 2011).

Las citoquininas se usan generalmente en cultivos de células vegetales en un rango de concentración de 0.1-10.0 mg/L (Sigma-Aldrich, 2020). Cuando se agregan en concentraciones apropiadas pueden promover el crecimiento celular en ciertos tejidos (Rayle, Ross, & Robinson, 1982), regular la división celular, estimular la proliferación de brotes axilares y adventicios, regular la diferenciación, inhibir la formación de raíces, activar la síntesis de ARN y estimular la actividad de proteínas y enzimas (Sigma-Aldrich, 2020). En general, las citoquininas utilizadas para la producción de callos son BA, BAP, zeatina, kinetina y, más recientemente, TDZ (Alam, *et al.*, 2010).

Factores Físicos Para la Formación de Callos. La inducción y mantenimiento callos requiere de factores como temperatura, luz, humedad, pH y aireación en el medio de cultivo (Efferth, 2019). Usualmente, se requiere una temperatura entre 22-28 °C, bajo luz u oscuridad, aunque algunos callos necesitan condiciones específicas de día y noche (16h de luz y 8h de oscuridad) (Vasil, 1984; Efferth, 2019). Adicionalmente, se emplea tiras de Parafilm o plástico alrededor de las cajas Petri o tapones de algodón para mantener la humedad y permitir la entrada de aire a los explantes durante las cuatro semanas que dura la formación del callo (Vasil, 1984).

Aplicaciones del Cultivo de Callos. El cultivo de callo puede ser usado como material fuente para el aislamiento de protoplastos, embriogénesis somática, organogénesis, producción de plantas agrícolas por regeneración, así como inóculo para el inicio de cultivos de suspensiones celulares (Smith, 2013; Efferth, 2019). Además, pueden servir como una mejor fuente de células para la manipulación genética de los genomas de las plantas mediante transfección genética y mantenerse de forma indefinida en condición *in vitro* durante períodos de tiempo más largos (Bhatia, *et al.*, 2015).

Generalmente, se emplean callos para la biosíntesis de metabolitos secundarios, pero últimamente han llamado la atención para la producción de anticuerpos terapéuticos como péptidos y proteínas recombinantes (Efferth, 2019) como alternativa a la producción en microorganismos (*E. coli*, *B. subtilis* y *S. cerevisiae*) o en cultivos de células de mamíferos. La rentabilidad, la producción a gran escala y la seguridad del uso de callos, mediante la inserción de genes de interés que codifican anticuerpos terapéuticos específicos en las células callosas empleando *Agrobacterium tumefaciens*

o bombardeo de partículas es una ventaja en comparación con otros sistemas de producción (Aravindaram & Yang, 2009).

Suspensiones Celulares a Partir de Callo. Los cultivos celulares o en suspensión son células individuales o pequeños agregados de células que se multiplican mientras se suspenden en medio líquido agitado (Kumar, 2015). Las suspensiones celulares se obtienen colocando un inóculo de callo friable en matraces con medio líquido sea Murashige y Skoog (Murashige & Skoog, 1962) o Gamborg (Gamborg, Miller, & Ojima, 1968). El cultivo de suspensiones celulares debe mantenerse bajo agitación para que las células individuales se desprenden y por división formen cadenas y grupos celulares que nuevamente se fracturan, generando nuevas células individuales y otros grupos de células pequeñas (George, *et al.*, 2008). Las células se cultivan en medio de cultivo líquido que contiene las mismas hormonas que indujeron la formación del callo para promover el crecimiento rápido y prevenir la diferenciación (Murashige & Skoog, 1962).

Los cultivos en suspensión celular se pueden usar en investigaciones bioquímicas, de fisiología celular, de crecimiento, metabolismo, en experimentos de ingeniería genética, así como en la producción de metabolitos secundarios de mediana o gran escala y otros productos químicos (Loyola-Vargas, De-La-Peña, Galaz-Ávalos, & Quiroz-Figueroa, 2008). Las suspensiones celulares también pueden ser usadas en la propagación de plantas, al tener una tasa de crecimiento celular más rápido en comparación al cultivo de callos, porque se puede modificar o cambiar fácilmente el medio de cultivo (George, *et al.*, 2008).

En el caso de las suspensiones celulares de tabaco se pueden mencionar que son líneas celulares de propagación simples, bien establecidas y con características de crecimiento favorables (Hellwig, Drossard, Twyman, & Fischer, 2004). Son ampliamente usadas como líneas celulares huésped en protocolos de transfección empleando *A. tumefaciens* junto con vectores binarios (An, 1985; Allen, *et al.*, 1996) para la producción de proteínas recombinantes como biofábricas vegetales (Hellwig, *et al.*, 2004) y para estudios de localización subcelular de proteínas (Persson, *et al.*, 2001).

Métodos de Transfección de Genes en Plantas

Existen diferentes métodos para transferir e integrar DNA foráneo en el genoma de células o tejidos vegetales, con el objetivo de expresar genes con características de interés mediante métodos directos e indirectos (Chawla, 2011; Keshavareddy, Kumar, & Ramu, 2018). Los métodos directos (métodos químicos y físicos) incluyen electroporación, bombardeo de partículas, microinyección y por medio de compuestos químicos (Herrera-Estrella, *et al.*, 2004). Los métodos indirectos emplean vectores biológicos como *A. tumefaciens* o *A. rhizogenes* (Mubeen, *et al.*, 2016).

La electroporación es un método que consiste en aplicar impulsos eléctricos a células de plantas para inducir la apertura transitoria de poros en la membrana celular y permitir la entrada del DNA hacia el núcleo (Narusaka, Narusaka, & Iwabuchi, 2012). Generalmente, se aplica en protoplastos porque las células vegetales presentan una pared celular gruesa, lo que impide el movimiento de macromoléculas (Bates, 1999). La electroporación no se usa con mucha frecuencia debido a que presenta ciertas desventajas como: baja eficiencia de transfección, expresión transitoria del transgén

(Higo & Higo, 1996), alta tasa de mortalidad de las células electroporadas y segregación no mendeliana de la progenie (Mubeen, *et al.*, 2016).

El bombardeo de partículas es otro método de transfección, el cual consiste en disparar partículas de oro o tungsteno (1-2 μm) cubiertas con DNA foráneo en la suspensión celular, cultivo de callos o tejido objetivo a velocidades supersónicas para que el DNA de interés penetre la membrana celular y se incorpore en núcleo de la célula vegetal (Narusaka, *et al.*, 2012). Este método presenta ciertas desventajas tales como daño en el tejido, baja eficiencia de transfección comparado con *Agrobacterium*, altos costos en sus equipos, genera rearrreglos en el DNA transferido, produce silenciamiento genético y variación en la expresión del transgén debido a la inserción de múltiples copias del DNA foráneo en un solo locus (Dai, *et al.*, 2001; Darbani, *et al.*, 2008).

La técnica de transfección mediante microinyección permite introducir DNA en el núcleo o citoplasma de manera precisa por medio de una pipeta de microcapilar de inyección de vidrio (Crossway, *et al.*, 1986). Se emplea principalmente para transfectar células animales, pero también en plantas donde presenta limitaciones por la pared celular gruesa debido a que contiene lignina y celulosa (Lörz, Paszkowski, Dierks-Ventling, & Potrykus, 1981). La microinyección en plantas emplea protoplastos como material de transfección con eficiencias de transformación altas, pero requiere equipos costosos con procedimientos tediosos (Darbani, *et al.*, 2008).

La transfección mediante compuestos químicos, consiste en el uso de polietilenglicol (PEG) o fosfato de calcio para aumentar la permeabilidad de la

membrana celular y permitir la entrada de DNA extraño (Lazzeri, Brettschneider, Lührs, & Lörz, 1991). Este método presenta ciertas desventajas, como baja eficiencia de transfección, poca reproductibilidad, puede generar toxicidad en las células (Danilova, 2007) y no es un método muy empleado para la transfección de plantas, porque es efectivo solo cuando se aplica a protoplastos (Lazzeri, *et al.*, 1991).

Los métodos de transfección indirectos implican el uso de vectores biológicos para la introducción de DNA exógeno en el genoma de la planta (Veluthambi, Gupta, & Sharma, 2003). Los vectores biológicos más utilizados por su patogenicidad natural en plantas son las bacterias *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium rhizogenes* mediante sus plásmidos Ti (inductor de tumores) y Ri (inductor de raíces), respectivamente (Rakoczy-Trojanowska, 2002). La transferencia de DNA mediada por *Agrobacterium tumefaciens* y la transferencia directa a través del bombardeo de partículas son los métodos de transfección más utilizados y eficientes en plantas (Herrera-Estrella, *et al.*, 2004).

Transfección de Plantas Mediante Agrobacterium

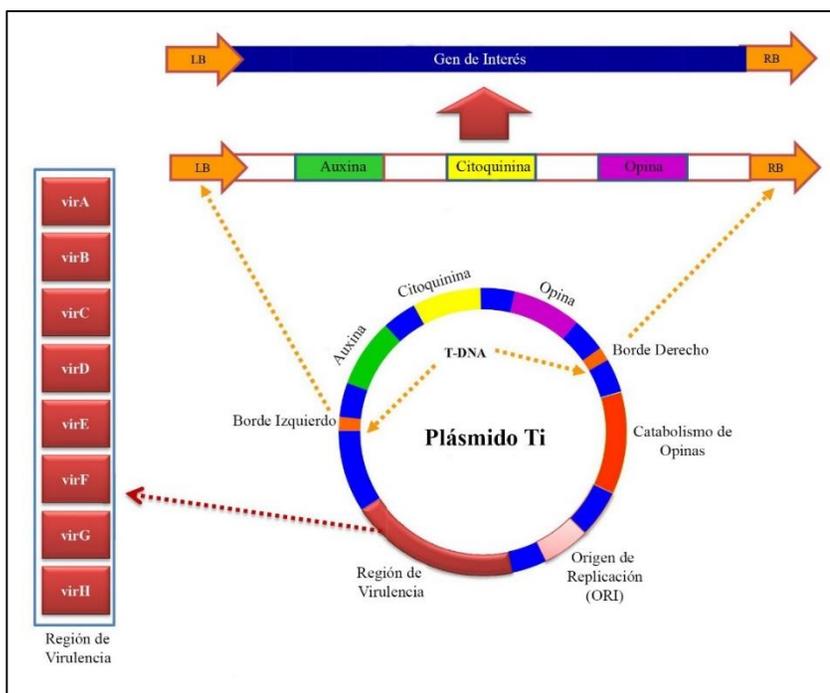
La transfección genética mediante *Agrobacterium* es el método más usado dentro de ingeniería genética de plantas (Bartlett, Alves, Smedley, Snape, & Harwood, 2008). *Agrobacterium tumefaciens* es una bacteria patógena presente en el suelo que transfecta plantas dicotiledóneas, monocotiledones y gimnospermas (Mubeen, *et al.*, 2016). Esta bacteria produce la enfermedad conocida como agalla de corona en plantas dicotiledóneas, mediante la transferencia e integración de manera estable del DNA de

transferencia (T-DNA) de su plásmido inductor de tumor (Ti) en el genoma nuclear de la planta infectada (Binns & Thomashow, 1988; Tzfira, Li, Lacroix, & Citovsky, 2004).

El plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* tiene un tamaño de 200 Kb, el cual contiene el T-DNA (10 a 30 Kb) que se encuentra delimitado por secuencias repetidas de 25-28 bp conocidas como borde izquierdo (RL) y borde derecho (RB) (Yadav, Vanderleyden, Bennett, Barnes, & Chilton, 1982). En la figura 3 se puede observar una representación esquemática del plásmido Ti con los diferentes genes que codifica.

Figura 3

Representación esquemática del plásmido Ti.



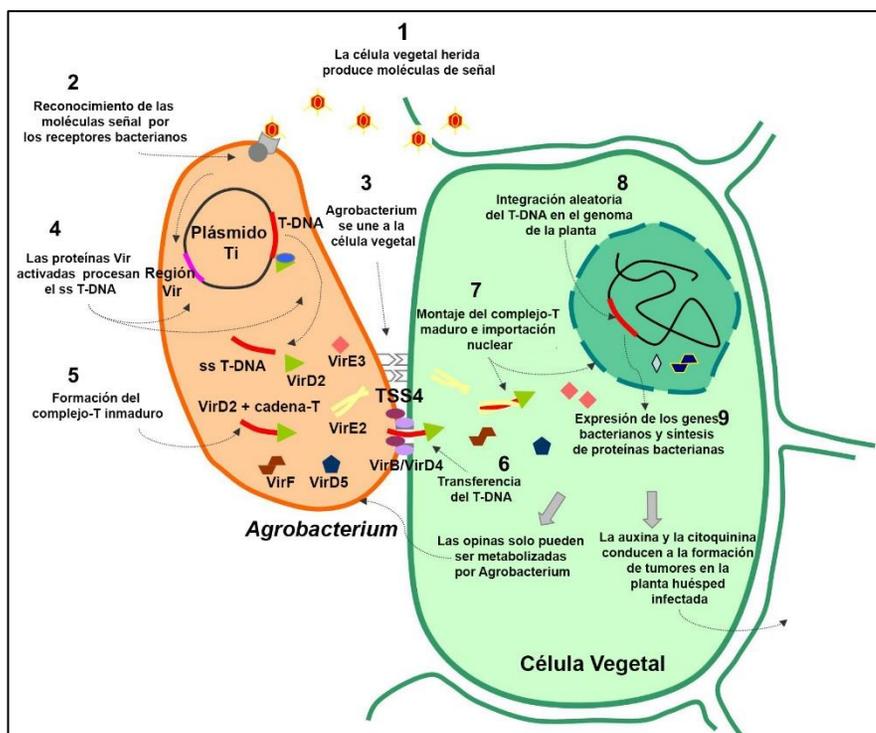
Nota. Estructura de un plásmido en *A. tumefaciens*. Tomado de *Agrobacterium-Mediated Alien Gene Transfer Biofabricates Designer Plants* (p. 64), por Mehrotra, & Goyal, 2016, Academic Press.

En el T-DNA se localizan los oncogenes que expresan en las plantas hormonas como auxinas y citoquininas. Estas hormonas son responsables de la proliferación y diferenciación no controlada de la célula vegetal en forma de tumores (Koncz & Schell, 1992). Los oncogenes del T-DNA pueden ser reemplazados con un gen de interés para transferirlos e integrarlos en el genoma de la planta (Mehrotra & Goyal, 2016). En otra región del plásmido se encuentra la región *vir*, la cual contiene 35 genes contenidos en ocho operones encargados del transporte e integración del T-DNA a la célula vegetal (Gelvin, 2003; Mozo & Hooykaas, 1992).

En la figura 4 se puede observar el proceso de transfección natural de *A. tumefaciens*, el cual inicia cuando compuestos fenólicos, acetoseringona y azúcar producidos por la herida de la planta son reconocidos por la proteína VirA, la cual se autofosforila y fosforila la proteína VirG para activar la transcripción y expresión de los genes de virulencia *vir*, encargados del procesamiento y transporte del T-DNA (Das & Pazour, 1989; Pazour & Das, 1990).

Figura 4

Ilustración de los pasos del proceso de infección y transfección de plantas mediada por *A. tumefaciens*.



Nota. Tomado de *Agrobacterium tumefaciens: From crown gall tumors to genetic transformation* (p. 79), por Păcurar, et al., 2011, Physiological and Molecular Plant Pathology.

Las proteínas VirD1 (helicasa) y VirD2 (endonucleasa) se unen y cortan el DNA en las secuencias de repetición de borde del T-ADN para liberarlo en forma monocatenaria (cadena-T) (Jayaswal, Veluthambi, Gelvin, & Slightom, 1987; Lacroix, Li, Tzfira, & Citovsky, 2006). La proteína VirD2 se une al extremo 5' de la cadena-T, formando el complejo-T para que sea transferido al citoplasma de la planta mediante el sistema de secreción tipo IV (T4SS) formado por 11 proteínas VirB y la proteína VirD4 (Christie, 2004; Fronzes, Christie, & Waksman, 2009).

Independientemente, y utilizando la ruta T4SS, otras proteínas de virulencia bacteriana (VirD5, VirE2, VirE3 y VirF) se exportan a la célula huésped (Lacroix, *et al.*, 2006). La proteína VirE2 se une al complejo-T y junto con la VirD2 protegen a la cadena-T de la degradación de exonucleasas en el citoplasma y núcleo de la planta (Dürrenberger, Cramer, Hohn, & Koukolíková-Nicola, 1989; Rossi, Hohn, & Tinland, 1996). Las dos proteínas contienen una señal de localización nuclear que guían el complejo-T hacia el núcleo (Gelvin, 2003). En el núcleo, la proteína F elimina las proteínas del T-DNA monocatenario antes que se convierte en una molécula bicatenaria para integrarse al azar en el genoma de la planta mediante recombinación no homóloga (Tzfira, *et al.*, 2004; De la Riva, *et al.*, 1998).

Ventajas y Desventajas del Método de transfección con *Agrobacterium*. La transfección de plantas empleando *Agrobacterium* es la primera opción a nivel de laboratorio para transfectar plantas por su alta eficiencia y ventajas respecto a otros métodos de transfección. Entre sus ventajas se encuentran: la transferencia de fragmentos de ADN con extremos definidos con un reordenamiento mínimo (Klee, Horsch, & Rogers, 1987; Zambryski, 1988); la transferencia de segmentos grandes de DNA; un bajo número de copias de los transgenes integrados con pocas copias en tándem del T-DNA integrados en un solo locus (Jorgensen, Snyder, & Jones, 1987), herencia estable (forma mendeliana) y expresión de transgenes en la progenie (Komari & Kubo, 1999). Estas características evitan el silenciamiento genético del transgén una vez incorporado en el genoma de la célula huésped (Gelvin, 2003). Además, no requiere de equipos sofisticado o del cultivo de protoplastos, por lo cual se pueden emplear diferentes tejidos vegetales (Hansen & Wright, 1999; Veluthambi, Gupta, & Sharma, 2003; Filipecki & Malepszy, 2006).

A pesar de las múltiples ventajas que ofrece el método, existen algunos desafíos por resolver para mejorar la técnica. Existen varias especies de plantas económicamente importantes como especies de cereales y forestales que son altamente recalcitrantes a *Agrobacterium tumefaciens*. Adicionalmente, todavía no se ha establecido la integración sitio-específica del T-DNA target en ubicaciones cromosómicas específicas para evitar la integración aleatoria del T-DNA en el genoma de la planta huésped (Mehrotra & Goyal, 2016).

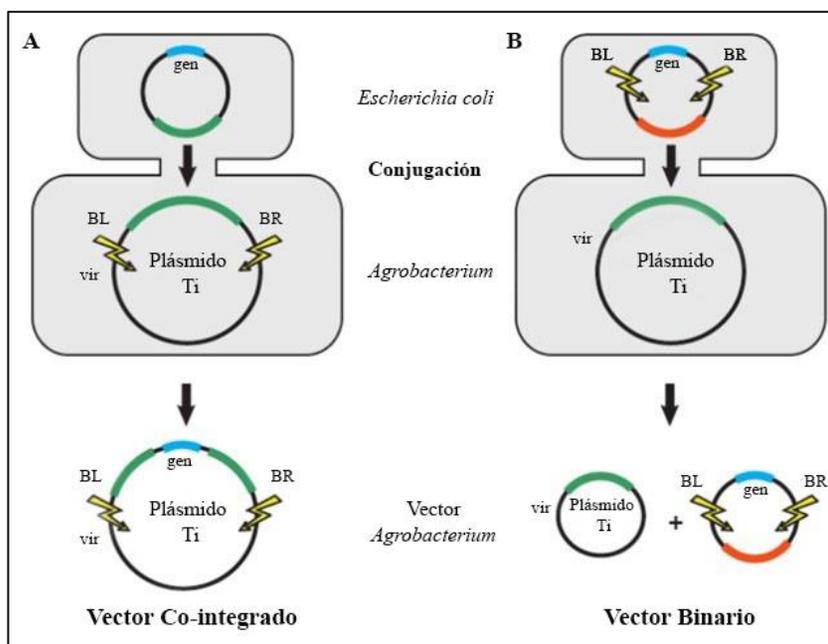
Vectores de Transfección. Al emplear *A. tumefaciens* como una herramienta de transfección genética, se requiere obtener cepas desarmadas sin los oncogenes responsables de la formación de tumores y biosíntesis de opinas del plásmido Ti (Lacroix, *et al.*, 2006). Los oncogenes se sustituyen por genes que codifican marcadores seleccionables sin afectar la capacidad de *Agrobacterium* para transferir el T-DNA (Bevan, Flavell, & Chilton, 1983; Hellens, *et al.*, 2000). Sin embargo, el gran tamaño del plásmido Ti dificulta su manipulación. Por tanto, se han desarrollado vectores de transfección de menor tamaño, conservando sólo las regiones esenciales para la transfección en el plásmido Ti (Azcon-Bieto & Talón, 2013). Existen dos tipos de vectores de transfección en *Agrobacterium*: los vectores co-integrados (Zambryski, *et al.*, 1983) que se integran en el plásmido Ti residente y los vectores binarios que se replican de forma autónoma (Hoekema, *et al.*, 1983; Klee, *et al.*, 1987).

Vectores Co-integrados. Los vectores co-integrados (Fig. 5A) se obtienen integrando en el plásmido Ti desarmado, un vector intermedio de *E. coli* donde se clona el gen de interés y el marcador seleccionable (flanqueados por RB y RL). La cointegración de los dos plásmidos se logra dentro de *Agrobacterium* por recombinación

homóloga (Sangwan, Ochatt, Nava, & Sangwan, 2012), entre las regiones homólogas de los bordes izquierdo del plásmido Ti desarmado y el vector pequeño intermediario (Hille, Van Kan, Klasen, & Schilperoort, 1983).

Figura 5

Representación esquemática de vectores: A) Co-integrados y B) Binarios.



Nota. Tomado de *T-DNA insertion mutagénesis* (p. 6), por Sangwan, *et al.*, 2012, Plant Mutation Breeding and Biotechnology.

Vectores Binarios. Los vectores binarios (Fig. 5B) consisten en dos elementos: un plásmido auxiliar Ti desarmado dentro de *Agrobacterium* que mantiene las funciones de virulencia (Hellens, *et al.*, 2000) y un vector binario pequeño de clonación el cual contiene los bordes del T-DNA que flanquean al gen de interés, al marcador de selección en vegetales y múltiples sitios de clonación (Koncz & Schell, 1992). Fuera del T-DNA se encuentran los orígenes de replicación tanto para *E. coli* como para *A.*

tumefaciens, y los genes que brindan resistencia a antibióticos para seleccionar la presencia del vector binario en las bacterias (Lee & Gelvin, 2008). Aunque el término vector binario se refiere a todo el sistema que consta de dos replicones, uno para el ADN-T y el otro para los genes de virulencia, el plásmido que lleva el T-DNA se denomina frecuentemente vector binario (Komari, *et al.*, 2006).

Plásmido pSiM24. El plásmido pSiM24 (Fig. 6) es un vector binario de aproximadamente 7776 bp con varios elementos. El promotor de transcripción (M24) del virus de mosaico de *Mirabilis* para dirigir la expresión del gen de interés (GFP y GUS) flanqueado por los bordes izquierdo y derecho del T-DNA. Los genes marcadores de selección “*nptII*” y “*bla*” dirigidos por el promotor nopalina sintasa (Nos) para la resistencia a los antibióticos Kanamicina y Ampicilina, respectivamente. Secuencias terminadoras de las subunidades pequeñas de ribulosa bifosfato carboxilasa (3'rbcSE9) y el terminador nopalina sintasa (Nos). Sitios de clonación múltiple (MCS) con varios sitios de restricción y los orígenes de replicación pRK2 y ColE1 para *Agrobacterium* y *E. coli*, respectivamente (Sahoo, Dey, & Maiti, 2014).

Para seleccionar bacterias y mantener plásmidos en de *E. coli* y *A. tumefaciens* (Komari, *et al.*, 2006) se emplean los genes marcadores de selección beta-lactamasa y neomicina fosfotransferasa II (*nptII*). La expresión de estos genes confiere resistencia a los antibióticos ampicilina y la kanamicina, respectivamente (Hershfield, Boyer, Yanofsky, Lovett, & Helinski, 1974; Sutcliffe, 1978). En plantas para la selección de tejidos transfectedados se usa ampliamente el gen *nptII* (Fraley, *et al.*, 1983; Herrera-Estrella, *et al.*, 1983), ya que confiere resistencia a diferentes antibióticos: kanamicina, neomicina, paronomicina y geneticina (Jouanin, Brasileiro, Leplé, Pilate, & Cornu, 1993). Se emplea el gen higromicina fosfotransferasa (*hpt*) pero con menos frecuencia (Waldron, *et al.*, 1985). El gen neomicina fosfotransferasa II (*nptII*) se ha convertido en el gen marcador seleccionable más utilizado en plantas dicotiledónea mediante el uso del antibiótico kanamicina (Mehrotra & Goyal, 2016).

Genes Reporteros. Los genes reporteros codifican productos proteicos que pueden ser detectados fácilmente en células transfectedadas por la nueva característica adquirida, distinguiéndolas de las no transfectedadas (Jones, 2003; Azcon-Bieto & Talón, 2013). La expresión de los genes reporteros puede ser fácilmente monitoreada, porque se fusionan corriente abajo de una región reguladora (promotor constitutivo) responsables de la expresión del gen de interés en plásmidos (Sundaresan & Gambhir, 2002; Komori, *et al.*, 2007). Esto ha permitido el uso de estos genes como como indicadores en protocolos de transfección de plantas y en ensayos de expresión de genes (Mehrotra & Goyal, 2016).

Los genes reporteros más empleados son la β -glucuronidasa (GUS) (Jefferson, Kavanagh, & Bevan, 1987), luciferasa (LUC) (Ow, *et al.*, 1986) o β -galactosidasa (LacZ)

(Helmer, Casadaban, Bevan, Kayers, & Chilton, 1984), los cuales requieren la adición de un sustrato o de algún cofactor para su expresión (Hraška, Rakouský, & Čurn, 2006). El gen GUS se puede visualizar mediante ensayo histoquímico por la formación de un precipitado azul en presencia del sustrato XGluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil glucurónido) (Jefferson, *et al.*, 1987).

Otro gen reportero es el GFP (proteína verde fluorescente), procedente de la medusa *Aequorea victoria*. El gen GFP codifica una proteína que genera un cromóforo en presencia de oxígeno (Siari, 2012) y emite fluorescencia verde cuando se excita con luz azul o luz ultravioleta a 395 o 475 nm (Cubitt, *et al.*, 1995). Esto permite una identificación rápida y no invasiva de las células transfectadas de las no transfectadas (Ravindra, Teixeira da Silva, & Nataraja, 2008), sin el requerimiento de la adición de sustancias que interfieran como sustratos exógenos o enzimas (Chudakov, Lukyanov, & Lukyanov, 2005).

Aplicaciones con la Transfección Mediante *Agrobacterium*. La transfección mediada por *Agrobacterium tumefaciens* ha desempeñado un papel fundamental en el sector agrícola al mejorar la productividad y la calidad de los cultivos de varias especies de plantas importantes incluidas dicotiledóneas y las monocotiledóneas. Esto ha permitido mejorar el contenido nutricional de las plantas, así como su resistencia a los herbicidas, insectos, plagas y enfermedades (Mehrotra & Goyal, 2016).

En la actualidad, las plantas transfectadas con *Agrobacterium* pueden tener una nueva aplicación como biofábricas para la producción de nuevas proteínas recombinantes en células transfectadas con el gen de la proteína de interés (Van der

Krol, Mol, & Stuitje, 1988). Esto permite abrir un nuevo futuro para la industria farmacéutica y de compuestos, porque se pueden producir proteínas de ensamblaje y plegado complejo a menor costo de producción, con rápida escalabilidad y sin la presencia de patógenos que puedan ser perjudiciales para la salud del ser humano (Wang, Yin, & Hu, 2009; Rosales-Mendoza, Paz-Maldonado, & Soria-Guerra, 2012).

Hipótesis

El método estandarizado de transfección de callo y suspensiones celulares de tabaco mediante *Agrobacterium tumefaciens* permite obtener células de tabaco transfectadas.

Capítulo 2: Materiales y Métodos

Participantes

La presente investigación ha sido elaborada por Israel Estuardo Cajas Cajas egresado de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología, bajo la tutoría de la Dra. Karina Proaño Ph.D. jefe del laboratorio de Biotecnología Vegetal. El financiamiento de la investigación estuvo a cargo del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad de las Fuerzas Armada ESPE.

Zona de Estudio

El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE campus ubicado en Sangolquí, ubicado en el cantón Rumiñahui, de la Provincia de Pichincha en la Av. General Rumiñahui S/N y calle Ambato, Sector Santa Clara, Latitud: 0°18'53"S, Longitud: 78°26'36"O.

Duración de la Investigación

El tiempo de duración de esta investigación fue de aproximadamente 12 meses. Se inició en el mes de agosto del 2019 y culminó en agosto del 2020.

Material Vegetal

Siembra y Mantenimiento de Plantas de Tabaco

En la presente investigación se emplearon plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) obtenidas mediante germinación de semillas proporcionadas por el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Las semillas de tabaco se mantuvieron en agua destilada a 4 °C por 48h para eliminar el período de latencia y luego se sembraron 10 semillas por maceta con tierra previamente autoclavada compuesta de tierra negra, pomina y turba (2:1:1). Las macetas se cubrieron con plástico para evitar problemas de contaminación y se mantuvieron a temperatura ambiente bajo invernadero con riego de solución Hoagland tres veces por semana. A los 10 días de germinación se retiró el plástico y las plántulas obtenidas se pasaron a macetas individuales hasta completar 3 meses de edad (Fig. 7).

Figura 7

Plantas de tabaco (Nicotiana tabacum) de tres meses de edad.



Desinfección del Material Vegetal

En el tratamiento fitosanitario se emplearon como explantes, hojas jóvenes y sanas de plantas de tabaco de 3 meses de edad. Las hojas se lavaron en agua corriente, dejando correr el agua sobre los explantes por 30 minutos para eliminar impurezas (Smith, 2013). Luego se sumergieron en una solución de detergente al 2% con agitación por 15 minutos, seguido de 3 lavadas con agua destilada para eliminar el exceso de detergente (Jadán, 2017). Por último, se sumergieron los explantes en diferentes tratamientos de desinfección (Tabla 2), empleando hipoclorito de sodio a diferentes concentraciones (% v/v) y mezclado con 3 gotas de Tween 20, con diferentes tiempos de inmersión.

Tabla 2

Tratamientos de desinfección de explantes de hojas jóvenes de tabaco con hipoclorito de sodio a diferentes tiempos de inmersión.

Tratamiento	Concentración hipoclorito de sodio (v/v)	Tiempo de Inmersión (min)
TD 1	0.0 %	2
TD 2	0.5 %	2
TD 3	1.0 %	2
TD 4	1.5 %	2
TD 5	2.0 %	2
TD 6	0.0 %	5
TD 7	0.5 %	5
TD 8	1.0 %	5
TD 9	1.5 %	5
TD 10	2.0 %	5

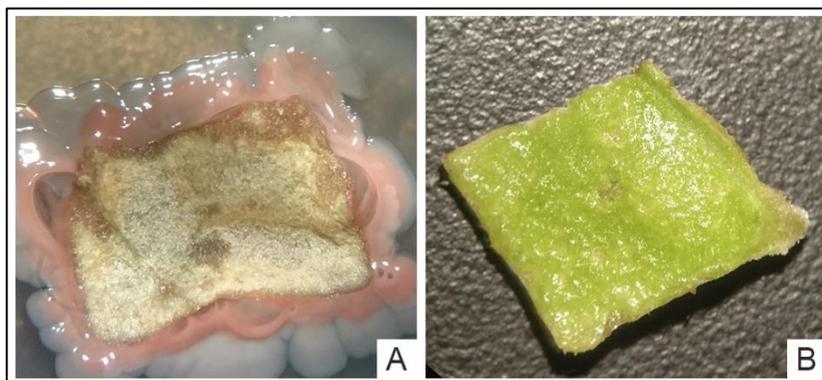
Una vez aplicados los diferentes tratamientos de desinfección, en cámara de flujo laminar se realizaron 3 lavados con agua estéril autoclavada para quitar el

excedente de hipoclorito de sodio. Se introdujeron explantes de 1cm x 1cm en medio Murashige & Skoog (MS) (Anexo 1) suplementado con 30 g/L de sacarosa y 8 g/L de Bacto Agar ajustado a un pH 5.8 como agente gelificante. Luego de 30 días de incubación bajo luz, se evaluaron las variables de respuestas contaminación y necrosamiento.

En el caso de la variable contaminación, se realizaron observaciones en el estereomicroscopio para determinar si el explante presentaba o no contaminación por bacteria u hongo (Fig. 8). Se asignó el valor “uno” al explante contaminado (Fig. 8A) y “cero” al no contaminado (Fig. 8B).

Figura 8

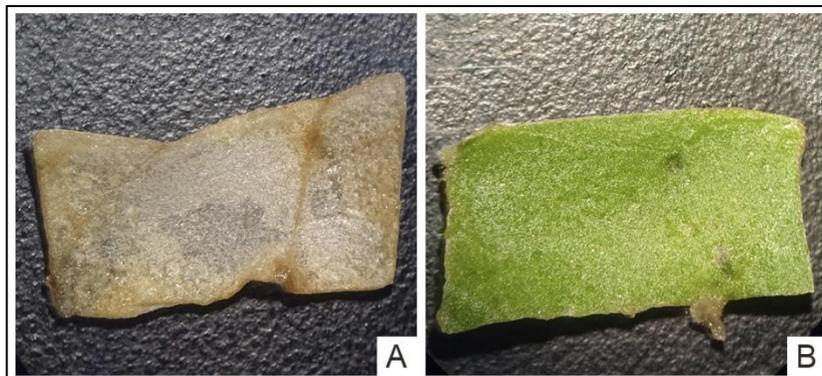
Evaluación de la variable de respuesta de contaminación. (A) Explante contaminado; (B) Explante no contaminado.



En la variable necrosamiento, se determinó si el explante presentaba o no muerte celular. Se asignó los valores “uno” cuando el explante presentaba daño celular (no viable, Fig. 9A) y “cero” si no presentaba (explante viable, Fig. 9B).

Figura 9

Evaluación de la variable de respuesta necrosamiento. (A) Explante necrosado; (B) Explante viable.



El análisis estadístico se realizó mediante análisis exploratorio y diferencial a los 10 tratamientos de desinfección obtenidos en el diseño completamente aleatorizado (DCA) 5x2. Se realizaron 12 repeticiones por tratamiento, teniendo como unidad experimental un explante por frasco con un medio de cultivo. Se emplearon los programas estadísticos R e InfoStat para las diferentes pruebas estadísticas.

Obtención de Callo

Una vez establecido el mejor tratamiento de desinfección, los explantes de hojas de tabaco se cultivaron en medio de inducción de callo MS suplementado con 30 g/L de sacarosa, 0.1 mg/L de tiamina HCl, 100 mg/L de mioinositol como vitaminas y 8 g/L de Bacto Agar ajustado a un pH de 5.8 antes de esterilizar el medio mediante autoclave (Husin, *et al.*, 2005).

Se añadieron al medio reguladores de crecimiento de plantas, en diferentes concentraciones combinadas de ácido naftalenacético (ANA) (0.0; 1.0; 2.0; y 3.0 mg/L) y

Kinetina (0.2 mg/L) (Husin, *et al.*, 2005) con el fin de encontrar la mejor combinación de fitoreguladores que induzcan la formación de callo. Se obtuvo un arreglo factorial 4x1 (Tabla 3) en un diseño completamente al azar (DCA) con un total de 4 tratamientos con 12 réplicas cada uno. Como unidad experimental se estableció un frasco con medio de inducción de callo con un explante de hoja de tabaco de 1cm x 1cm.

Tabla 3

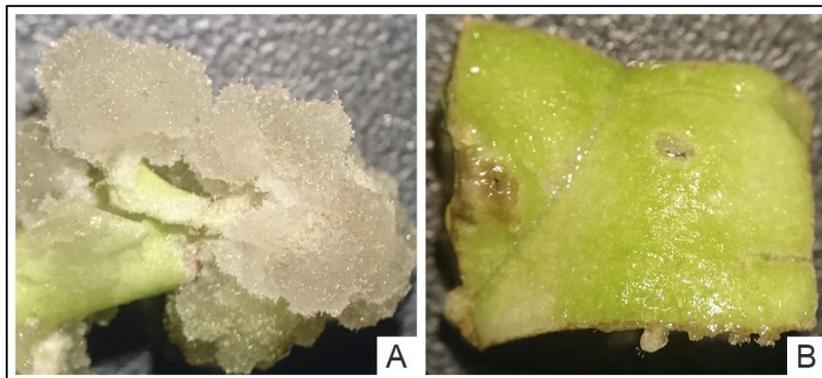
Tratamientos de medios de cultivo con combinaciones de ANA y Kinetina, para la inducción de callos en hojas de tabaco (Nicotiana tabacum).

Tratamiento	Concentración ANA (mg/L)	Concentración Kinetina (mg/L)
TD 1	0.0	0.2
TD 2	1.0	0.2
TD 3	2.0	0.2
TD 4	3.0	0.2

Los segmentos de la hoja se cultivaron bajo 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad (Husin, *et al.*, 2005). Después de 4 semanas de cultivo, se evaluó la variable de respuesta formación de callo en los segmentos de hoja de tabaco (Fig. 10) por la presencia de tejido desdiferenciado, dando valores de “uno” a explantes con presencia de callo (Fig. 10A) y “cero” para ausencia de callo (Fig. 10B).

Figura 10

Callogénesis en explantes de hojas de tabaco. (A) Explante con tejido desdiferenciado; (B) Explante sin presencia de callo.



Los datos del diseño experimental (DCA) se analizaron con los paquetes informáticos InfoStat y R para determinar el mejor tratamiento que induzcan la mayor cantidad de callos a partir de explantes de hojas de tabaco. Se empleó análisis exploratorio mediante construcción de gráficas y análisis inferencial mediante un ANOVA para determinar el tipo de variable a analizar ya sea paramétrica o no paramétrica, seguido de la prueba de Kruskal-Wallis con un nivel de significancia de 0.05 ($\alpha=0.05$) para comparar los tratamientos de presencia de callo.

Establecimiento de Suspensiones Celulares de Tabaco a Partir de Callo

Para la iniciación de suspensiones celulares de tabaco se utilizó el método descrito por Phillips, Hubstenberger y Hansen (1995) y Helgeson (1979) con algunas modificaciones. Usando mecheros de alcohol en cámara se esterilizó la abertura de un matraz Erlenmeyer de 50 mL, después se adicionó 25 mL de medio líquido MS suplementado con 2 mg/L de ANA y 0.2 mg/L de Kinetina para *N. tabacum* y 1 mg/L de

2,4-D para *N. tabacum* BY-2. Luego con la ayuda de un bisturí se rompieron suavemente los callos de *N. tabacum* y *N. tabacum* BY-2 con el mismo bisturí y pinzas esterilizadas se transfirió aproximadamente 1 gramo de trozos de callo al medio líquido, evitando tocar la abertura del matraz. Nuevamente, se esterilizó con calor la abertura del matraz y se cubrió la abertura con plástico y papel aluminio con su respectiva etiqueta.

Se repitieron los pasos anteriores para obtener 4 réplicas de matraces. A continuación, se incubaron los matraces bajo oscuridad con agitación (110 rpm) a 28 °C y cada semana se controló la cantidad de medio para evitar problemas de desecación. Después de 2 mes se obtuvo una suspensión celular con varios grupos de células y células individuales. En este punto se filtraron las células a través de una malla, en un matraz de 100 mL con 25 mL de medio líquido MS con sus respectivos componentes y fitoreguladores para remover los grandes grupos de células y mantener solo células individuales. Finalmente, se estableció la suspensión celular y se subcultivo cada semana en su respectivo medio líquido.

Transfección Genética

Aislamiento y Purificación de los Plásmidos pSiM24-eGFP y pSiM24-GUS

El aislamiento de los plásmidos de DNA se realizó de bacterias *Escherichia coli* DH5 α que contenían los plásmidos pSiM24-eGFP y pSiM24-GUS, empleando el protocolo del kit PureLink® Quick Plasmid Miniprep de la casa comercial Thermofisher. Previo a la extracción de los plásmidos, se sembró una colonia de *E. coli* DH5 α en medio LB líquido con 100 mg/L de Ampicilina y se dejó incubar a 37°C durante 24h.

La extracción se inició con la centrifugación de 2 mL de cultivo saturado de bacterias a 13000 RPM por 1 minuto. Inmediatamente, se añadió 250 µl de buffer de resuspensión (R3) y 250 µl de buffer de lisis (L7), se invirtieron los tubos para homogeneizar la mezcla y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Luego, se adicionó 350 µl de buffer de precipitación (N4) y se mezcló por inversión para nuevamente centrifugar a 13000 RPM durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido se cargó en una columna de centrifugación del kit colocada en un nuevo tubo para su posterior centrifugación a 13000 RPM por 1 minuto.

La purificación se realizó mediante lavados con 500 µl de buffer W10 y 700 µl de buffer W9, seguido de centrifugaciones por separado de 1 minuto a 14000 RPM para eliminar el filtrado en cada centrifugación. Después, se adicionó 75 µL de tampón TE precalentado en el centro de la columna de centrifugación en un nuevo tubo de 1.5 mL y se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente. Finalmente, se centrifugó la columna a 14000 rpm durante 2 minutos, se desechó la columna y se agregó 0.05µL de RNasa al tubo con el filtrado de DNA plasmídico para su almacenamiento a 4 °C hasta su uso.

Para verificar la presencia de los plásmido extraídos pSiM24-eGFP y pSiM24-GUS de *E.coli* DH5α se corrieron geles de agarosa al 0.8% en una solución 1X de TAE (Tris base, ácido acético y EDTA) a 100 voltios y 300 mA por 30 minutos en cámaras de electroforesis horizontales de 100mL. Se empleó el marcador High Mass DNA Leader (Invitrogen).

Preparación de Células Electrocompetentes de Agrobacterium tumefaciens

Para obtener células electrocompetentes se empleó el protocolo descrito por Shen y Forde (1989) y Mersereau, Pazour y Das (1990), con ciertas modificaciones. Se sembró *A. tumefaciens* GV3101 en medio Luria Bertani (LB) con Agar, Rifampicina (50 mg/L) y Tetraciclina (10 mg/L) a 28 °C por 48h, luego se tomó una colonia y se inoculó en 10 mL de medio LB líquido con los mismos antibióticos. Los tubos se incubaron a 28 °C por 48h, luego se inocularon 500 µL células bacterianas en 500 mL de medio LB sin antibiótico y se incubaron bajo agitación (110 rpm) por 24h. Luego de lo cual, se centrifugaron 12 ml a 5640 rpm (2500g) durante 10 minutos. Posteriormente, se realizaron 5 lavados, adicionando 12 mL de agua estéril, seguido de una centrifugación a 5640 rpm por 10 minutos a 4 °C para eliminar el sobrenadante en cada lavado. Finalmente, tras el último lavado, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió las células bacterianas en 1mL de glicerol frío al 10 % (v/v) para realizar alícuotas de 50 µL y congelar con nitrógeno líquido y almacenar las células electrocompetentes de *A. tumefaciens* GV3101 a -80°C hasta su uso.

Electroporación de A. tumefaciens con los Plásmidos pSiM24-eGFP y pSiM24-GUS

Los plásmidos pSiM24-eGFP y pSiM24-GUS con concentraciones de 2406 ng/µl y 3087 ng/µl respectivamente, fueron incorporados en *A. tumefaciens* GV3101 electrocompetente, mediante electroporación con el método descrito por Weigel y Glazebrook (2002) y modificado por Grijalva (2013). En un tubo Eppendorf se añadió 10µL del producto de ligación (plásmido pSiM24) y 50 µL de células bacterianas

electrocompetentes, previamente descongeladas en hielo por 15 minutos. La mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación de 2 mm de grosor y 100 μ L de capacidad, estéril y previamente enfriada en hielo. Luego se aplicó un pulso eléctrico de 2.5 kV durante 5 milisegundos aproximadamente en el electroporador Eporator®, e inmediatamente se añadió 950 μ L de medio LB líquido sin antibiótico para evitar daño celular.

Las células se transfirieron a nuevo tubo de Eppendorf de 2 mL y se preincubaron durante 2 horas a 28 °C con agitación (200 rpm). Después se centrifugaron los tubos a 2270 rpm (500 g) por 5 minutos a temperatura ambiente, se retiró 900 μ L del sobrenadante y el pellet se resuspendió en 100 μ L de medio LB sin antibiótico. Por último, se sembró 100 μ L de suspensión celular en medio selectivo LB suplementado con 100 mg/L de antibiótico Ampicilina y 50 mg/L de Rifampicina para incubar durante 72 horas a 28 °C y obtener colonias electroporadas.

Colony PCR de Colonias de Agrobacterium Electroporadas

Para seleccionar las colonias de *A. tumefaciens* GV3101 que presentaban los plásmidos pSiM24-eGFP y pSiM24-GUS, se realizó una Colony PCR con las colonias obtenidas. En la preparación de la master mix se empleó un volumen total de total 25 μ L. Para obtener el DNA se realizó un leve raspado de la colonia seleccionada con una punta de micropipeta estéril, e inmediatamente se mezcló con el master mix mediante agitación (Molina, 2015). En la Tabla 4 se detalla las concentraciones y volúmenes de los reactivos empleados en la master mix.

Tabla 4

Master mix de la Colony PCR.

Reactivo	Ci	Cf	V final (μL)
Agua DPC			16,5
Buffer	10X	1X	2,5
MgCl ₂	50mM	1,5mM	0,75
dNTPs	10mM	0,2μM	0,5
Primer F	10μM	0,5μM	1,25
Primer R	10μM	0,5μM	1,25
Platinum Taq DNA Polimerasa	5U/μL	1,25 U	0,25
DNA plasmídico	-	-	1 colonia
TOTAL			25

Las colonias de *Agrobacterium tumefaciens* electroporado se usaron como DNA molde para la Colony PCR con los primers Forward: CACAAATCAGAAGGAAGAGA y Reverse: CCGATGATACGAACGAAG diseñados por Garzón (2019). Se amplificó la región de los genes GFP y GUS dentro del T-DNA de los plásmidos pSiM24-eGFP y pSiM24-GUS respectivamente con el programa descrito en la Tabla 5.

Tabla 5

Programa de la Colony PCR de los genes GUS y GFP de colonias de Agrobacterium electroporadas.

Etapa	Temperatura	Ciclos	Tiempo
Desnaturalización inicial	94 °C	1	10 min
Desnaturalización	92 °C		30 s
Annealing	55 °C	30	30 s
Extensión	72 °C		90 s
Extensión final	72 °C	1	10 min

Nota. Tomado de *Análisis funcional del gen candidato de avirulencia(SIX8) del hongo Fusarium oxysporum en Nicotiana benthamiana median el vector PGR106*, por Molina, 2015.

Verificación de Colonias de *Agrobacterium* Electroporadas Mediante Colony PCR

Para verificar la presencia de los plásmidos pSiM24-eGFP y pSiM24-GUS en *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 electroporado mediante Colony PCR, se corrieron geles de agarosa al 1% en una solución 1X de TAE (Tris base, ácido acético y EDTA) a 100 V y 300 mA por 45 minutos en cámaras de electroforesis horizontales de 100mL. Se empleó el marcador 1 Kb Plus DNA Leader (Invitrogen) de 15 Kb.

Selección de Colonias Electroporadas Mediante PCR Directa

Para seleccionar las colonias de *A. tumefaciens* GV3101 que presentaban los plásmidos pSiM24-eGFP y pSiM24-GUS, se realizó una PCR directa con los plásmidos extraídos de las colonias electroporadas mediante el método de Lisis Alcalina de Sambrook y Russell (2001). Para lo cual, previamente se inoculó una colonia del medio selectivo LB con Ampicilina (100 mg/L) en medio LB líquido con el mismo antibiótico y se incubó a 28 °C por 72 horas con agitación (110 rpm).

Se tomó 1.5 mL de medio saturado de bacterias *A. tumefaciens* y se centrifugó a 13000 RPM por 1 minuto. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 250µl de la solución de Lisis I fría (50mM glucosa, 25 mM Tris-Cl pH 8.0, 10mM EDTA pH 8.0). Se mezcló por vórtex para luego incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos. Se adicionó 250µl de la solución de Lisis II (0,2N NaOH, 1% (w/v SDS), se homogenizó por inversión y se incubó en hielo por 5 minutos. Luego se colocó 300µl de la solución de lisis III fría (5M de acetato de potasio, ácido glacial acético), se homogenizó por inversión y se incubaron en hielo los tubos durante 10 minutos.

Posteriormente, se centrifugaron los tubos por 10 minutos a 13000 RPM y se traspasó el sobrenadante a un nuevo tubo.

La purificación se realizó adicionando al sobrenadante el doble de volumen de etanol absoluto (100%) frío y dejando incubar por 20 minutos a -20°C . A continuación, se centrifugó a 14.000 rpm durante 30 minutos a 4°C . Finalmente, se descartó el sobrenadante y el pellet con el DNA plasmídico se resuspendió en 75 μL de agua DPC junto con 0,05 de RNasa para su almacenamiento a -20°C hasta su uso.

Una vez extraídos los plásmidos se emplearon como DNA molde en la PCR directa con los primers Forward: CACAAATCAGAAGGAAGAGA y Reverse: CCGATGATACGAACGAAG diseñados por Garzón (2019). Se amplificó la región de los genes GFP y GUS del T-DNA de los plásmidos pSiM24-eGFP y pSiM24-GUS respectivamente con el programa descrito en la Tabla 6.

Tabla 6

Programa de la PCR directa de los genes GUS y GFP de colonias de Agrobacterium electroporadas.

Etapas	Temperatura	Ciclos	Tiempo
Desnaturalización inicial	94 $^{\circ}\text{C}$	1	10 min
Desnaturalización	92 $^{\circ}\text{C}$		30 s
Annealing	55 $^{\circ}\text{C}$	30	30 s
Extensión	72 $^{\circ}\text{C}$		90 s
Extensión final	72 $^{\circ}\text{C}$	1	10 min

Nota. Tomado de *Análisis funcional del gen candidato de avirulencia(SIX8) del hongo Fusarium oxysporum en Nicotiana benthamiana median el vector PGR106*, por Molina, 2015.

En la preparación del master mix se utilizó 3 μ L de DNA plasmídico extraído. En cada reacción se empleó un volumen total 25 μ L. En la Tabla 7 se detalla las concentraciones (Ci y Cf) y volúmenes finales de los reactivos empleados (Agua DPC, Buffer, MgCl₂, dNTPs, Primer F, Primer R y Platinum Taq DNA Polimerasa) en la master mix de la PCR directa con los plásmidos pSiM24-eGFP y pSiM24-GUS.

Tabla 7

Master mix de la PCR directa.

Reactivo	Ci	Cf	V final (μL)
Agua DPC			13,5
Buffer	10X	1X	2,5
MgCl ₂	50mM	1,5mM	0,75
dNTPs	10mM	0,2 μ M	0,5
Primer F	10 μ M	0,5 μ M	1,25
Primer R	10 μ M	0,5 μ M	1,25
Platinum Taq DNA Polimerasa	5U/ μ L	1,25 U	0,25
DNA plasmídico	-	-	3,0
TOTAL			25

Por último, los fragmentos amplificados se visualizaron en geles de agarosa al 0.8% en una solución 1X de TAE (Tris base, ácido acético y EDTA) a 100 V y 300 mA por 45 minutos en cámaras de electroforesis horizontales de 100mL. Se empleó el marcador 1 Kb Plus DNA Leader (Invitrogen) de 15 Kb. Una vez confirmadas las colonias que presentaban los plásmidos se hicieron alícuotas, mezclando 1mL de glicerol al 15 % con 15 mL de bacterias crecidas en medio líquido LB con Ampicilina (100 mg/L), luego de transfirió a tubos de 2 mL para ser congelados con nitrógeno líquido y almacenar -80°C hasta su uso.

Ensayo de Transfección en Suspensión Celular de Tabaco

Se realizó un ensayo de transfección preliminar con dos tipos de suspensiones celulares: *N. tabacum* establecida a partir de los callos obtenidos previamente en este estudio y *N. tabacum* cv. BY-2 establecida a partir de callos del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la UFA-ESPE. Al realizar los ensayos se evidenció que las suspensiones celulares de *Nicotiana tabacum* establecidas previamente presentaron altos porcentajes de muerte celular, por lo que no se empleó esta línea celular para los ensayos de transfección.

En los ensayos de transfección se empleó la metodología propuesta por Mayo *et al.* (2006) con ciertas modificaciones para trabajar con la suspensión celular de *Nicotiana tabacum* cv. BY-2. Se empleó la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens*, desprovista de los oncogenes en el plásmido Ti y con el vector binario pSiM24-eGFP.

En este ensayo se empleó un arreglo factorial de 2x3 (Tabla 8) en un diseño completamente al azar (DCA). Se evaluó la concentración en milimolar (mM) de acetosiringona (10, 20 y 30 mM) en el medio de cocultivo y el tiempo de cocultivo (3 y 5 días) de las suspensiones celulares con *Agrobacterium tumefaciens* de OD_{600nm} igual a 0.6, para determinar los mejores parámetros de transfección en suspensiones celulares de tabaco con expresión del transgén GFP.

Tabla 8

Tratamientos del ensayo de transfección de la suspensión celular de tabaco con A. tumefaciens.

Tratamiento	Concentración de acetosiringona (mM)	Tiempo de co-cultivo con <i>Agrobacterium</i> (días)
T1	10	3
T2	10	5
T3	20	3
T4	20	5
T5	30	3
T6	30	5

Preparación de Suspensión Celular. Previo a los ensayos de transfección, las suspensiones celulares de *Nicotiana tabacum* cv. BY-2 se mantuvieron en alícuotas de 30 mL con medio líquido MS (Anexo 1) con 30 g/L de sacarosa y 1 mg/mL de 2,4-D en matraces Erlenmeyer de 50 mL en condiciones de oscuridad a 28 °C bajo agitación a 100 rpm (Kirchhoff, *et al.*, 2012). Las células en suspensión se subcultivaron en intervalos de 7 días transfiriendo un inóculo de 3 mL de suspensión en medio líquido fresco. En los ensayos de transfección se emplearon células de tabaco cultivadas durante 96 h a 28 °C en un agitador a 100 rpm para alcanzar su etapa de crecimiento exponencial. En cada ensayo de transfección se empleó 4 mL de suspensión celular y 4 mL como control (Mayo, *et al.*, 2006).

Preparación de la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens*. En el ensayo de transfección se utilizó la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens*, el cual alberga el vector binario pSiM24-eGFP. Este vector contiene los genes *nptII* y *bla* como marcadores seleccionables y el gen reportero GFP dentro de la región T-DNA (Sahoo, Dey, & Maiti, 2014). Se sembró por estriado *A. tumefaciens* en medio LB con

100 mg/L de Ampicilina y 50 mg/L de Rifampicina y se incubó a 28 °C durante 48 h para obtener colonias. Se seleccionó una colonia para inocular 3 mL de medio YM (Anexo 2) con los mismos antibióticos a las mismas concentraciones y se incubó el cultivo durante 72 h a 28 °C con agitación a 100 rpm hasta tener una OD₆₀₀ igual a 0.6. En el caso de cultivos concentrados se diluyó con 1 mL de medio YM con los antibióticos mencionados anteriormente y se lo dejó incubar por 1 hora. Se comprobó periódicamente la absorbancia hasta que el cultivo haya alcanzado la densidad óptima deseada.

Infección y Cocultivo. La infección de las células BY-2 se realizó añadiendo 4 µL de acetosiringona (10, 20 o 30 mM) en 4 mL de suspensión celular BY-2 de crecimiento exponencial (4 días), pipeteando repetidamente las células (aproximadamente 20 veces) con una micropipeta. La mezcla se transfirió a tubos Falcom de 15 mL, un tubo para cada infección y un tubo adicional para el control negativo. Se agregó 20 µL de *A. tumefaciens* LBA4404 con el plásmido pSiM24-eGFP a cada cultivo de células en los tubos Falcom, excepto en el control negativo que contenía solo células de *N. tabacum* cv. BY-2 sin infectar. Finalmente, los tubos se incubaron a 28 °C en oscuridad bajo agitación a 100 rpm durante 3 y 5 días como tiempo de cocultivo de las suspensiones celulares con *Agrobacterium*.

Selección de Células Infectadas. Una vez pasada los 3 y 5 días de cocultivo se realizaron 3 lavados a las células infectadas en cada tubo, adicionando medio líquido NTT (Anexo 3) hasta un volumen total de 15 mL. En cada lavado se invirtieron los tubos para mezclar el cultivo, se centrifugaron durante 10 minutos a 207g (5139 rpm) a 4° C, se desechó el sobrenadante y se volvió a resuspender el sedimento con medio NTT.

Después del tercer lavado, las células sedimentadas fueron resuspendidas en 8 mL de medio líquido NTT más 250 mg/L de cefatoxina.

En cámara de flujo laminar, se debe inocular 1 mL de la suspensión celular en cajas Petri con medio NTKK (Anexo 4) y girar las placas para distribuir las células uniformemente en el medio sólido. Las placas se dejan con la tapa entreabierta por 1 h a lado de un mechero encendido para permitir que el exceso de líquido se evapore. Por último, las placas se sellan con Parafilm y el cultivo se incuba a 28 °C en la oscuridad por 4 semanas, para permitir la formación de los callos infectados. A los 3 mL restantes de suspensión celular se adicionó 3 mL de medio líquido NTKK (Anexo 4) y se mantuvieron en los tubos Falcom a 28 °C en agitación a 100 rpm bajo oscuridad durante 7 días para evaluar la expresión del gen GFP.

Observación de Fluorescencia en Suspensión Celular de Tabaco Infectada.

Se examinó la expresión del gen reportero GFP para determinar si las suspensiones celulares de tabaco se transfectaron con *A. tumefaciens* con el plásmido pSiM24-eGFP. Se examinaron las células de tabaco infectadas 7 días después de la selección, usando el microscopio de fluorescencia invertido Olympus IX53 en placas de múltiples pocillos con 500 µL de células transfectadas. Se utilizó una longitud de onda de 488 nm para excitar la expresión del GFP en las células transfectadas de tabaco y una longitud de onda de emisión de 508 nm (Sahoo, Dey, & Maiti, 2014).

La variable de respuesta que se evaluó en el ensayo de transfección de suspensión celular de tabaco fue la expresión del gen reportero GFP en las células transfectadas, mediante observación en el microscopio de fluorescencia invertido. Se

asignó el valor “uno” cuando el tubo con la suspensión celular expresaba GFP y “cero” si no expresaba. El porcentaje de suspensiones celulares con expresión del transgén GFP se determinó modificando la fórmula propuesta por Bakhsh *et al.* (2014) en el cual se dividió el número de tubos Falcom con suspensión celular que expresaron GFP, por el número de tubos Falcom con suspensión celular infectada con *Agrobacterium* para finalmente multiplicarlo por 100.

El análisis estadístico se realizó en los programas estadísticos R e InfoStat mediante análisis exploratorio y diferencial a los 6 tratamientos de transfección en suspensiones celulares de tabaco obtenidos en el DCA (3x2). Se realizaron 4 repeticiones por tratamiento y se definió como unidad experimental un tubo Falcom con suspensión celular de tabaco transfectada.

Eficiencia de Transfección. La eficiencia de transfección se complementó con datos bibliográficos de estudios realizados por An (1985), Nocarova y Fischer (2009) en microcallos regenerados a partir de suspensiones celulares infectadas, en medio sólido de selección con Kanamicina. En este caso el porcentaje de eficiencia de transfección se calcula dividiendo el número de callos que expresan los genes GFP por el número de callos formados en el medio de selección multiplicado por 100 (Li, *et al.*, 2017).

Ensayo de Transfección de Callos de Tabaco

Una vez obtenidos los callos de tabaco a partir de explantes de hojas, estos se emplearon para realizar el ensayo preliminar de transfección con *Agrobacterium tumefaciens*. Para el ensayo se utilizó la metodología propuesta por Komari (1989) y López *et al.* (2015) con ciertas modificaciones, tomando en consideración los mejores

resultados de transfección con *A. tumefaciens* obtenidos en estos estudios. Se empleó la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* con el plásmido pSiM24-GUS y callos de tabaco de 2 meses de inducción.

En el ensayo de transfección de callos de tabaco se empleó un arreglo factorial de 2x2 (Tabla 9) con un diseño completamente al azar (DCA). Se evaluó el tiempo de inmersión de los callos (20 y 30 minutos) en una suspensión de *Agrobacterium tumefaciens* de OD_{600nm} igual a 0.8 y el tiempo de cocultivo (3 y 4 días) para determinar los mejores parámetros de transfección en callo de tabaco.

Tabla 9

Tratamientos de transfección de callos de tabaco con A. tumefaciens.

Tratamiento	Tiempo de inmersión (minutos)	Tiempo de cocultivo con <i>Agrobacterium</i> (días)
T1	20	3
T2	20	4
T3	30	3
T4	30	4

Preparación de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. La bacteria *A. tumefaciens* GV3101 con el plásmido pSiM24-GUS mantenida a -80 °C se sembró por estriado en medio LB sólido suplementado con 100 mg/L de Ampicilina, 50 mg/L de Rifampicina y 10 mg/L de Tetraciclina a 28 °C durante 48h. Después, se inoculó una colonia en 20 mL de medio LB líquido suplementado con los mismos antibióticos que el medio sólido y 100 µM (disuelta en etanol) para activar los genes de virulencia. Finalmente, la suspensión bacteriana se incubó a 28 °C bajo agitación a 110 rpm hasta obtener una OD₆₀₀ igual a 0.8.

Infección y Cocultivo de Callos. Los callos se sumergieron en cajas Petri con 20mL de suspensión de *A. tumefaciens* GV3101 con el plásmido pSiM24-GUS con una OD₆₀₀ igual a 0,8 con diferentes tiempos de inmersión (20 y 30 minutos). Luego se eliminó el exceso de bacteria colocando los callos infectados en papel filtro Whatman estéril (López, Proaño, Jadán, & Mihai, 2015). Los callos se pasaron a cajas Petri con medio LB sólido suplementado 2 mg/L de ANA, 0.2 mg/L de Kinetina y 100 µM de acetosirinigona. Se cultivaron durante 3 y 4 días como tiempo de cocultivo bajo 16h de luz y 8h de oscuridad a 20 °C.

Selección de Callos Transfectados. Pasado el tiempo de co-cultivo, los callos transfectados se lavaron 3 veces con una solución de 250 mg/L de Cefotaxima seguido de un lavado final en agua destilada sin cefotaxima y se secaron el papel filtro Whatman estéril. A continuación, los callos se transfirieron a medio de selección MS suplementado con 2 mg/L de ANA, 0.2 mg/L de Kinetina, 50 mg/L de Kanamicina y 250 mg/L de Cefotaxima y se incubaron a 20 °C bajo 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. En cada caja Petri se colocaron 4 callos transfectados por tratamiento.

Eficiencia de Transfección. La eficiencia de transfección de callos en este ensayo se determinó de manera bibliográfica en base a resultados obtenidos en estudios realizados empleando callos de tabaco y *Agrobacterium tumefaciens* como método de transfección. La eficiencia se calcula mediante ensayo histoquímico con X-Gluc (Jefferson, Kavanagh, & Bevan, 1987) para determinar el número de callos transfectados que expresan el gen GUS (β -D-Glucuronidasa) en presencia de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-glucurónico (X-Gluc) como sustrato. La eficiencia de transfección por *Agrobacterium* se estima mediante la expresión del gen GUS en los

callos transfectados de tabaco. El porcentaje de eficiencia de transfección se calcula dividiendo el número de callos que presenta expresión del gen GUS por el número de callos infectados con *Agrobacterium* multiplicado por 100 (Li, *et al.*, 2017).

La tinción histoquímica de la expresión de GUS con X-Gluc (Jefferson, Kavanagh, & Bevan, 1987) en callos transfectados de tabaco se realiza después del tiempo de co-cultivo y después de 4 semanas de subcultivo de los callos para estimar la tasa de expresión del gen GUS en los callos transfectados. Los callos se sumergen en el buffer de tinción (5 mg X-Gluc disuelto en 50 μ L de DMF, 50 mM NaPO₄, pH 7.0) y se incuban a 37 °C durante 72h (Jefferson, Kavanagh, & Bevan, 1987). Después de la tinción, los callos se limpian con etanol al 70% por 4 horas para remover la clorofila y limpiar el tejido. Finalmente, la presencia de tinción de tejido azul en los callos con la ayuda del estereomicroscopio confirma la incorporación del plásmido pSiM24-GUS en el tejido calloso (Paramesh, Fakrudin, & Kuruvishetti, 2010).

Capítulo 3: Resultados

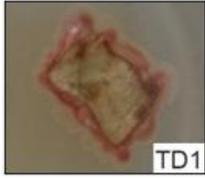
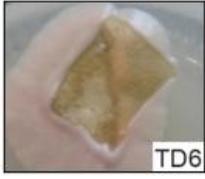
Ensayos de Desinfección e Inducción de Callos en Hojas de Tabaco

Establecimiento del Protocolo de Desinfección de Explantes de Hojas de Tabaco (Nicotiana tabacum)

Para establecer el protocolo de desinfección de hojas jóvenes de tabaco se evaluó la contaminación, el necrosamiento y la viabilidad de los explantes desinfectados. Se realizó ensayos con diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (NaClO) v/v (0.0%, 0.5%, 1.0%, 1.5% y 2.0%) y diferentes tiempos de inmersión del material vegetal (2 y 5 minutos). Los datos se registraron pasado los 30 días de introducción de los explantes en medio sólido de cultivo Murashige & Skoog (MS), como medio de establecimiento. En la figura 11, se puede observar los explantes de hojas de tabaco después de la aplicación de los diferentes tratamientos de desinfección con NaClO a diferentes tiempos de inmersión.

Figura 11

Explantes de hojas de tabaco con diferentes concentraciones de Hipoclorito de Sodio y tiempos de inmersión.

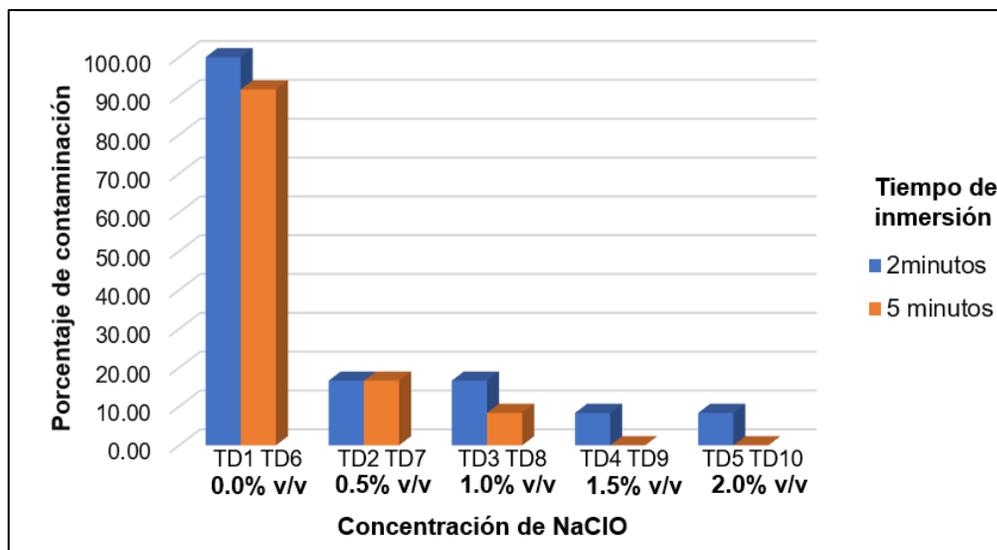
Concentración Hipoclorito de Sodio % v/v	Tiempo de Inmersión	
	2 minutos	5 minutos
0.0	 TD1	 TD6
0.5	 TD2	 TD7
1.0	 TD3	 TD8
1.5	 TD4	 TD9
2.0	 TD5	 TD10

Nota. Tratamientos de desinfección con Hipoclorito de Sodio. TD1: 0.0% NaClO, 2 min; TD2: 0.5% NaClO, 2 min; TD3: 1.0% NaClO, 2 min; TD4: 1.5% NaClO, 2 min; TD5: 2.0% NaClO, 2 min; TD6: 0.0% NaClO, 5 min; TD7: 0.5% NaClO, 5 min; TD8: 1.0% NaClO, 5 min; TD9: 1.5% NaClO, 5 min; TD10: 2.0% NaClO, 5 min.

Variable de Contaminación. Para evaluar la variable de contaminación se estableció un diseño completamente al azar (DCA). Con la finalidad de determinar el mejor tratamiento de desinfección con la menor tasa de contaminación, se analizó los factores de concentración de hipoclorito de sodio y tiempo de inmersión de los explantes. En la figura 12, se muestra los porcentajes de contaminación de los explantes de hojas de tabaco luego de la aplicación de los diferentes tratamientos de desinfección. En esta gráfica, se puede observar que el tratamiento TD9 y TD10 con una inmersión del material vegetal de 5 minutos al 1.5 % y 2.0 % de hipoclorito de sodio respectivamente, presentaron una desinfección efectiva de los explantes con un 0.0% de contaminación.

Figura 12

Porcentaje de explantes de hojas de tabaco contaminados respecto a la concentración de hipoclorito de sodio (NaClO).



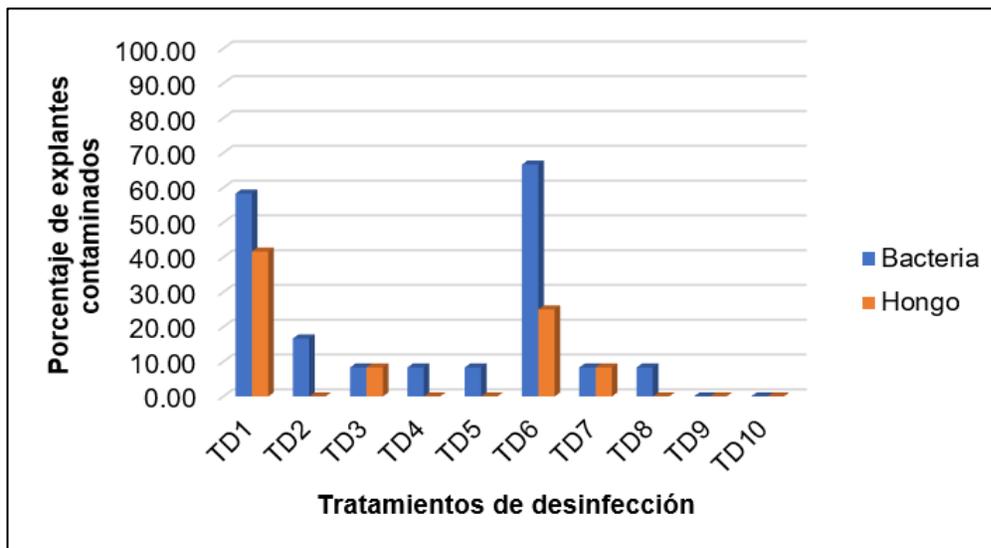
Nota. Tratamientos de desinfección. TD1: 0.0% NaClO, 2 min; TD2: 0.5% NaClO, 2 min; TD3: 1.0% NaClO, 2 min; TD4: 1.5% NaClO, 2 min; TD5: 2.0% NaClO, 2 min; TD6: 0.0% NaClO, 5 min; TD7: 0.5% NaClO, 5 min; TD8: 1.0% NaClO, 5 min; TD9: 1.5% NaClO, 5 min; TD10: 2.0% NaClO, 5 min. N=120, n=12.

Además, se puede observar que el porcentaje de contaminación se incrementa al disminuir la concentración de NaClO y el tiempo de inmersión del material vegetal. Estos resultados sugieren que el mejor tratamiento de desinfección consiste en la aplicación de hipoclorito de sodio al 1.5% (v/v) durante 5 minutos de inmersión. Los tratamientos TD1 y TD6 con 0.0 % de NaClO presentaron entre el 100% y 91.67% de contaminación en relación a los demás tratamientos.

Con el fin de seleccionar el mejor tratamiento con el menor número de explantes contaminados, se evaluó la presencia de hongos y/o bacteria que no fueron eliminados después de la aplicación de los diferentes tratamientos de desinfección. En la figura 13, se puede observar que los tratamientos TD9 y TD10 no presentaron contaminación por hongos, bacterias o ambos, a diferencia del resto de tratamientos. El tratamiento TD2 presentó mayor porcentaje de explantes contaminados por bacteria con un 16.67%, seguido de los tratamientos TD3, TD4, TD5, TD7 y TD8 que presentaron un 8.33%. En relación a la contaminación por hongos, se observó que los tratamientos TD3 y TD7 presentaron una contaminación del 8.33%.

Figura 13

Porcentaje de explantes contaminados respecto al tiempo de inmersión en diferentes concentraciones de NaClO.



Nota. Tratamientos de desinfección: TD1: 0.0% NaClO, 2 min; TD2: 0.5% NaClO, 2 min; TD3: 1.0% NaClO, 2 min; TD4: 1.5% NaClO, 2 min; TD5: 2.0% NaClO, 2 min; TD6: 0.0% NaClO, 5 min; TD7: 0.5% NaClO, 5 min; TD8: 1.0% NaClO, 5 min; TD9: 1.5% NaClO, 5 min; TD10: 2.0% NaClO, 5 min. N=120, n=12.

Al realizar el análisis de contingencia (Tabla 10) de los porcentajes de explantes contaminados, se puede observar que el porcentaje más bajo de contaminación (0,0%) se obtuvo con los tratamientos TD9 y TD10 en comparación con los tratamientos TD1 y TD6.

Tabla 10

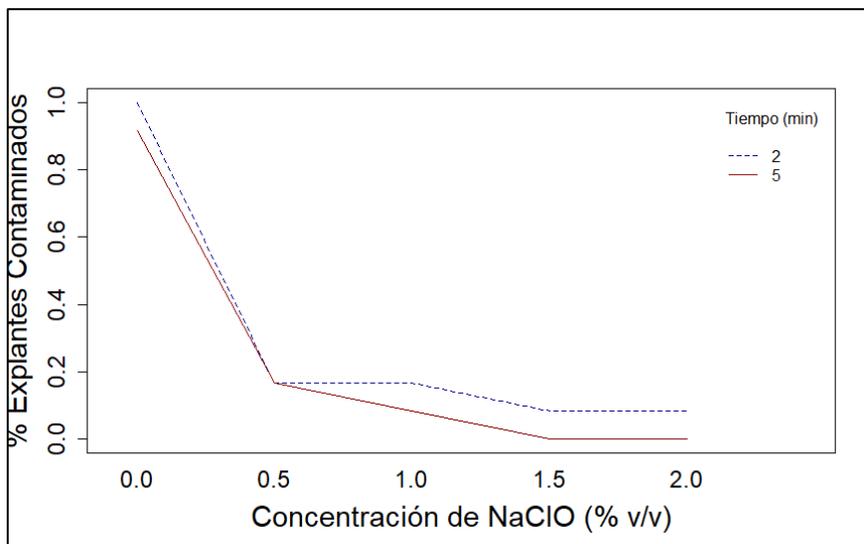
Tabla de contingencia del porcentaje de explantes contaminados respecto a los tratamientos de desinfección

		Concentración de hipoclorito de sodio				
		0.0% v/v	0.5% v/v	1.0% v/v	1.5% v/v	2.0% v/v
Tiempo de Inmersión	2 minutos	TD1 100%	TD2 16,67%	TD3 16,67%	TD4 8,33%	TD5 8,33%
	5 minutos	TD6 91,67%	TD7 16,67%	TD8 8,33%	TD9 0,00%	TD10 0,00%

Con el fin de observar si existe interacción entre concentración de NaClO y el tiempo de inmersión, se realizó una gráfica de interacción (Fig. 14). En la gráfica se puede observar que no existe interacción significativa entre la concentración de hipoclorito de sodio y el tiempo de inmersión, por lo cual, la única variable que influye en la contaminación es la concentración de hipoclorito de sodio. Mediante ANOVA (Anexo 5) se obtuvo un valor de p (>0.9803) mayor al nivel de significancia ($\alpha=0.05$), por lo cual se concluye que no existe interacción significativa entre la concentración de NaClO y el tiempo de inmersión del explante, confirmándose el resultado de la gráfica de interacción (Fig. 14)

Figura 14

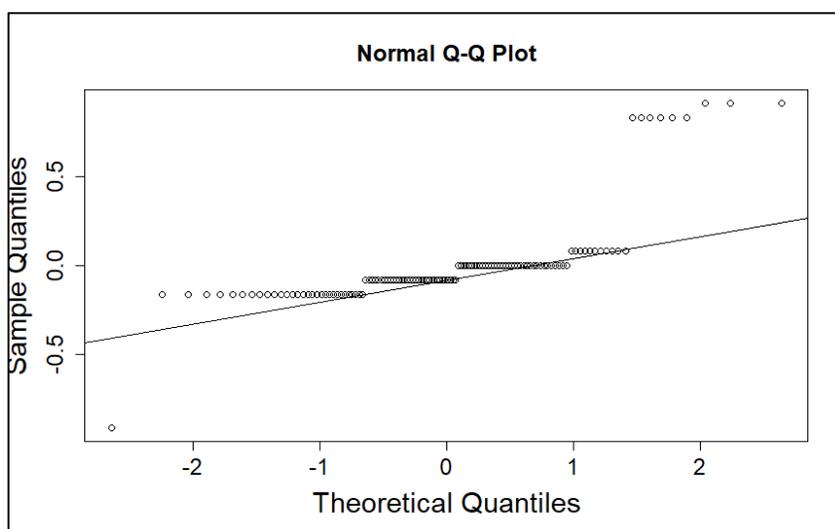
Gráfica de interacción para el porcentaje de explantes contaminados respecto a la concentración de hipoclorito de sodio (NaClO) y el tiempo de inmersión.



Se empleó análisis inferencial y la prueba de ANOVA (Anexo 5) para determinar si los datos dicotómicos de la variable contaminación sigue una distribución normal, y poder clasificar los datos como paramétricos o no paramétricos. Una vez obtenidos los residuos en el análisis de varianza se procedió realizar la gráfica de distribución de normalidad Q-Q plot, como se observar en la figura 15.

Figura 15

Gráfica de normalidad con los residuos de la variable contaminación en hojas de tabaco (Nicotiana tabacum).



En la figura 15 se observa que la variable contaminación no siguen una distribución normal por lo cual, se estableció que los datos dicotómicos de la variable no son paramétricos. Se aplicó la prueba de normalidad Shapiro-Wilks modificado (Tabla 11) y con un valor p (<0.0001) menor al nivel de significancia ($\alpha=0.05$) se rechazó la hipótesis nula de normalidad de los datos dicotómicos de la variable contaminación.

Tabla 11

Prueba de Shapiro-Wilks modificado con los residuos del ANOVA de la variable contaminación.

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO Contaminacion	120	0.00	0.27	0.62	<0.0001

Una vez que se estableció que los datos de la variable contaminación son no paramétricos, se empleó la prueba no paramétrica Kruskal Wallis (Anexo 6) para ver si existe igualdad en las medias. Con un valor p (<0.001) menor al nivel de significancia ($\alpha=0.05$) se rechazó la hipótesis de igualdad en las medias de los tratamientos, concluyendo que existe diferencia significativa entre los tratamientos de desinfección.

En la prueba de Kruskal Wallis (Anexo 6) se obtuvo la menor media (0,0) en porcentaje de explantes contaminados y desviación estándar (0,0) en los tratamientos TD9 (1,5% v/v de hipoclorito de sodio y 5 minutos de inmersión) y TD10 (2,0% v/v de hipoclorito de sodio y 5 minutos de inmersión). Empleando análisis de rango se observó que los tratamientos TD9 y TD10 del grupo A, poseen los menores valores del rango (44.5), por lo cual son los mejores tratamientos para la desinfección de explantes hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) en comparación con el resto de tratamientos probados.

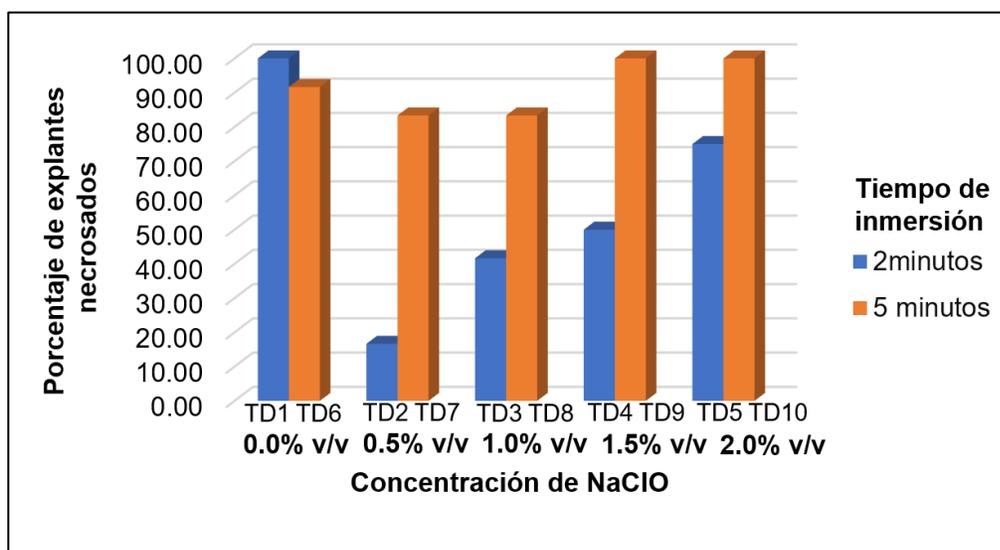
Variable de Necrosamiento y Viabilidad. Una vez que se sometieron los explantes de hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) a los distintos tratamientos de desinfección con diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio y tiempos de inmersión, se observó necrosamiento en el tejido del explante desinfectado. Por lo cual, estos ensayos sirvieron para determinar el mejor tratamiento de desinfección con un bajo porcentaje de explantes necrosados, una vez transcurrida las 4 semanas de siembra.

En la figura 16 se observa los porcentajes de explantes necrosados después de aplicarse los tratamientos de desinfección. En esta gráfica se puede observar que el tratamiento TD2 con 2 minutos de inmersión de los explantes en hipoclorito de sodio al

0.5% v/v, presenta el menor porcentaje de explantes necrosados con un 16,67%. En cambio, los tratamientos TD9 y TD10 presentaron un 100% de explantes necrosados. Este porcentaje fue similar para los tratamientos control TD1 y TD6 con 100 y 91.67%, respectivamente.

Figura 16

Porcentaje de explantes de hojas de tabaco necrosados con los tratamientos de desinfección.



Nota. Tratamientos de desinfección: TD1: 0.0% NaClO, 2 min; TD2: 0.5% NaClO, 2 min; TD3: 1.0% NaClO, 2 min; TD4: 1.5% NaClO, 2 min; TD5: 2.0% NaClO, 2 min; TD6: 0.0% NaClO, 5 min; TD7: 0.5% NaClO, 5 min; TD8: 1.0% NaClO, 5 min; TD9: 1.5% NaClO, 5 min; TD10: 2.0% NaClO, 5 min. N=120, n=12.

Se puede observar en la figura 16 que al incrementarse la concentración de hipoclorito de sodio y el tiempo de inmersión, se incrementa el porcentaje de explantes necrosados. Estos resultados sugieren que el mejor tratamiento de desinfección para

obtener menor porcentaje de explantes necrosados consiste en la aplicación de 0.5% v/v de NaClO durante 2 minutos de inmersión.

Mediante el análisis de contingencia (Tabla 12) de los porcentajes de explantes necrosados después de aplicarse los diferentes tratamientos de desinfección, se puede observar que el porcentaje más bajo de explantes necrosados se obtuvo con el tratamiento TD2 en comparación con el resto de tratamientos

Tabla 12

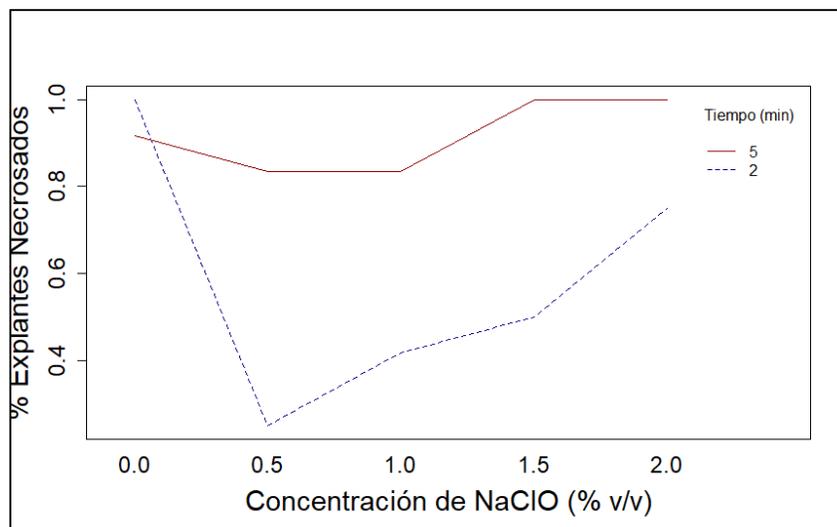
Tabla de contingencia del porcentaje de explantes necrosados respecto a los tratamientos de desinfección

		Concentración de hipoclorito de sodio				
		0.0% v/v	0.5% v/v	1.0% v/v	1.5% v/v	2.0% v/v
Tiempo de Inmersión	2 minutos	TD1 100%	TD2 16,67%	TD3 33,33%	TD4 41,67%	TD5 75%
	5 minutos	TD6 91,67%	TD7 83,33%	TD8 83,33%	TD9 100%	TD10 100%

Para determinar si existe interacción entre la concentración de hipoclorito de sodio y el tiempo de inmersión, se realizó una gráfica de interacción (Fig. 17). En esta gráfica se puede observar que las rectas no son paralelas, lo cual indica que existe una interacción entre la concentración de hipoclorito de sodio y el tiempo de inmersión. Se obtiene menor porcentaje de explantes necrosados a menor concentración (v/v) de NaClO y menor tiempo de inmersión. Empleando ANOVA (Anexo 7) se obtuvo un valor de p (<0.0061) menor al nivel de significancia ($\alpha=0.05$), con lo cual se concluye que existe una interacción significativa entre la concentración de NaClO y el tiempo de inmersión del explante, confirmándose el resultado de la gráfica de interacción (Fig. 17).

Figura 17

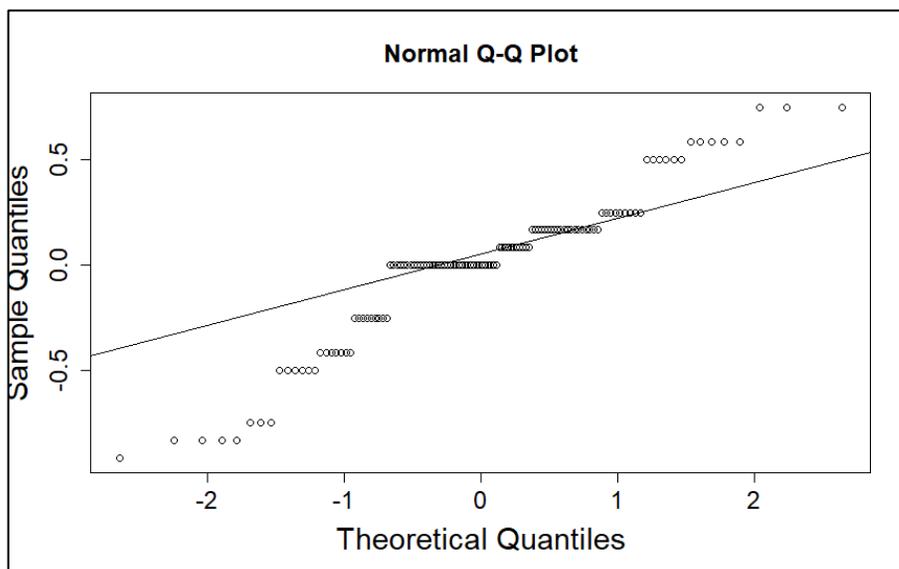
Gráfica de interacción para el porcentaje de explantes necrosados respecto a las concentraciones de hipoclorito de sodio (NaClO) y el tiempo de inmersión.



Analizando los residuos del ANOVA (Anexo 7), se graficó la distribución de los datos de la variable necrosamiento para ver si se trataban de datos paramétricos o no paramétricos. Como se observa en la figura 18 los datos no siguen una distribución normal, por lo cual no cumplen el supuesto de normalidad y, por ende, los datos dicotómicos de la variable necrosamiento no son paramétricos.

Figura 18

Gráfica de normalidad con los residuos de la variable necrosamiento en hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum*).



Para corroborar el resultado obtenido de la figura 18, se aplicó la prueba de Shapiro-Wilks modificado (Tabla 13) a los residuos obtenidos en el ANOVA (Anexo 7). Se obtuvo un valor p (<0.0001) menor al nivel de significancia ($\alpha=0.05$), por lo cual se rechazó la hipótesis nula de normalidad de los datos dicotómicos para la variable necrosamiento y se afirmó que los datos son no paramétricos.

Tabla 13

Prueba de Shapiro-Wilks modificado con los residuos del ANOVA de la variable necrosamiento.

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO Necrosamiento	120	0.00	0.34	0.91	<0.0001

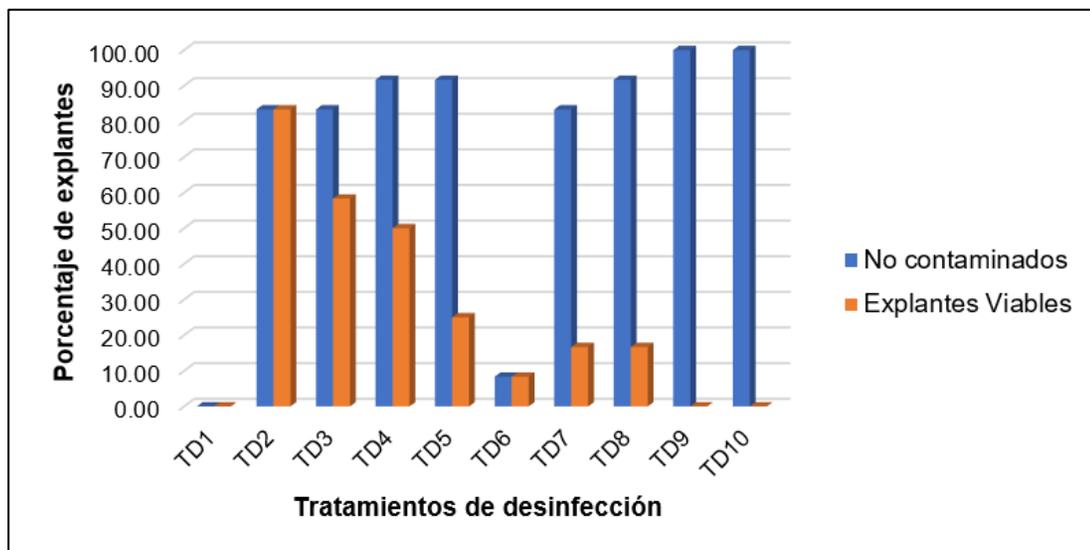
Se aplicó el análisis inferencial, una vez que se estableció que los datos de la variable necrosamiento son no paramétricos. Se empleó la prueba no paramétrica Kruskal Wallis (Anexo 8) para ver si existe igualdad en las medias y con un valor p (<0.001) menor al nivel de significancia ($\alpha=0.05$) se rechazó la hipótesis de igualdad en las medias de los tratamientos.

En la prueba de Kruskal Wallis (Anexo 8) se obtuvo la menor media (0.17) en porcentaje de explantes necrosados con el tratamiento TD2 (0,5% v/v de hipoclorito de Sodio y 2 minutos de inmersión). Mediante análisis de rango se observó que el tratamiento TD2 del grupo A, posee el menor valor del rango (26), por lo cual, es el mejor tratamiento para obtener menor porcentaje de explantes hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) necrosados después de la desinfección con NaClO en comparación con el resto de tratamientos probados.

Luego de analizar las variables contaminación y necrosamiento de los explantes de hoja de tabaco, se determinó el mejor tratamiento con menor porcentaje de explantes contaminados y mayor porcentaje de tejido viable sin necrosamiento para continuar con la etapa de callogénesis. En la figura 19 se observa que la desinfección con el tratamiento TD2, el cual consiste en aplicar 0,5% v/v de hipoclorito de Sodio y 2 minutos de inmersión a los explantes de hoja de tabaco (*Nicotiana tabacum*), permite obtener el mayor porcentaje de tejido viable y sin contaminación en un 83,33% en comparación con el resto de tratamientos.

Figura 19

Porcentaje de explantes viables y no contaminados de cada uno de los tratamientos de desinfección.



Nota. Tratamientos de desinfección: TD1: 0.0% NaClO, 2 min; TD2: 0.5% NaClO, 2 min; TD3: 1.0% NaClO, 2 min; TD4: 1.5% NaClO, 2 min; TD5: 2.0% NaClO, 2 min; TD6: 0.0% NaClO, 5 min; TD7: 0.5% NaClO, 5 min; TD8: 1.0% NaClO, 5 min; TD9: 1.5% NaClO, 5 min; TD10: 2.0% NaClO, 5 min. N=120, n=12.

Inducción de Callos en Explantes de Hojas de Tabaco (*Nicotiana tabacum*)

En la etapa de inducción de callo se evaluó la formación de callo en explantes de hojas de tabaco (*N. tabacum*). Se realizó un ensayo con diferentes concentraciones de ácido naftalenacético (ANA) combinadas con Kinetina (KIN). Los datos se registraron pasado los 30 días de introducción de los explantes en medio de sólido MS suplementado con las hormonas mencionadas. En la figura 20 se puede observar los callos formados en los explantes de hojas de tabaco (*N. tabacum*).

Figura 20

Tratamientos de callogénesis en explantes de hojas de tabaco.

Concentración ANA	Kinetina 0,2 mg/L
0 mg/L	
1 mg/L	
2 mg/L	
3 mg/L	

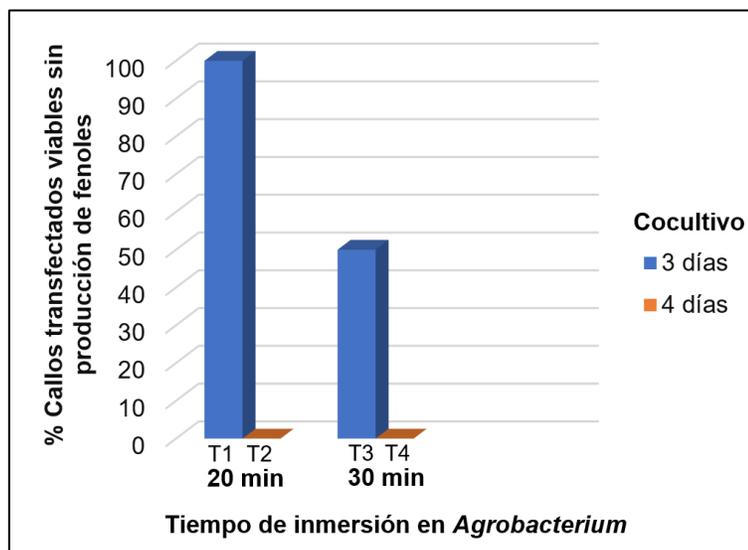
Nota. Tratamientos de callogénesis con ácido naftalenacético (ANA) en concentraciones de 0 mg/L a 3 mg/L combinado con 0,2 mg/L de Kinetina (KIN). T1: 0 mg/L ANA; 0.2 mg/L KIN, T2: 1 mg/L ANA; 0.2 mg/L KIN, T3: 2 mg/L ANA; 0.2 mg/L KIN, T4: 3 mg/L ANA; 0.2 mg/L KIN.

Para evaluar la variable de formación de callo se estableció un diseño completamente al azar (DCA). Con la finalidad de encontrar el mejor tratamiento de inducción de callo

en explantes de hojas de tabaco, se analizó los factores concentración de ANA (0 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L y 3 mg/L) combinado con Kinetina (0.2 mg/L). En la figura 21, se muestra los porcentajes de callos formados en explantes de hojas de tabaco.

Figura 21

Porcentaje de callos formados en explantes de hojas de tabaco.



Nota. Tratamientos de callogénesis en explantes de hojas de tabaco. T1: 0 mg/L ANA; 0.2 mg/L KIN, T2: 1 mg/L ANA; 0.2 mg/L KIN, T3: 2 mg/L ANA; 0.2 mg/L KIN, T4: 3 mg/L ANA; 0.2 mg/L KIN.

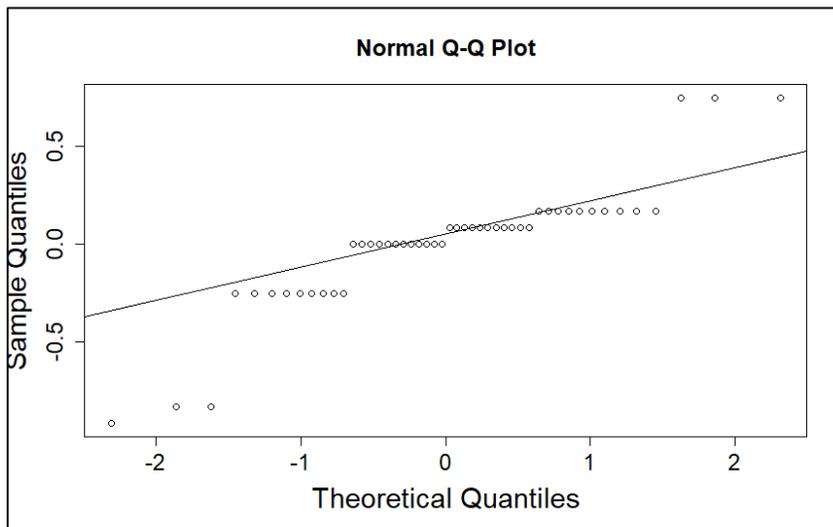
En esta gráfica se puede observar que todos los tratamientos generaron callos no embriogénicos a excepción del tratamiento T1. El tratamiento T3 con 2 mg/L de ANA combinado con 0,2 mg/L presentó mayor porcentaje de callos formados con un 91,67%. Además, se observó la presencia de callos tipo friable en los tratamientos T2 y T3 (Fig. 20, T2 y T3) y callos tipo compacto en el tratamiento T4 (Fig. 20, T4). Estos resultados sugieren que el mejor tratamiento para inducir la formación de callos en explantes de

hojas de tabaco consiste en la aplicación de 2 mg/L de ANA combinado con 0,2 mg/L de Kinetina en medio sólido MS.

Los residuos obtenidos del ANOVA (Anexo 9), se emplearon para graficar la distribución de normalidad de la variable formación de callo para ver si se trata de datos paramétricos o no paramétricos. En la figura 22 se observa que los datos no siguen una distribución normal, por lo cual no cumple con el supuesto de normalidad y por ende los datos dicotómicos de la variable formación de callo son no paramétricos.

Figura 22

Gráfica Q-Qplot con los residuos de la variable formación de callo en hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum*).



Para comprobar el supuesto de normalidad obtenido en la figura 22, se empleó los residuos de la variable formación de callo para aplicar la prueba de normalidad Shapiro-Wilks modificado (Tabla 14), en donde se obtuvo un valor de p ($<0,001$) menor

al nivel de significancia ($\alpha=0.05$), con lo cual se rechazó la hipótesis de normalidad y se afirma que los datos son no paramétricos.

Tabla 14

Prueba de Shapiro-Wilks modificado con los residuos del ANOVA de la variable formación de callo.

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO Presencia de Callo	48	0.00	0.32	0.84	<0.0001

Mediante análisis inferencial, se empleó la prueba no paramétrica Kruskal Wallis (Anexo 10) para ver si existe igualdad en las medias. Con un valor p (<0.001) menor al nivel de significancia ($\alpha=0.05$) se rechazó la hipótesis de igualdad en las medias de los tratamientos. De acuerdo con el análisis de rangos de medias se obtuvo como mejores tratamientos para inducir la formación de callo los tratamientos TD2 (1mg/L de ANA y 0.2 mg/L de Kinetina) y TD3 (2mg/L de ANA y 0.2 mg/L de Kinetina), con medias porcentuales de 0.83 y 0.92, respectivamente. A pesar de que ambos tratamientos se encuentran agrupados en el grupo B y no presenten una diferencia significativa en sus medias, los dos tratamientos presentan las mayores medias de explantes con presencia de callo en comparación con el resto de tratamientos. Sin embargo, el tratamiento TD3 presentó mayor media porcentual de formación callo, por lo cual se lo eligió como mejor tratamiento de inducción de callo para los ensayos de transfección con *A. tumefaciens*.

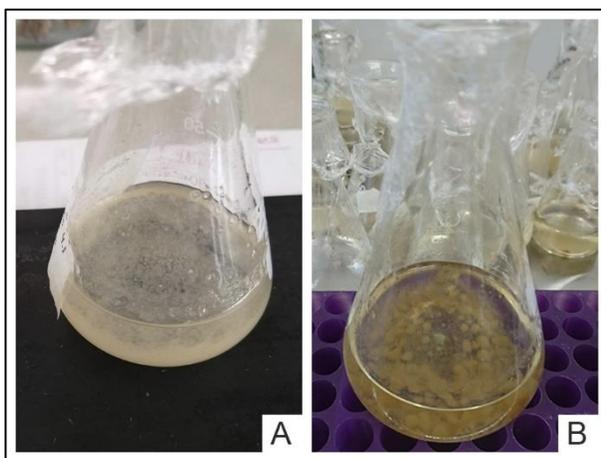
Establecimiento de Suspensiones Celulares de Tabaco (Nicotiana tabacum)

Las suspensiones celulares de tabaco se establecieron a partir de callos friables de tabaco después de dos meses de agitación a 28 °C bajo agitación a 110 rpm. En la

figura 23, se puede observar las suspensiones celulares de *N. tabacum* (Fig. 23A) en medio MS líquido con 2 mg/L de ANA y 0.2 mg/L de Kinetina y *N. tabacum* BY-2 en medio MS con 1mg/L de 2,4-D (Fig. 23B).

Figura 23

Establecimiento de suspensiones celulares de tabaco. A. Suspensión celular de N. tabacum. B. Suspensión celular de N. tabacum cv. BY-2



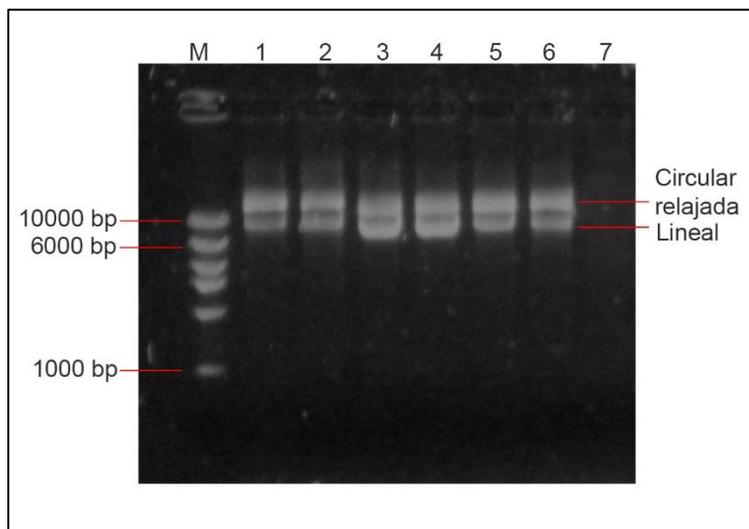
Ensayos de Transfección Genética

Extracción de los Plásmidos pSiM24-eGFP y pSiM24-GUS de E. coli

La extracción de los plásmidos pSiM24-eGFP y pSiM24-GUS de *E. coli* se realizó empleando el protocolo del kit PureLink® Quick Plasmid Miniprep de la casa comercial Thermofisher. En geles de agarosa al 0.8% se visualizaron bandas de ~8000 bp (Fig. 24) pertenecientes al tamaño de los plásmidos pSiM24-eGFP y pSiM24-GUS extraídos. Además, se observó las 2 conformaciones del DNA plasmídico de pSiM24 tanto la forma circular como la forma lineal (Fig. 24).

Figura 24

Electroforesis de los plásmidos extraídos pSiM24-GUS y pSiM24-eGFP de E. coli con el kit PureLink® Quick Plasmid Miniprep.



Nota. Carriles en el gel de agarosa. M: Marcador molecular High DNA Mass Ladder. Carriles 1, 2 y 3: Plásmido pSiM24-GUS. Carriles 4, 5 y 6: pSiM24-eGFP. Carril 7: Control negativo.

Los plásmidos extraídos se cuantificaron en el equipo Nanodrop para conocer su concentración y pureza. Se obtuvo un DNA plasmídico de buena calidad con concentraciones entre 1623.2 y 3087.8 ng/μL y una pureza promedio de 2.02 (Tabla 15). Estos resultados revelan que el protocolo de extracción fue eficiente y que el DNA fue óptimo para su uso en la electroporación en *A. tumefaciens* GV3101.

Tabla 15

Concentraciones y absorbancias de DNA plasmídicos pSiM24-GUS y pSiM24-eGFP extraídos de E. coli.

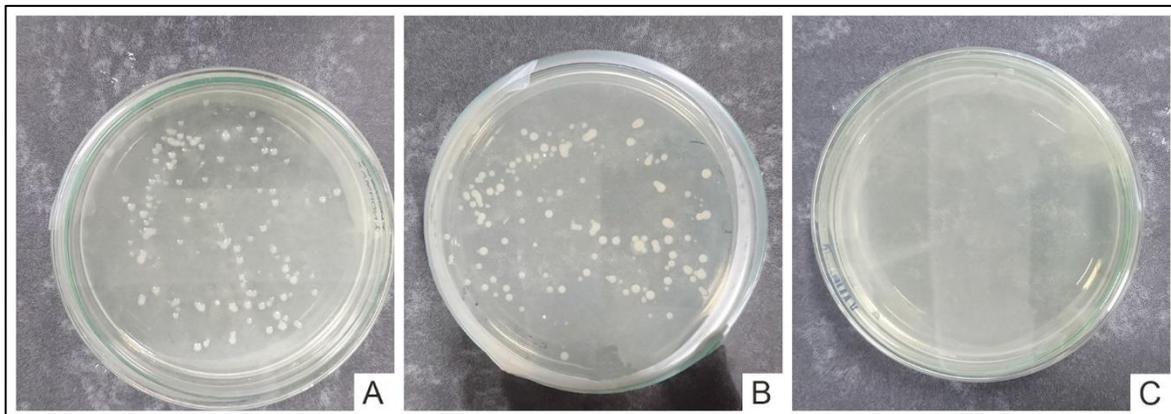
Plásmido	Concentración ng/ μ L	Absorbancia 260/280	Absorbancia 260/230
PSiM24-GUS 1	3087.8	2.002	2,165
PSiM24-GUS 2	2019.7	2.025	1.921
PSiM24-GUS 3	2873.1	2.036	2.043
PSiM24-eGFP 1	2406.1	2.031	2.047
PSiM24-eGFP 2	1623.2	2.040	2.265
PSiM24-eGFP 3	2238.6	2.022	1.920

Inserción del Plásmido pSiM24 en A. tumefaciens Mediante Electroporación

La inserción de los plásmidos pSiM24-eGFP y pSiM24-GUS en *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 se realizó mediante electroporación. Las colonias electroporadas se seleccionaron en medio de selección LB suplementado con 100 mg/L de Ampicilina, 50 mg/L de Rifampicina y 10 mg/L de Tetraciclina. En la figura 25 se muestra el crecimiento de colonias electroporadas después de 72h de cultivo a 28 °C. En esta figura se observan colonias de *A. tumefaciens* GV3101 con el plásmido pSiM24-eGFP (Fig. 25A) y colonias de *A. tumefaciens* GV3101 con el plásmido pSiM24-GUS (Fig. 25B), a diferencia de las bacterias no electroporadas (Fig. 25C).

Figura 25

Colonias de *A. tumefaciens* GV3101 electroporado con plásmidos pSiM24-eGFP y pSiM24-GUS en medio LB con 100 mg/L de Ampicilina.



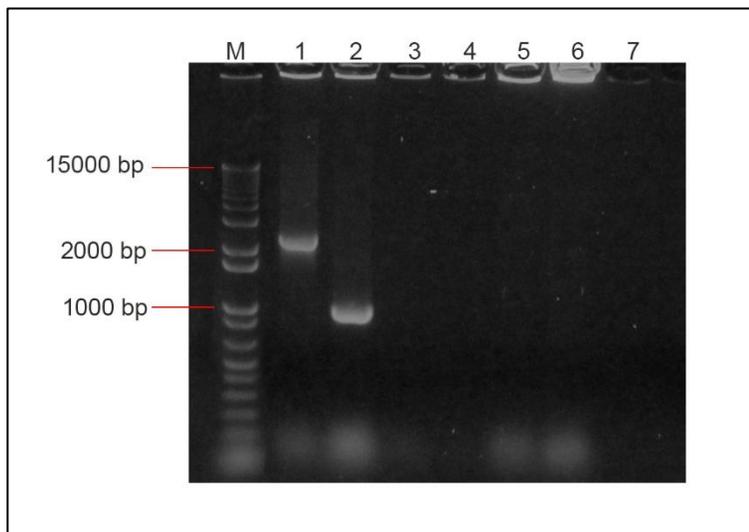
Nota. Colonias de *A. tumefaciens* GV310. A) *A. tumefaciens* GV3101 con pSiM24-eGFP; B) *A. tumefaciens* GV3101 con pSiM24-GUS; C) *A. tumefaciens* GV3101 no electroporado.

Una vez obtenidas las colonias electroporadas de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, se realizó una Colony PCR para confirmar la incorporación de los plásmidos pSiM24-eGFP y pSiM24-GUS en la bacteria. Se emplearon los primers forward y reverse diseñados por Garzón (2019) para amplificar los genes GFP y GUS dentro del T-DNA de los plásmidos pSiM24-eGFP y pSiM24-GUS.

En la figura 26, se puede observar la amplificación de los controles positivos con bandas de 2100 bp para el gen GUS (Fig. 26, carril 1) y 780 bp para el gen GFP (Fig. 26, carril 2), lamentablemente no se pudo observar la amplificación de los genes GUS y GFP en las colonias *A. tumefaciens* GV3101 electroporadas, posiblemente por una baja tasa de replicación del plásmido dentro de la bacteria.

Figura 26

Amplificación por Colony PCR de los genes GUS y GFP en colonias de A. tumefaciens GV3101 electroporadas con los plásmidos pSiM24-GUS y pSiM24-eGFP.



Nota. Marcador 1Kb plus. Carril 1: Control positivo GUS (*E. coli* con plásmido pSiM24-GUS). Carril 2: Control positivo GFP (*E. coli* con plásmido pSiM24-eGFP). Carriles 3 y 4: *A. tumefaciens* GV3101 con el plásmido pSiM24-GUS. Carriles 5 y 6: *A. tumefaciens* GV3101 con el plásmido pSiM24-eGFP. Carril 7: Control negativo.

Luego de confirmar mediante Colony PCR la ausencia de los plásmidos pSiM24-eGFP y pSiM24-GUS en las colonias de *A. tumefaciens* GV3101 electroporadas, se cultivaron las colonias en medio LB líquido con 100 mg/L de Ampicilina para extraer los plásmidos mediante el método de lisis alcalina. Los plásmidos extraídos se cuantificaron en el equipo Nanodrop para conocer su concentración y pureza. Se obtuvo DNA plasmídico de buena calidad con una concentración promedio de 2219.48 ng/μL y una pureza promedio de 1.97 (Tabla 16). Estos resultados revelan que el protocolo de

extracción fue eficiente y que el DNA fue óptimo para su uso en la PCR directa con los mismos primers empleados en la Colony PCR para amplificar los genes GFP y GUS.

Tabla 16

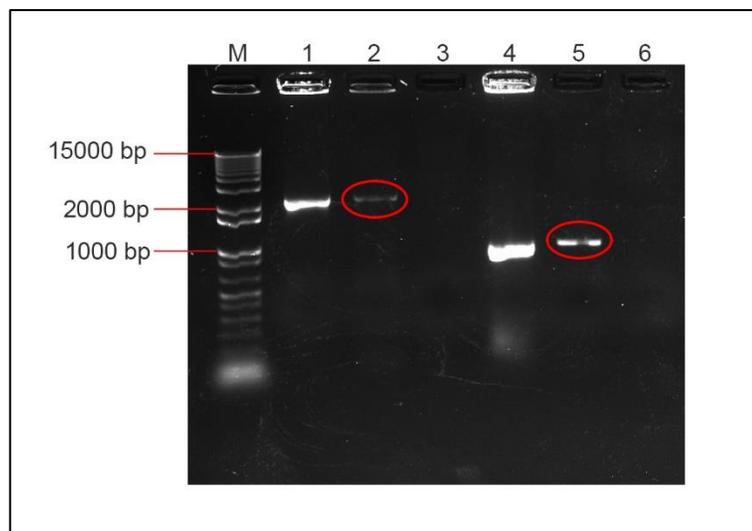
Concentraciones y absorbancias de DNA plasmídicos pSiM24-GUS y pSiM24-eGFP extraídos de A.tumefaciens GV3101 electroporado.

Plásmido	Concentración ng/ μL	Absorbancia 260/280	Absorbancia 260/230
PSiM24-GUS 1	2058.1	2.025	1.921
PSiM24-GUS 2	2547.3	2.025	1.921
PSiM24-GUS 3	2345.2	1.941	2,194
PSiM24-eGFP 1	1990.8	1.967	2,097
PSiM24-eGFP 2	2526.9	1.993	2,138
PSiM24-eGFP 3	1848.6	1.959	1,947

En la figura 27, se observa la amplificación de los productos obtenidos por PCR directa a partir de los plásmidos pSiM24-GUS y pSiM24-eGFP extraídos de *A. tumefaciens* GV310 electroporado. Al comparar los plásmidos extraídos de *A. tumefaciens* GV310 electroporado con los plásmidos extraídos de *E. coli*, se observan bandas similares de 2100 bp para el gen GUS (Fig. 27, carril 1 y 2) y 780 bp para el gen GFP (Fig. 27, carril 4 y 5). Con este resultado se confirmó la inserción de los plásmidos en *A. tumefaciens* GV310 mediante electroporación.

Figura 27

Amplificación mediante PCR directa de los genes GUS y GFP en DNA plasmídicos pSiM24-GUS y pSiM24-eGFP extraídos de A. tumefaciens GV3101 electroporado.



Nota. Carriles en el gel de agarosa. M: Marcador 1Kb plus. Carril 1: Control positivo GUS (pSiM24-GUS extraído de *E. coli*). Carril 2: Gen GUS de pSiM24-GUS extraído de *A. tumefaciens* GV3101. Carriles 3 y 6: Controles negativo (*A. tumefaciens* GV3101 no electroporados). 4: Control positivo GFP (pSiM24-eGFP extraído de *E. coli*). Carril 5: Gen GFP de pSiM24-GFP extraído de *A. tumefaciens* GV3101.

Transfección de Suspensiones Celulares de Tabaco

En la transfección de suspensiones celulares tabaco se evaluó la expresión del gen reportero GFP y la eficiencia de transfección en células de *N. tabacum* BY-2 mediante *A. tumefaciens* LBA4404 con el plásmido pSiM24-eGFP. Se realizó ensayos preliminares con diferentes concentraciones de Acetosiringona (10, 20 y 30 mM) adicionadas al medio de cocultivo y diferentes tiempos de cocultivo (3 y 5 días) para

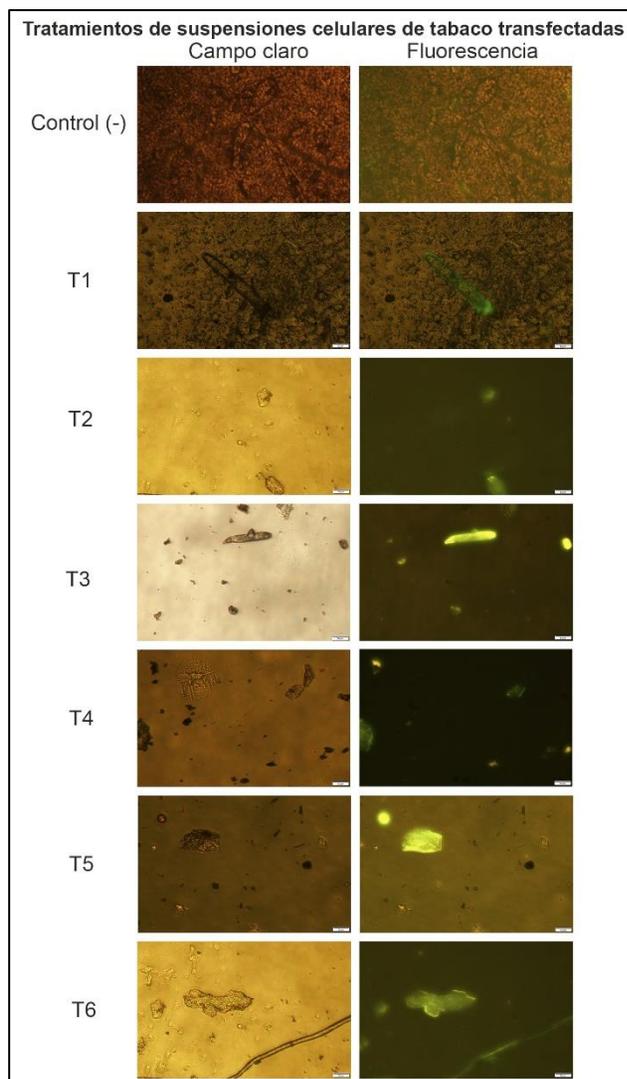
determinar los parámetros necesarios para transfectar y expresar el gen reportero GFP en las células de tabaco.

Para evaluar la expresión del gen GFP se estableció un diseño completamente al azar con un total de 6 tratamientos T1: 10 mM de Acetosiringona y 3 días de cocultivo; T2: 10 mM de Acetosiringona y 5 días de co-cultivo; T3: 20 mM de Acetosiringona y 3 días de co-cultivo; T4: 20 mM de Acetosiringona y 5 días de co-cultivo; T5: 30 mM de Acetosiringona y 3 días de co-cultivo; T6: 30 mM de Acetosiringona y 5 días de co-cultivo.

Con el fin de determinar el mejor tratamiento que permita la expresión del transgén GFP en las células de tabaco, se analizó los factores concentración de Acetosiringona en el medio de co-cultivo para activar los genes de virulencia en *A. tumefaciens* y el tiempo de cocultivo de las suspensiones celulares con la bacteria. En la figura 28, se puede observar la expresión del gen GFP mediante fluorescencia verde en todos los tratamientos de este ensayo, a excepción de la suspensión celular no transfectada. Además, se observa las diferentes formas que presentan las células de tabaco en suspensión.

Figura 28

Fluorescencia GFP en suspensiones celulares de tabaco (Nicotiana tabacum BY-2) transfectadas con A. tumefaciens LBA4404 con pSiM24-eGFP.

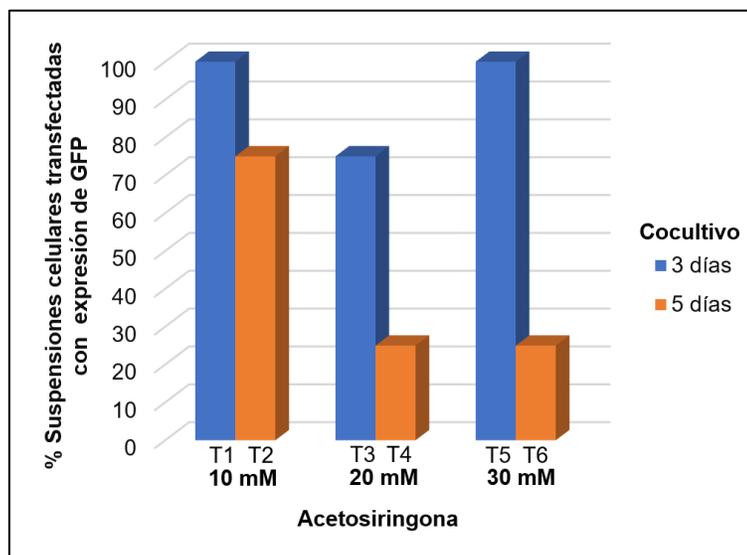


Nota. Tratamientos de transfección. T1: 10 mM Acetosiringona y 3 días de co-cultivo. T2: 10 mM Acetosiringona y 5 días de co-cultivo. T3: 20 mM Acetosiringona y 3 días de co-cultivo. T4: 20 mM Acetosiringona y 5 días de co-cultivo. T5: 30 mM Acetosiringona y 3 días de co-cultivo. T6: 30 mM Acetosiringona y 5 días de co-cultivo

La expresión del gen GFP se evaluó en las suspensiones celulares de tabaco 7 días después del tiempo de cocultivo. La fluorescencia se observó con el microscopio de fluorescencia invertido Olympus IX53 a una longitud de onda de 488 nm de excitación y 508 nm de emisión para la expresión del GFP. En la figura 29, se muestra los porcentajes de suspensiones celulares de tabaco con expresión del gen GFP. En esta gráfica, se puede observar que los tratamientos T1 y T5 con una concentración de 10 mM de Acetosiringona y 3 días de co-cultivo para cada tratamiento permite tener un 100 % de suspensiones celulares de tabaco con expresión de gen GFP.

Figura 29

Porcentaje de suspensiones celulares transfectadas con expresión del gen GFP con respecto a la concentración de Acetosiringona y el tiempo de co-cultivo.



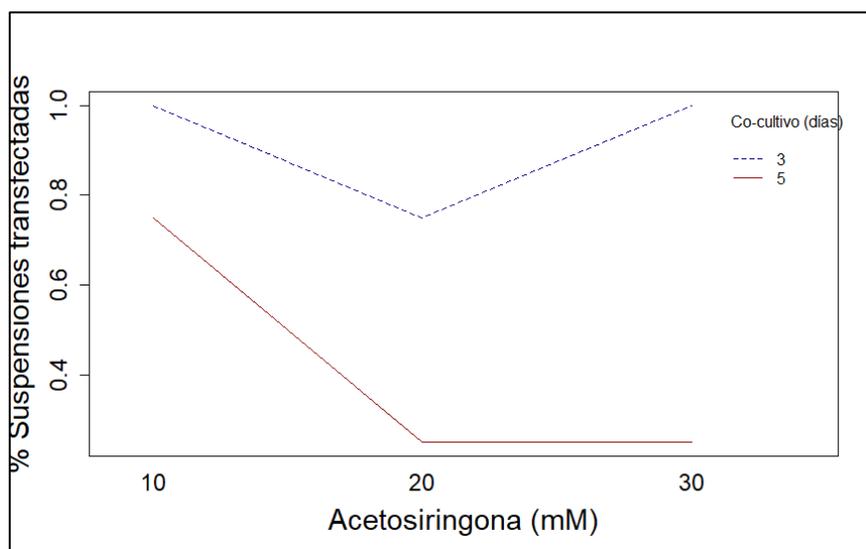
Nota. Tratamientos de transfección. T1: 10 mM Acetosiringona, 3 días de co-cultivo. T2: 10 mM Acetosiringona, 5 días de co-cultivo. T3: 20 mM Acetosiringona, 3 días de co-cultivo. T4: 20 mM Acetosiringona, 5 días de co-cultivo. T5: 30 mM Acetosiringona, 3 días de co-cultivo. T6: 30 mM Acetosiringona, 5 días de co-cultivo.

Además, se puede observar en esta gráfica que la tasa de transfección disminuye cuando se incrementa el tiempo de cocultivo con *A. tumefaciens* y la concentración de Acetosiringona. Estos resultados sugieren que el mejor tratamiento para transfectar células de tabaco y permitir la expresión del gen GFP consiste en adicionar 10 o 30 mM de Acetosiringona en el medio de co-cultivo y co-cultivar la suspensión celular con la *A. tumefaciens* durante 3 días.

Se realizó una gráfica de interacción para determinar si existe interacción entre la concentración de Acetosiringona y el tiempo de cocultivo, (Fig. 30). En esta gráfica se puede observar que no existe interacción entre la concentración de Acetosiringona y el tiempo de co-cultivo, al mostrar rectas paralelas, por lo cual, la única variable que influye en la expresión de gen GFP en las suspensiones celulares transfectadas es el tiempo de cocultivo. Este resultado se confirmó mediante ANOVA (Anexo 11) con un valor de p (>0.4866) mayor al nivel de significancia ($\alpha=0.05$), con lo cual se concluye que no existe interacción significativa entre la concentración de Acetosiringona en el medio de cocultivo y el tiempo de cocultivo.

Figura 30

Gráfica de interacción para el porcentaje de suspensiones celulares de tabaco con expresión de GFP.



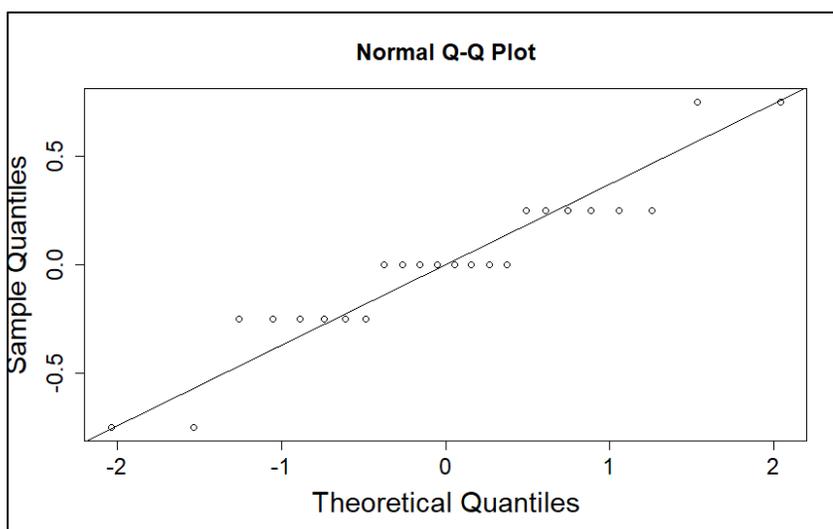
Se empleó análisis inferencial y la prueba de ANOVA (Anexo 11) para determinar si los datos dicotómicos de la variable expresión del gen GFP sigue una

distribución normal y poder clasificar los datos como paramétricos o no paramétricos.

Una vez obtenidos los residuos en el análisis de varianza se procedió realizar la gráfica de distribución de normalidad Q-Q plot, como se observar en la figura 31.

Figura 31

Gráfica de normalidad con los residuos de la variable expresión de GFP en suspensiones celulares de tabaco transfectadas.



En esta figura de interacción se puede observar que la variable expresión del gen GFP sigue una distribución normal por lo cual, se estableció que los datos dicotómicos de la variable son paramétricos. Se aplicó la prueba de normalidad Shapiro-Wilks modificado (Tabla 17) y con un valor p (>0.0867) mayor al nivel de significancia ($\alpha=0.05$) no se rechazó la hipótesis nula de normalidad de los datos dicotómicos de la variable expresión de gen GFP.

Tabla 17

Prueba de Shapiro-Wilks modificado con los residuos del ANOVA de la variable expresión de GFP en suspensiones celulares de tabaco transfectadas.

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO Transfeccion	24	0.00	0.36	0.91	0.0867

Una vez que se estableció que los datos de la variable expresión del gen GFP son paramétricos, se empleó ANOVA (Anexo 12) para ver si existe igualdad en las medias de los tratamientos. Con un valor p (<0.0484) menor al nivel de significancia ($\alpha=0.05$) se rechazó la hipótesis de igualdad en las medias de los tratamientos. Se empleó la prueba paramétrica de Rango Múltiple de Duncan (Anexo 13) para comparar los pares de medias de los tratamientos.

En la prueba de Duncan (Anexo 13) se observó que los tratamientos TD1 (10 mM de Acetosiringona y 3 días de cocultivo) y TD5 (30 mM Acetosiringona y 3 días de cocultivo) del subconjunto B presentan la mayor media (1,0) en porcentaje de suspensiones celulares de tabaco con expresión de GFP, pero no presentaron diferencias estadísticas. Por lo tanto, se eligió el tratamiento TD1 con una concentración de 10 mM Acetosiringona en el medio de cocultivo y 3 días de co-cultivo como mejor tratamiento para transfectar suspensiones celulares de tabaco con expresión del transgén GFP mediante *A. tumefaciens* LBA4404 con pSiM24-eGFP.

Debido a la falta de regeneración de callos de tabaco a partir de las suspensiones celulares transfectedas por contaminación, se complementó la eficiencia de transfección con datos bibliográficos de estudios realizados de callos de tabaco regenerados a partir de suspensiones celulares de *Nicotiana tabacum* BY-2

transfectadas con *Agrobacterium tumefaciens*, En la tabla 18 se observa que se puede obtener eficiencias de transfección para callos regenerados de tabaco entre el 50 % con resistencia al antibiótico Kanamicina como marcador de selección y el 70 % con resistencia a Kanamicina y con expresión de fluorescencia GFP.

Tabla 18

Eficiencias de transfección en callos regenerados de Nicotiana tabacum BY-2 a partir de suspensiones celulares transfectadas con Agrobacterium tumefaciens

Explantado transformado	Cepa de A. tumefaciens	Marcador de selección	Eficiencia de transformación	Referencia
Callo	LBA4404	Kanamicina	50%	An (1985)
Callo	C58C1	Kanamicina	70%	Nocarova y Fischer (2009)

Transfección de Callos de Tabaco

Para el ensayo preliminar de transfección de callos de tabaco se empleó la metodología propuesta por López *et al.* (2015) y Komari (1989) con ciertas modificaciones. Se emplearon callos de 2 meses de inducción y la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* con el plásmido pSiM24-GUS. En este experimento se consideraron diferentes tiempos de inmersión (20 y 30 min) de los callos de tabaco en la suspensión celular de *Agrobacterium* y diferentes tiempos de cocultivo (3 y 4 días) para evaluar la expresión del gen GUS y la eficiencia de transfección.

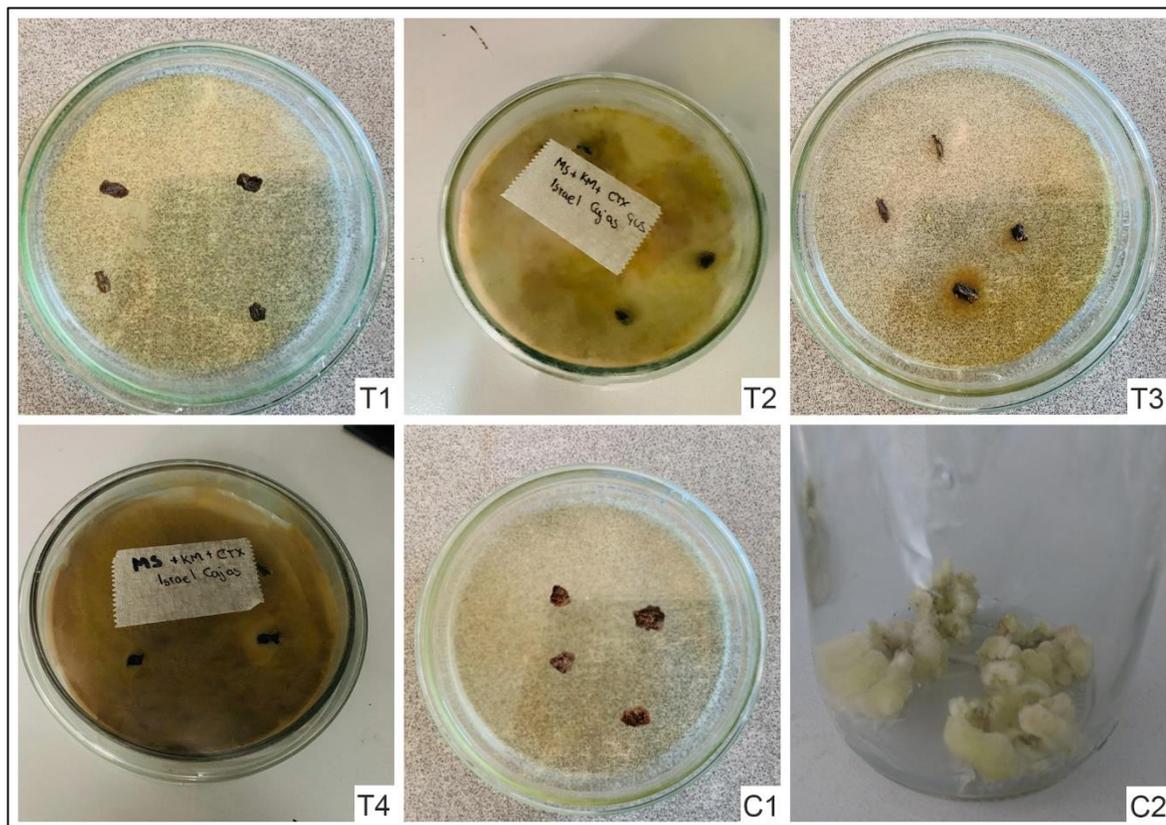
Se estableció un diseño completamente al azar con un total de 4 tratamientos con 8 repeticiones. Con la finalidad de determinar el mejor tratamiento con mayor

expresión del gen reportero GUS, se analizó los factores tiempo de inmersión y el tiempo de cocultivo. Se definió los tratamientos T1: 20 min de inmersión y 3 días de cocultivo; T2: 20 min de inmersión y 4 días de cocultivo; T3: 30 min de inmersión y 3 días de cocultivo; T4: 30 min de inmersión y 4 días de cocultivo.

Luego de transcurrido el tiempo de cocultivo, los callos se transfirieron a medio de selección MS con Kanamicina (50 mg/L) y Cefatoxima (250 mg/L). En la figura 32, se puede observar que todos los tratamientos incluido el control (callos no transfectados) después de 2 meses y medio del traspaso a medio de selección presentaron necrosamiento. El necrosamiento provocó el oscurecimiento y disminución del tamaño de los callos respecto al control C1 (Fig. 32, C1), debido a la producción de compuestos fenólicos alrededor de los callos (Fig. 32, T2, T3 y T4), lo cual produjo la muerte celular del callo.

Figura 32

Callos de tabaco transfectados con *A. tumefaciens* con pSiM24-GUS en medio de selección MS con 50 m/L de Kanamicina y 250 mg/L Cefatoxima.

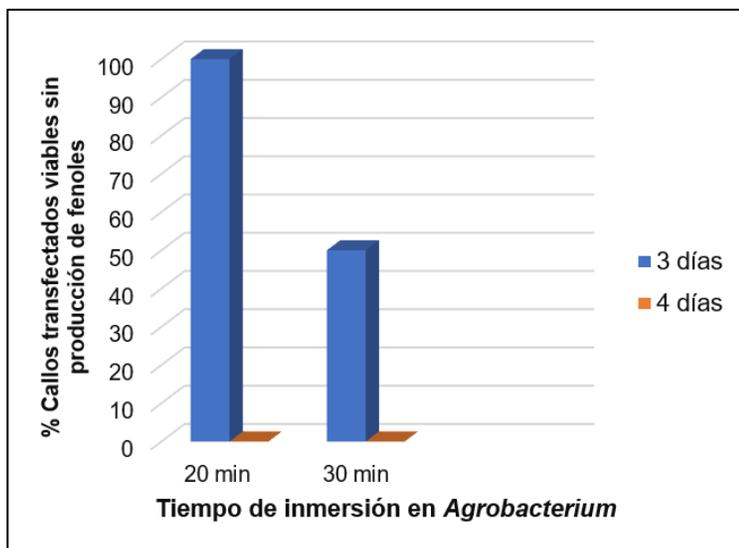


Nota. Tratamientos de transfección. T1: 20 min de inmersión, 3 días de co-cultivo. T2: 20 min de inmersión, 4 días de co-cultivo. T3: 30 min de inmersión, 3 días de co-cultivo. T4: 30 min de inmersión, 4 días de co-cultivo. C1: control callos de tabaco no transfectados en medio de selección. C2: control callos de tabaco no transfectados en medio sin selección.

En la figura 33 se muestra los porcentajes de callos de tabaco transfectados viables en medio de selección con resistencia al marcado de selección Kanamicina (50mg/L). En esta gráfica, se puede observar que el tratamiento T1 con un tiempo de inmersión de 20 minutos de los callos de tabaco en *Agrobacterium* y 3 días de cocultivo permite tener un 100% de callos transfectados viables sin presencia de compuestos fenólicos (Fig. 31, T1). Además, se observa que al aumentar el tiempo de cocultivo se obtiene un 0.0% de callos viables.

Figura 33

Porcentaje de callos de tabaco transfectados viables en medio de selección MS con 50 mg/L de Kanamicina y 250 mg/L de Cefatoxima.



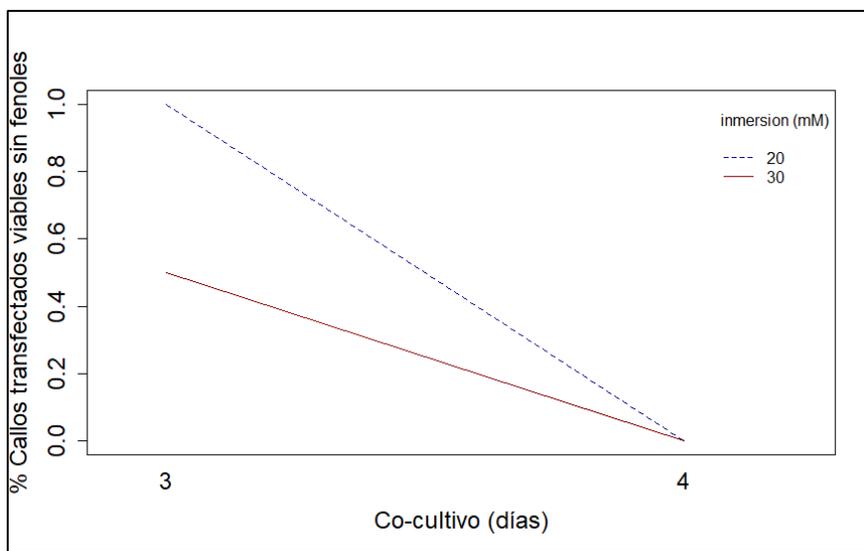
Nota. Tratamientos de transfección. T1: 20 min de inmersión, 3 días de co-cultivo. T2: 20 min de inmersión, 4 días de co-cultivo. T3: 30 min de inmersión, 3 días de co-cultivo. T4: 30 min de inmersión, 4 días de co-cultivo.

Estos resultados sugieren que el mejor tratamiento para obtener callos viables de tabaco con resistencia a marcador de selección Kanamicina sin presencia de compuesto fenólicos después de la transfección con *A. tumefaciens* GV3101 con el vector binario pSiM24-GUS, consiste en sumergir los explantes de callos durante 20 minutos en una suspensión de *A. tumefaciens* de OD_{600nm} igual a 0.8 y un tiempo de cocultivo de 3 días.

Para determinar si existe interacción entre el tiempo de inmersión y el tiempo de co-cultivo, se realizó una gráfica de interacción (Fig. 34). En esta gráfica se puede observar que existe interacción entre el tiempo de inmersión y el tiempo de cocultivo, al no mostrar rectas paralelas, por lo cual, las dos variables influyen en el porcentaje de callos de tabaco transfectados viables sin presencia de compuestos fenólicos. Este resultado se confirmó mediante ANOVA (Anexo 14) con un valor de p (<0.0132) menor al nivel de significancia ($\alpha=0.05$), con lo cual se concluye que existe interacción significativa entre el tiempo de inmersión y el tiempo de cocultivo.

Figura 34

Gráfica de interacción para el porcentaje de suspensiones celulares de tabaco con expresión de GFP.



Adicionalmente, en esta gráfica se puede observar que el mayor porcentaje de callos de tabaco viables sin presencia de compuestos fenólicos alrededor se obtiene con 20 minutos de inmersión del tejido caloso con *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 y 3 días de cocultivo.

Los resultados de los callos obtenidos con necrosamiento después de la transfección con *A. tumefaciens* no se emplearon para evaluar la expresión del gen GUS mediante ensayo histoquímico con X-GLUC. Por lo cual, la eficiencia de transfección para este ensayo se complementó con datos bibliográficos realizados por Komari en 1989 en callos de tabaco transfectados con la cepa A281 de *A. tumefaciens* con un 20.2 % de eficiencia de transfección en medio de selección con Kanamicina. Así

como la integración del gen reportero GUS en el genoma de *N. tabacum* mediante *A. tumefaciens* LBA4404 (Méndez-Muñoz, *et al.*, 2019).

Capítulo 4: Discusión

Inducción de Callos en Hojas de Tabaco (*Nicotiana tabacum*)

El objetivo del presente trabajo se centró en estandarizar el método de transfección de callo y suspensiones celulares de tabaco (*Nicotiana tabacum*) mediante *Agrobacterium tumefaciens*. El trabajo se inició con el establecimiento del protocolo de desinfección en explantes de hojas de tabaco para inducir la formación de callos y establecer suspensiones celulares.

Un aspecto importante en el inicio de cualquier tipo de cultivo de tejidos representa la desinfección del material vegetal para evitar el riesgo de contaminación interna y externa por hongos o bacterias (Niedz & Bausher, 2002; Tomaszewska-Sowa, Figas, Keutgen, & Keutgen, 2016). La desinfección de hojas de tabaco se realizó con diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (NaClO) y diferentes tiempos de inmersión para obtener un cultivo libre de contaminación. Se empleó hipoclorito de sodio como desinfectante debido a que es la solución generalmente utilizada para la eliminación de esporas vegetativas, bacterias, hongos, protozoos y virus y para la esterilización de explantes (Dychdala, 1991; Negash, Puite, Schaart, Visser, & Krens, 2000).

En el presente trabajo, se obtuvo una desinfección efectiva de explantes de hojas tabaco libres de contaminación con la aplicación de NaClO al 1.5% o al 2 % v/v durante 5 minutos de inmersión. Sin embargo, se observó un 100 % de explantes necrosados debido a que el hipoclorito de sodio en altas concentraciones tiene un

efecto fitotóxico en células vegetales (Zinabu, Gebre, & Shekata, 2018). Este resultado es similar al obtenido por Salazar y Romero (1996), quienes observaron el necrosamiento en hojas de ajonjolí (*Sesamum indicum* L.) por el efecto fitotóxico del hipoclorito de sodio al 2.0% después de una exposición de 5 minutos de los explantes.

Algunos resultados alcanzados por Spurr y Welty (1975), obtuvieron como mejor tratamiento de desinfección de hojas de *Nicotiana*, la aplicación de NaClO al 1% durante 30 a 60 segundos para reducir la contaminación entre un 85 al 95% (Spurr & Welty, 1975). Así mismo, resultados obtenidos por varios autores en la desinfección de explantes de hojas de *Nicotiana tabacum* (tabaco) con hipoclorito de sodio, determinaron las siguientes concentraciones: 10% durante de 5 a 10 minutos (Chawla, 2011); al 10% durante 30 minutos para obtener una contaminación del 2.2% (Medina & González, 2004) o al 20% de la solución comercial de NaClO durante 5 minutos más etanol al 70% con una contaminación del 16,9% (Grijalva , 2018).

Al realizar un protocolo de esterilización de explantes, lo que se busca son agentes desinfectantes que puedan utilizarse a bajas concentraciones y a intervalos de tiempo cortos para trabajar con material vegetal sin contaminación y con la menor cantidad de lesiones al explante (Smith, 2013). En este estudio con la concentración de 0.5% v/v de NaClO durante 2 minutos de exposición se obtuvo la menor de contaminación bacteriana (16,67%) con el mayor porcentaje de explantes viables sin presencia de necrosamiento (83,33%), a diferencia del resto de tratamientos. Por tal razón, se eligió este tratamiento para la desinfección de hojas de tabaco en términos de contaminación y viabilidad en todo el ensayo.

Una vez que se estableció el mejor tratamiento para desinfectar los explantes de hojas de tabaco, se buscó inducir la formación de callos mediante la adición de reguladores de crecimiento de plantas en el medio de cultivo. En este sentido Gatz, Tomaszewska-Sowa y Figas (2017), mencionan que para inducir la formación de callos y estimular su proliferación, es necesario usar una combinación adecuada de auxina con citoquinina. A nivel *in vitro* la inducción de callo a partir de explantes de hoja de tabaco está influenciado por la concentración hormonal en el medio y el genotipo de la variedad (Ali, Hadi, Zahir, Tariq, & Khan, 2007).

El crecimiento de callos se inicia dentro de las 2-3 semanas de cultivo y se obtiene cultivando explantes en un medio semisólido suplementado con una combinación de auxina con citoquinina (Husin, Hasan, & Taha, 2005). En el presente trabajo se observó la formación de callos en explantes de hojas de tabaco después de 4 semanas de cultivo en medio MS con diferentes concentraciones de ANA (auxina) y Kinetina (citoquinina). Se obtuvo un 91,67% de explantes con callos de textura friable y coloración crema con la combinación de 2.0 mg/L de ANA y 0.2 mg/L de Kinetina.

Este resultado es similar al obtenido por Husin y colaboradores (2005), quienes observaron un 100% de callos compactos de color crema con 2.0 mg/L de ANA y 0.2 mg/L de Kinetina. En trabajos reportados por Delgado (2015) también se logra un 100% de callos friables de color blanco-amarillo en tejido foliar de *N. tabacum* L. con 2.0 mg/L de ANA y 0.2 mg/L BAP. Los resultados obtenidos en el presente trabajo del 91,67 % de callos inducidos fue incluso mayor al obtenido en el trabajo de Ali y sus colaboradores (2007), quienes obtuvieron un 67,85% de callos compactos y coloración verdosa en explantes de hojas de tabaco con 2.0 mg/L de ANA y 0.2 mg/L de BAP.

La inducción de callos en hojas de tabaco requiere una alta proporción de auxina: citoquinina (Ali, *et al.*, 2007). En el presente estudio se observó la formación de callos con los diferentes tratamientos a excepción del tratamiento con 0.0 mg/L de ANA y 0.2 mg/L de Kinetina. Este resultado concuerda con el obtenido por Ali *et al.* (2007), quienes observaron la presencia de callo en explantes de hojas de tabaco en todas las combinaciones de hormonas con medio MS probadas, a excepción de la combinación de 0.0 mg/L de ANA y 0.2 mg/L de BAP, en la cual no se observó callogénesis.

Los callos presentan diferentes morfologías y texturas (friables o compactos), dependiendo del tipo y la concentración de la auxina aplicada (Kumar, 2015; Gatz, Tomaszewska-Sowa, & Figas, 2017). Los callos pueden ser de color amarillo cremoso, blanco o verde debido al desarrollo de cloroplasto en las células del tejido calloso (Kumar, 2015). La combinación de 1.0 o 2.0 mg/L de ANA y 0.2 mg/L de Kinetina en el medio MS indujo la formación de callos no embriogénicos de textura friable y de color crema. En cambio, en el medio MS con 3 mg/L de ANA y 0,2 mg/L de Kinetina se formaron callos compactos de color verde. Este resultado es similar al obtenido por Al-Ajlouni y colaboradores (2015) en explantes de hojas de *Ruta graveolens* en donde el uso de 2 mg/L de ANA en medio MS produjo callos friables y cremosos. Gonçalves y colaboradores (2015), en cambio obtuvieron un callo compacto y verde en hojas de *Hovenia dulcis* con la combinación de 2.5 mg/L de ANA y 0.65 mg/L de BAP. Esto es debido a que cambios en los niveles de ANA en el medio de cultivo puede cambiar la textura de los callos a compactos o friables (Blakely & Steward, 1961).

Transfección Genética

La transfección en plantas con *Agrobacterium tumefaciens* es un proceso relativamente largo, por lo cual es necesario verificar la presencia del plásmido T-DNA en la cepa de *Agrobacterium* antes de continuar con los experimentos de transfección (Wigge, 2006). En el presente trabajo previo a los ensayos de transfección genética en tabaco, se empleó Colony PCR y PCR directa para confirmar la incorporación de los vectores binarios pSiM24-eGFP y pSiM24-GUS en *A. tumefaciens* GV3101 mediante electroporación.

Mediante Colony PCR con las colonias de *A. tumefaciens* GV3101 electroporadas no se observó la amplificación de los genes GUS o GFP al comparar con las colonia de *E. coli* como control positivo. Por lo cual, no se confirmó la presencia de los plásmidos pSiM24-eGFP y pSiM24-GUS en la bacteria. Esto posiblemente se debe a que la Colony PCR en *Agrobacterium* no funciona bien en relación con *E. coli* (Kumar, 2014). En este sentido Hague (2015) menciona que los orígenes de replicación (ori) en los vectores binarios para *Agrobacterium* mantienen el plásmido en un número muy bajo de copias (1-5 por célula) a diferencia del ori en *E. coli*, donde el número de copias es mayor (> 300 copias). Esto concuerda con Sahoo, *et al.* (2014) quienes establecen que el plásmido pSiM24 tiene una alto número de copias en *E. coli*.

El DNA plasmídico cuando se extrae a partir de colonias *A. tumefaciens* transformado permite detección rápida y confiable mediante PCR de transformantes bacterianos (Gómez, Gómez , & Núñez , 2018). En el presente estudio, se extrajo el DNA plasmídico a partir de las colonias de *Agrobacterium* electroporadas con los

vectores binarios pSiM24 para su verificación por PCR directa. En los resultados de la PCR para el vector pSiM24-eGFP se obtuvo un fragmento de ~780 bp del gen GFP que coincide con lo reportado por Garzón (2019). Mientras que para el plásmido pSiM24-GUS se obtuvo un fragmento de ~2100 bp del gen GUS, lo que concuerda con lo reportado por Sahoo *et al.* (2014). Con este resultado se confirmó que *A. tumefaciens* GV3101 alberga los plásmidos pSiM24 para iniciar los ensayos de transfección en tabaco.

Transfección de Suspensiones Celulares de Tabaco

La transfección mediante *Agrobacterium* es un método empleado para transfectar plantas y consiste en el cocultivo de células vegetales con *Agrobacterium tumefaciens* con la posterior selección de las células transfectadas en un medio selectivo apropiado (Hooykaas & Schilperoort, 1992). Para establecer un protocolo de transfección eficiente mediado por *Agrobacterium*, es necesario optimizar ciertos factores que afectan la eficiencia de transfección. Estos factores incluyen la densidad del cultivo de *A. tumefaciens*, el período de infección de la bacteria, el tiempo de cocultivo y la concentración de Acetosiringona (Li, *et al.*, 2012; Kutty, Parveez, & Huyop, 2010).

En la presente investigación se estandarizó la transfección en suspensiones celulares de tabaco con *A. tumefaciens* LBA4404 en base a la metodología descrita por Mayo *et al.* (2006) con modificaciones en el tiempo de cocultivo y la concentración de Acetosiringona en el medio de cocultivo mediante ensayos preliminares. Para lo cual, se establecieron suspensiones celulares de *Nicotiana tabacum* BY-2, por su facilidad de

transformación mediante cocultivo con *Agrobacterium* (An, 1985). Las suspensiones celulares se establecieron a partir de callos friables bajo agitación, debido a que este tipo de callo requiere menos fuerza para formar células individuales y pequeños agregados en comparación a un callo compacto (Wuest, Hou, & Lee, 2011).

Se pueden usar dos estrategias para seleccionar plantas transfectadas: mediante la expresión de un gen reportero, y/o mediante un marcador de selección que brinda resistencia a un determinado antibiótico (Jouanin, *et al.*, 1993). En la presente investigación la transfección de las suspensiones celulares de tabaco se evaluó en base a la expresión de los genes: *nptII* como marcador de selección para la resistencia al antibiótico kanamicina (50 mg/L) y el gen reportero GFP. Como resultado preliminar se obtuvo un 100 % de suspensiones celulares de tabaco (*N. tabacum* BY-2) con resistencia kanamicina y con expresión del gen GFP con un tiempo de cocultivo de 3 días y 10 mM de Acetosiringona adicionadas en el medio de cocultivo. Este resultado, difiere con la metodología de Mayo *et al.* (2006) empleada, quienes establecen un tiempo de 3 días de cocultivo y 20 mM de Acetosiringona para transfectar células de tabaco NT1 mediante *A. tumefaciens* LBA4404. Sin embargo, el 100 % de células de tabaco con resistencia a la kanamicina y expresión del gen GFP obtenido fue superior al 0.27% de transfección de células *N. tabacum* BY-2 con resistencia a 50 mg/L de Kanamicina y con expresión de GFP alcanzado por Garzón (2019) empleando el sistema nanostraw como método de transfección.

La fluorescencia verde del gen GFP se observó después de 7 días pasado el tiempo de cocultivo en todos los tratamientos de transfección a excepción del control, porque las células BY-2 no son fluorescentes por la ausencia de cloroplastos

autofluorescentes (Brandizzi, Irons, Kearns, & Hawes, 2003). Esto coincide con lo reportado por Shumin y colaboradores (2014) quienes observaron que el GFP se expresa de manera estable durante al menos 20 días en suspensiones celulares BY-2 transfectadas con *Agrobacterium*.

Se debe tomar en cuenta que las células de tabaco presentan diferente morfología en relación con suspensiones celulares de otras especies (Delgado , 2015). En el microscopio de fluorescencia invertido se observaron células de *N. tabacum* BY-2 en poca cantidad, separadas y con morfologías circulares, alargadas y asimétricas. Esto es corroborado por varios autores que mencionan que las células de tabaco BY-2 pueden presentar formas redondas (30–50 μm) formando agregados o racimos, alargadas o formando cadenas (Alvarez, Nissen, & Ernst, 1994; Nagata & Kumagai, 1999) y formas asimétricas (Ball & Joshi, 1965).

El período de cocultivo es un factor importante en la transfección en plantas para la transferencia e integración del T-DNA mediada por *Agrobacterium* en el genoma de la planta (Sun, *et al.*, 2011). Normalmente se emplea un período de cocultivo de 2 a 7 días (Han, Meilan, Ma, & Strauss, 2000). En esta investigación con un tiempo de cocultivo de 3 días se observó mayor porcentaje de suspensiones celulares de tabaco transfectadas con expresión del gen reportero GFP, mientras que con 5 días se obtuvo menor porcentaje. Este resultado es similar al obtenido por Pathi, Tula, y Tuteja (2013), quienes obtuvieron una alta frecuencia de transfección cocultivando explantes de hoja de tabaco, con la *A. tumefaciens* LBA4404, durante 3 días. En este estudio el cocultivo mayor a 3 días condujo a una disminución en la frecuencia de transformación. Xing, *et al.* (2010) reportaron 4 días de cocultivo para obtener mayor porcentaje de expresión del

gen GUS en suspensiones celulares de batata (*Ipomoea batatas*) transfectadas con *A. tumefaciens* EHA105. Además, estos autores observaron que un tiempo prolongado de cocultivo mayor o igual a 5 días disminuía el porcentaje de expresión del gen GUS.

En estudios de transfección se ha reportado que el adicionar Acetosiringona en el medio de cocultivo permite inducir los genes de virulencia del plásmido Ti en *Agrobacterium* y mejora la eficiencia de transfección (Banerjee & Chattopadhyay, 2008). En este estudio la variable concentración de acetosiringona estadísticamente no influyó en la expresión del gen GFP de las suspensiones celulares de tabaco transfectadas. Sin embargo, se obtuvo mejores resultados de expresión de GFP con 10 o 30 mM de Acetosiringona y 3 días de cocultivo. Al no ser estadísticamente diferentes las dos concentraciones se eligió la menor concentración de 10 mM. Este resultado es similar al reportado por Lee y colaboradores (2008), quienes reportaron altos porcentaje de callos de *S. miltiorrhiza* con expresión del gen reportero GFP con concentraciones de Acetosiringona de 0.2 y 10 mM.

Adicionalmente, se observó una disminución en el porcentaje de células transfectadas de *N. tabacum* BY-2 con expresión de GFP, al incrementarse la concentración de Acetosiringona de 10 mM a 30 mM con 5 días de cocultivo, resultados que fueron similares a los reportado por Li, *et al.* (2012). Estos autores obtuvieron una alta frecuencia de transfección con 200 μ M de Acetosiringona, mientras que un aumento adicional a 250 o 300 μ M resultó en una reducción significativa del porcentaje de transfección de suspensiones celulares de Regaliz (*Glycyrrhiza inflata*) transfectadas con *A. tumefaciens* LBA4404. De acuerdo con Hosein, Lennon y Umaharan (2012) altas concentraciones de acetosiringona provocan una disminución en la eficiencia de la

transfección y, en algunos casos, la inhibición es por completo. Esto podría atribuirse a la toxicidad que tiene la Acetosiringona en altas concentraciones sobre los explantes, por la mayor cantidad de alcohol utilizado para sus preparaciones (Sreeramanan, *et al.*, 2005).

La densidad celular de *Agrobacterium* utilizada para el cocultivo es un factor igualmente importante para los experimentos de transfección (Paramesh, Fakrudin, & Kuruvnashetti, 2010). En el presente estudio se empleó una OD_{600nm} igual a 0.6 como menciona la metodología de Mayo *et al.* (2006) empleada. Esta concentración ha sido empleada en diferentes estudios de transfección de *N. tabacum* con *A. tumefaciens* LBA4404 tales como suspensiones celulares de *N. tabacum* BY-2 (Shumin, Yanxia, Bang, & Wei, 2014), hojas de tabaco (Gubiš, *et al.*, 2007; Mondal & Kundu, 2017) y callos de *N. tabacum* BY-2 (Méndez-Muñoz, Campos-Delgado, Obando-Coronado, & Garro-Monge, 2019).

En la presente investigación, después de transfectar las células de tabaco y pasar al medio sólido de selección con Kanamicina y Cefatoxima no se observó la regeneración del callo, debido a la presencia de contaminación por hongos en todos los tratamientos, incluido el control después de 1 semana de incubación. Cassells y Doyle-Prestwich (2009) mencionan que los cultivos asépticos pueden contaminarse en el laboratorio debido al fracaso de la técnica estéril o el mal funcionamiento de equipos. Además, los hongos y levaduras crecen bien en medios cultivo vegetales incluso en ausencia de material vegetal (Enjalric, Carron, & Lardet, 1988). Esto explica el resultado obtenido en este ensayo preliminar, siendo un impedimento en la regeneración del callo de *N. tabacum* BY-2 después de 4 semanas como lo establece la metodología de Mayo

et al. (2006) empleada. De la misma forma Kato *et al.* (1972), mencionan que se requiere entre 3 y 4 semanas para obtener callos *N. tabacum* BY-2 a partir de células cultivadas en suspensión transfectadas con *A. tumefaciens*.

La ausencia de callos regenerados no permitió valorar la expresión del gen GFP, por lo cual, la eficiencia de transfección se complementó con datos bibliográficos de callos de tabaco regenerados en medio de selección después de transfectar suspensiones celulares de *N. tabacum* BY-2 con *A. tumefaciens*. En este sentido, existen datos como los reportados por An (1985) , quien obtuvo una eficiencia de transfección del 50 % con resistencia al antibiótico Kanamicina como marcador de selección y resultados como los de Nocarova y Fishcher (2009) que obtienen una eficiencia del 70% con resistencia a Kanamicina junto con la expresión del gen GFP. Al comparar estas eficiencias con estudios realizados de transfección en explantes de hojas de *Nicotiana tabacum* con *A. tumefaciens* LBA4404, en donde se han obtenido porcentajes del 20 % (Bakhsh, Anayol, & Ozcan, 2014), 84,57 % (Heidari Japelaghi, Haddad, Valizadeh, Dorani Uliiaie, & Jalali Javaran, 2018) y el 100% de transfección (Kutty, 2010), se puede observar que se puede lograr resultados prometedores con este ensayo preliminar una vez que se logró regenerar el callo de *N. tabacum* BY-2.

Transfección de Callos de Tabaco

En el presente trabajo se realizaron ensayos preliminares para estandarizar la transfección de callos de tabaco con *A. tumefaciens* GV3101 de acuerdo a las metodologías descritas por López *et al.* (2015) y Komari (1989) con modificaciones en el tiempo de inmersión para infectar el tejido caloso y el tiempo de cocultivo. En los

ensayos preliminares se emplearon callos friables porque los callos compactos producen baja frecuencia de transfección debido a las limitaciones de penetración que tiene la suspensión bacteriana por su estructura compacta y endurecida (Rubi, 1999).

En el ensayo de transfección se observó callos con necrosamiento en todos los tratamientos con medio de selección con Kanamicina y Cefatoxima, incluido los callos no transfectados como control. Este resultado difiere con la metodología de Komari (1989) y López *et al.* (2015) quienes en sus ensayos no presentaron necrosamiento en los explantes. Por otro lado, el resultado obtenido es similar al reportado por Perl y colaboradores (1996). Estos autores observaron que el cocultivo de callos embriogénicos de uva con *Agrobacterium* resultó en necrosis y mortalidad del tejido. La respuesta necrótica no se observó durante el cocultivo, sino 48h después de la transferencia de callos al medio de selección. Carvalho, *et al.* (2004) obtuvieron un resultado similar, pero en embriones inmaduros de sorgo, durante el cocultivo de los embriones, estos se mantuvieron con buena apariencia. Sin embargo, 48 h después de transferir los embriones al medio con cefotaxima, estos se volvieron marrones con la posterior muerte celular. Kuta y Tripathi (2005) mencionan que el necrosamiento puede depender de varios parámetros durante la transfección, incluida la duración de la infección, el tiempo de cocultivo y la densidad del inóculo bacteriano.

El período de cocultivo es una fase importante en la eficiencia de transfección con *Agrobacterium* (Kose & Koç, 2003). Las condiciones inadecuadas pueden producir demasiado crecimiento de la bacteria y por ende dificultar su erradicación con antibióticos o producir el necrosamiento en los explantes, lo que produce una menor tasa de transfección (Yin, Bartoszewski, Szwacka, & Malepszy, 2005; He, Chen, Yao, &

Dai, 2008; Nanasato, Konagaya, Okuzaki, Tsuda, & Tabei, 2013). Al analizar los callos transfectados no se observó la presencia de *Agrobacterium* en los tratamientos de 3 días de cocultivo, resultado que indica su eliminación correcta con el antibiótico Cefatoxima. Sin embargo, los tratamientos de transfección con 4 días de cocultivo presentaron fenoles alrededor de los callos y contaminación. Azofeifa (2009) menciona que la liberación de compuestos fenólicos y oxidativos es producto de la respuesta defensiva de algunos explantes ante un tiempo prolongado de cocultivo con *A. tumefaciens*, lo que provoca el necrosamiento junto con el oscurecimiento y muerte del tejido, explante o callo. A su vez, las células necróticas muertas también pueden atraer a microorganismos oportunistas en condiciones *in vitro*, lo que lleva a una grave contaminación en el medio (Kuta & Tripathi, 2005).

El tiempo de infección es otro factor que influye en el necrosamiento de los callos. Un tiempo corto de infección puede no ser beneficioso para la invasión de la bacteria, pero un tiempo demasiado largo puede dañar el explante e incluso provocar necrosis, por lo que se reduciría la eficiencia de la transferencia del T-ADN al explante (Duan, Ding, Song, He, & Zhou, 2013). En este trabajo se observó el necrosamiento de los callos con 10 o 20 minutos de inmersión. Sin embargo, con 3 días de cocultivo se observó compuestos fenólicos en un 50% de los callos transfectados al aumentar el tiempo de inmersión a 30 minutos.

Por lo antes mencionado, se puede observar que tiempos prolongados tanto en el cocultivo como en la inmersión influyen en el necrosamiento y en la producción de fenoles en los callos de tabaco transfectados. Tomando en consideración la ausencia de fenoles, se determinó el tiempo de 20 minutos de inmersión y 3 días de cocultivo

como parámetros de transfección con *A. tumefaciens* GV3101 con pSiM24-GUS para obtener el mayor porcentaje de callos viables a pesar de presentar necrosamiento. Este resultado es similar al reportado en el trabajo de Méndez-Muñoz y colaboradores (2019), quienes establecen tiempos de inmersión entre 15 o 30 minutos y 2 días de cocultivo para transfectar callos de *N. tabacum* L. o *N. tabacum* L. cv. BY-2.

Una posible explicación del necrosamiento observado en la presente investigación pudo ser la falta de dilución de la suspensión de *Agrobacterium* ($OD_{600}=0.8$) antes de infectar los callos. Kutty, Parveez, y Huyop (2010), reportaron problemas de necrosamiento en explantes de hojas de tabaco transfectadas con una suspensión de *Agrobacterium* ($OD_{600}=0.8$) no diluida. Estos autores observaron que el diluir la suspensión bacteriana (1:10) antes de la infección reduce la necrosis en los explantes transfectados y mejora los procesos eventos de transformación. Del mismo modo, Chakrabarty, *et al.* (2002) informaron que la exposición de los explantes de hipocotilo de coliflor al cultivo sin diluir de *Agrobacterium* ($OD_{600}=0.5$) resultó en una necrosis severa de los explantes, mientras que el cultivo diluido (dilución 1:10 y 1:20) redujo la necrosis en mayor medida. Estos resultados sugieren diluir la suspensión bacteriana para reducir los problemas de necrosamiento, procedimiento que no se realizaba anteriormente y que gracias a los resultados de este trabajo se incluirán en todas las metodologías que realicen transfección con *Agrobacterium* en el laboratorio.

El problema de necrosamiento en callos es un problema que se puede presentar en la transfección mediada por *Agrobacterium* (Li, *et al.*, 2017). Para mitigar este problema, se puede emplear bajas concentraciones de antioxidantes como el ácido ascórbico, el ácido lipoico, el α -tocoferol, el ditioneitol (DTT), la L-cisteína (L-cys) y

polivinilpolipirrolidona (PVPP) (Dan, 2008). La adición de bajas concentraciones de antioxidantes en el medio de cocultivo pueden reducir la necrosis celular, incrementar la viabilidad del explante y mejorar la eficiencia de la transformación (Li, *et al.*, 2017). Esto es corroborado por Perl y colaboradores (1996), quienes observaron que la adición antioxidante como PVPP (1 mg/L) o DTT (2 mg/L) en el medio de cocultivo inhibe completamente la necrosis durante y después del cocultivo en callos embriogénicos de *Vitis vinifera* cv, sin afectar la virulencia de *Agrobacterium*. En callos de crisantemo, Sánchez (2014) menciona también, que el uso de 0.1% de PVPP en el medio de cocultivo se emplea para reducir el necrosamiento.

La eficacia de la transfección por *Agrobacterium* se puede estimar por la tasa de expresión transitoria del gen reportero GUS en explantes transfectados (Li, *et al.*, 2017). En el presente ensayo preliminar, el necrosamiento en los callos transfectados impidió evaluar la expresión del gen GUS. Por lo cual, la eficiencia de transfección se complementó con resultados bibliográficos obtenidos en callos de tabaco transfectados con *A. tumefaciens*. De acuerdo a la metodología empleada de Komari (1989) se puede obtener una eficiencia de transfección del 20% de callos de tabaco con resistencia a Kanamicina mediante la transfección con *A. tumefaciens* A281. Este porcentaje es menor en comparación al 40 % o 100% de eficiencia que se puede obtener al realizar los ensayos con explantes de hoja de tabaco (Burow, Chlan, Sen, Lisca, & Murai, 1990; Fisher & Gultinan, 1995; Kutty, 2010). Siendo el método de transfección mediado por *Agrobacterium* más utilizado para la transfección genética de tabaco (Horsch, *et al.*, 1985).

Los porcentajes de eficiencia descritos anteriormente se pueden llegar a mejorar, empleando la cepa de *A. tumefaciens* GV3101 que propone la presente investigación, lo que se corrobora con los reportes de eficiencia del 50.07% en hojas de *N. tabacum* realizados por Heidari y colaboradores (2018). En relación al problema necrosamiento se puede solucionar con la dilución del inóculo de *Agrobacterium* y mediante la adición de antioxidantes en el medio de cocultivo, lo cual puede incrementar la viabilidad de los explantes y mejorar la eficiencia de transfección (Dan, 2008).

Los genes marcadores seleccionables más empleados en estudios de transfección de plantas son los genes neomicina fosfotransferasa (*nptII*) e higromicina fosfotransferasa *hptII*, los cuales confieren resistencia a los antibióticos kanamicina e higromicina, respectivamente (Kutty, 2011). Para la transfección de callos de tabaco se empleó una concentración de 50 mg/L de Kanamicina, debido a que esta concentración ha demostrado ser adecuada para el proceso de selección de tejidos de tabaco transfectados tales como: segmentos nodales de tabaco (Silva, Coppede, Silva, & Zingaretti, 2018) y suspensiones celulares de tabaco BY-2 (Garzón, 2019).

Los callos necrosados obtenidos en esta investigación mediante la transfección con *A. tumefaciens* durante 20 minutos de inmersión y 3 días de cocultivo se consideraron como posibles callos transfectados con resistencia al antibiótico de selección Kanamicina. Se llega a esta conclusión debido a que Al Abdallat y colaboradores (2011), reportaron el necrosamiento de callos de *Crataegus aronia* en el medio de selección después del período de cocultivo con *A. tumefaciens*. Sin embargo, después de 4 semanas de subcultivos notaron el apareamiento de pequeños grupos de células con resistencia al marcador de selección en la superficie de los callos

necrosados. Del mismo modo, en el estudio realizado por Méndez-Muñoz *et al.* (2019), observaron el necrosamiento u oscurecimiento en callos de *N. tabacum* luego de una semana de cultivo en medio de selección. Estos autores después de 1 mes de subcultivar cada semana los callos en el medio de selección, verificaron la transfección mediante la expresión de los genes reporteros GUS y GFP. Estos resultados respaldan lo planteado sobre callos transfectados, debido a que los callos del presente estudio se mantuvieron en medio de selección durante 2 meses y medio sin los respectivos subcultivos cada semana. Sin embargo, es necesario realizar el ensayo histoquímico con X-GLUC para verificar la expresión del gen GUS en los callos posiblemente transfectados.

Por lo tanto, la presente investigación permitió obtener células de tabaco transfectadas con *Agrobacterium tumefaciens* mediante marcadores de selección y genes reporteros.

Capítulo 5: Conclusiones

- El mejor tratamiento para la desinfección de hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) de 3 meses de edad con el mayor porcentaje de explantes viables consistió en la aplicación de 0.5% (v/v) de Hipoclorito de Sodio durante 2 minutos de inmersión.
- La adición de 2 mg/L de ANA combinado con 0.2 mg/L de Kinetina en el medio MS permitió inducir la formación de callo no embriogénicos de tipo friable en un 91,67% en explantes de hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum*).
- Bajo condiciones de laboratorio se logró obtener un 100% de suspensiones celulares de tabaco con resistencia a kanamicina (50 mg/L) y expresión del gen reportero GFP mediante la transfección con *A. tumefaciens* LBA4404 ($OD_{600nm}=0.6$) con pSiM24-eGFP con 3 días de cocultivo y 10 mM de Acetosiringona adicionados en el medio de cocultivo. Sin embargo, no se obtuvo la regeneración de callos para evaluar la expresión del gen reportero GFP.
- El ensayo preliminar de transfección de callos friables de tabaco (*Nicotiana tabacum*) con *A. tumefaciens* GV3101 ($OD_{600nm}=0.8$) con el vector pSiM24-GUS con 20 minutos de inmersión y 3 días de cocultivo permitió obtener callos con resistencia a Kanamicina. Sin embargo, el necrosamiento impidió evaluar la expresión del gen reportero GUS.
- El uso del marcador de selección Kanamicina (50 mg/L) y los genes reporteros GFP y GUS son importantes en ensayos de transfección, ya que permiten detectar células de tabaco transfectadas con *A. tumefaciens*.

- Los resultados preliminares obtenidos en la presente investigación pueden servir como base para futuras investigaciones en la estandarización y transfección de callo y suspensiones celulares de tabaco con *A. tumefaciens*.

Capítulo 6: Recomendaciones

- Es necesario que se replique el ensayo de transfección de suspensiones celulares de tabaco para lograr regenerar el callo, determinar y comparar la eficiencia de transfección.
- En los próximos ensayos de transfección en callos de tabaco se podría diluir la concentración de *Agrobacterium* y usar antioxidantes durante el período de cocultivo para reducir el necrosamiento en los callos transfectados.
- Se recomienda realizar subcultivos cada semana durante un mes de los callos de tabaco transfectados para evaluar la expresión del gen GUS y determinar la eficiencia de transfección.
- Se recomienda realizar la transfección de las suspensiones celulares con el plásmido pSiM24-GUS y en callos con el plásmido pSiM24-eGFP para evaluar si existe alguna diferencia en la expresión en las células de tabaco transfectadas.
- Una vez establecidos los protocolos de transfección tanto en suspensiones celulares como en callo de tabaco, es recomendable probar el método con la inserción y expresión de alguna proteína de interés.

Capítulo 7: Bibliografía

Agyare, C., Obiri, D. D., Boakye, Y. D., Osafo, N., & Kuete, V. (2013). Anti-Inflammatory and Analgesic Activities of African Medicinal Plants. In *Medicinal Plant Research in Africa* (pp. 725-752). Oxford: Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-405927-6.00019-9

Al Abdallat, A. M., Sawwan, J. S., & Al Zoubi, B. (2011). Agrobacteriumtumefaciens-mediated transformation of callus cells of Crataegusaronia. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104(1), 31-39. doi:10.1007/s11240-010-9798-1

Al-Ajlouni, Z., Abbas, S., Shatnawi, M., & Makhadmeh, I. (2015). In vitro propagation, callus induction, and evaluation of active compounds on Ruta graveolens. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 1313(22), 101-106. doi:https://doi.org/10.1234/4.2015.3943

Alam, I., Sharmin, S. A., Naher, K., Alam, J., Anisuzzaman, M., & Alam, M. F. (2010). Effect of Growth Regulators on Meristem Culture and Plantlet Establishment in Sweet Potato [*Ipomoea Batatas*] (L.) Lam.]. *Plant Omics Journal*, 3, 35-39.

Ali, G., Hadi, F., Zahir, A., Tariq, M., & Khan, M. (2007). Callus Induction and in vitro Complete Plant Regeneration of Different Cultivars of Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) on Media of Different Hormonal Concentrations. *Biotechnology*, 6, 561-566. doi:10.3923/biotech.2007.561.566

Allen, G. C., Hall, G., Michalowski, S., Newman, W., Spiker, S., Weissinger, A. K., & Thompson, W. F. (1996). High-level transgene expression in plant cells: effects of a strong scaffold attachment region from tobacco. *The Plant Cell*, 8(5), 899-913. doi:10.1105/tpc.8.5.899

Alt-Mörbe, J., Kühlmann, H., & Schröder, J. (1989). Differences in Induction of Ti Plasmid Virulence Genes *virG* and *virD* , and Continued Control of *virD* Expression by Four External Factors. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2, 301-308. doi:10.1094/MPMI-2-301

Alvarez, R. C., Nissen, S. J., & Ernst, S. G. (1994). Selection, enrichment and initial characterization of an elongated cell culture of tobacco. *Plant Science*, 103(1), 73-79. doi:10.1016/0168-9452(94)03966-6

An, G. (1985). High Efficiency Transformation of Cultured Tobacco Cells 1. *Plant Physiology*, 79(2), 568-570.

Aravindaram, K., & Yang, N. S. (2009). Gene gun delivery systems for cancer vaccine approaches. *Methods in Molecular Biology*, 542, 167-178. doi:10.1007/978-1-59745-561-9_9

Azcon-Bieto, J., & Talón, M. (2013). *Fundamentos de Fisiología Vegetal* (Segunda ed.). España: McGraw-Hill.

Azofeifa, A. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. *Agronomía Mesoamericana*, 20(1), 153-175.

Bakhsh, A., Anayol, E., & Ozcan, S. F. (2014). Comparison of transformation efficiency of five *Agrobacterium tumefaciens* in *Nicotiana Tabacum* L. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 26(3), 259-264. doi:10.9755/ejfa.v26i3.16437

Ball, E., & Joshi, P. C. (1965). Observations on Individual Callus Cells of *Nicotiana tabacum* in Liquid Culture. *Botanical Gazette*, 126(4), 233-246.

Banerjee, A., & Chattopadhyay, S. (2008). Genetic transformation of a hepatoprotective plant, *Phyllanthus amarus*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 45(1), 57-64. doi:10.1007/s11627-008-9160-z

Bartlett, J. G., Alves, S. C., Smedley, M., Snape, J. W., & Harwood, W. A. (2008). High-throughput *Agrobacterium*-mediated barley transformation. *Plant Methods*, 4(1), 22. doi:10.1186/1746-4811-4-22

Bates, G. W. (1999). Plant transformation via protoplast electroporation. *Methods in Molecular Biology*, 111, 359-366. doi:10.1385/1-59259-583-9:359

Batoro, J., & Ekowati, G. (2017). An Ethnobotanical Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) in Indonesia. A Review. *Advances in Life Sciences*, 7(2), 26-29. doi:10.5923/j.als.20170702.03

Bentley, R., & Trimen, H. (1880). *Medicinal plants. Being descriptions with original figures of the principal plants employed in medicine and an account of the characters, properties, and uses of their parts and products of medicinal value.* (Vol. 3). London: J. & A. Churchill.

Bevan, M. W., Flavell, R. B., & Chilton, M. D. (1983). A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature*, 304, 184-187. doi:10.1038/304184a0

Bhatia, P., Ashwath, N., Senaratna, T., & Midmore, D. (2004). Tissue Culture Studies of Tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 78(1), 1-21. doi:10.1023/B:TICU.0000020430.08558.6e

Bhatia, S., Sharma, K., Dahiya, R., & Bera, T. (2015). Plant Tissue Culture. In *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences* (pp. 31-107). Boston: Academic Press. doi:10.1016/B978-0-12-802221-4.00002-9

Bidney, D., Scelonge, C., Martich, J., Burrus, M., Sims, L., & Huffman, G. (1992). Microprojectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology*, 18(2), 301-313. doi:10.1007/BF00034957

Binns, A. N., & Thomashow, M. F. (1988). Cell Biology of *Agrobacterium* Infection and Transformation of Plants. *Annual Review of Microbiology*, 42(1), 575-606. doi:10.1146/annurev.mi.42.100188.003043

Blakely, L. M., & Steward, F. C. (1961). Growth Induction in Cultures of *Haplopappus Gracilis*. I. the Behavior of the Cultured Cells. *American Journal of Botany*, 48(5), 351-358. doi:10.1002/j.1537-2197.1961.tb11650.x

Brandizzi, F., Irons, S., Kearns, A., & Hawes, C. (2003). BY-2 cells: culture and transformation for live cell imaging. *Current Protocols in Cell Biology*, 19(1), 1.7.1-1.7.16. doi:10.1002/0471143030.cb0107s19

Burow, M. D., Chlan, C. A., Sen, P., Lisca, A., & Murai, N. (1990). High-frequency generation of transgenic tobacco plants after modified leaf disk cocultivation with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 8(2), 124-139. doi:doi.org/10.1007/BF02669766

CABI. (2019). *Nicotiana tabacum*. Recuperado el 04 de Noviembre de 2019, de <https://www.cabi.org/isc/datasheet/36326#tosummaryOfInvasiveness>

Carvalho, C. H., Zehr, U. B., Gunaratna, N., Anderson, J., Kononowicz, H. H., Hodges, T. K., & Axtell, J. D. (2004). John D. *Genetics and Molecular Biology*, 27(2), 259-269. doi:10.1590/S1415-47572004000200022

Cassells, A. C., & Doyle-Prestwich, B. (2009). Contamination Detection and Elimination in Plant Cell Culture. En M. C. Flickinger, *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*. doi:doi.org/10.1002/9780470054581.eib241

Chakrabarty, R., Viswakarma, N., Bhat, S. R., Kirti, P. B., Singh, B. D., & Chopra, V. L. (2002). Agrobacterium-mediated transformation of cauliflower: Optimization of protocol and development of Bt-transgenic cauliflower. *Journal of Biosciences*, 27(5), 495-502. doi:10.1007/BF02705046

Chaverri, R. (1995). *El cultivo del Tabaco* (First Edition ed.). San José, Costa Rica.

Chawla, H. S. (2011). *Introduction to Plant Biotechnology* (3era. Edición ed.). India: Science Publisher.

Christenhusz, M. J., Fay, M. F., & Chase, M. W. (2017). *Plants of the World, an Illustrated Encyclopedia of Vascular Plants*. Kew–Chicago: Publishing/University of Chicago Press.

Christie, P. J. (2004). Type IV secretion: the Agrobacterium VirB/D4 and related conjugation systems. *Biochimica Biophysica Acta*, 1694, 219-234. doi:10.1016/j.bbamcr.2004.02.013

Chudakov, D. M., Lukyanov, S., & Lukyanov, K. A. (2005). Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging. *Trends in Biotechnology*, 23(12), 605-613. doi:10.1016/j.tibtech.2005.10.005

- Clemente, T. (2006). *Nicotiana* (*Nicotiana tabaccum*, *Nicotiana benthamiana*). *Methods in Molecular Biology*, 343, 143-154. doi:10.1385/1-59745-130-4:143
- Cluster, P. D., O'Dell, M., Metzloff, M., & Flavell, R. B. (1996). Details of T-DNA structural organization from a transgenic *Petunia* population exhibiting co-suppression. *Plant Molecular Biology*, 32(6), 1197-1203. doi:10.1007/bf00041406
- Crossway, A., Oakes, J. V., Irvine, J. M., Ward, B., Knauft, V. C., & Shewmaker, C. K. (1986). Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts. *Molecular and General Genetics*, 202(2), 179-185. doi:10.1007/BF00331634
- Cubitt, A. B., Heim, R., Adams, S. R., Boyd, A. E., Gross, L. A., & Tsien, R. Y. (1995). Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 20(11), 448-455. doi:10.1016/s0968-0004(00)89099-4
- Dai, S., Zheng, P., Marmey, P., Zhang, S., Tian, W., Chen, S., . . . Fauquet, C. (2001). Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. *Molecular Breeding*, 7(1), 25-33. doi:10.1023/a:1009687511633
- Dan, Y. (2008). Biological functions of antioxidants in plant transformation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 44(3), 149-161. doi:10.1007/s11627-008-9110-9
- Danilova, S. A. (2007). The technologies for genetic transformation of cereals. *Russian Journal of Plant Physiology*, 54(5), 569-581. doi:10.1134/S1021443707050019

Darbani, B., Eimanifar, A., Stewart, C. N., & Camargo, W. N. (2007). Methods to produce marker-free transgenic plants. *Biotechnology Journal*, 2(1), 83-90. doi:10.1002/biot.200600182

Darbani, B., Farajnia, S., Toorchi, M., Zakerbostanabad, S., Noeparvar, S., & Stewart, C. (2008). DNA-Delivery Methods to Produce Transgenic Plants. *Biotechnology*, 7, 385-402. doi:10.3923/biotech.2008.385.402

Das, A., & Pazour, G. (1989). Delineation of the regulatory region sequences of *Agrobacterium tumefaciens* virB operon. *Nucleic Acids Research*, 17(12), 4541-4550.

Davies, P. J. (2010). The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence, and Functions. En P. J. Davies, *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* (págs. Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!). Dordrecht: Springer. doi:doi.org/10.1007/978-1-4020-2686-7_1

De la Riva, G., González-Cabrera, J., Vazquez-Padron, R., & Ayra-Pardo, C. (1998). *Agrobacterium tumefaciens*: A natural tool for plant transformation. *Electronic Journal of Biotechnology*, 1(3), 25-48.

Delgado, S. (2015). *Establecimiento de cultivos celulares de Nicotiana tabacum L.* Recuperado el 12 de Julio de 2020, de RepositorioTEC: <https://repositoriotec.tec.ac.cr/handle/2238/6417>

Dey, P. M., & Harborne, J. B. (1997). *Plant Biochemistry*. San Diego, California: Academic Press.

Dietz, A., Kutschera, U., & Ray, P. M. (1990). Auxin Enhancement of mRNAs in Epidermis and Internal Tissues of the Pea Stem and Its Significance for Control of Elongation 1. *Plant Physiology*, 93(2), 432-438.

Dodds, J. H., & Roberts, L. W. (1985). *Experiments in Plant Tissue Culture*. New York: Cambridge University Press.

Duan, H. Y., Ding, X. S., Song, J. Y., He, Y. L., & Zhou, Y. Q. (2013). Plant regeneration and Agrobacterium-mediated transformation of *Achyranthes bidentata* using cotton EREBP gene. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56(3), 349-356. doi:10.1590/S1516-89132013000300001

Dürrenberger, F., Cramer, A., Hohn, B., & Koukolíková-Nicola, Z. (1989). Covalently bound VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* protects the T-DNA from exonucleolytic degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(23), 9154-9158.

Dychdala, G. R. (1991). Chlorine and chlorine compounds. En S. S. Block, *Disinfection, sterilization and preservation* (4ta. Edición ed., págs. 3–15). Philadelphia: Lea and Febiger.

Efferth, T. (2019). Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures. *Engineering*, 5(1), 50-59. doi:10.1016/j.eng.2018.11.006

Enjalric, F., Carron, M. P., & Lardet, L. (1988). Contamination of primary cultures in tropical area: The case of *Hevea brasiliensis*. *Acta Horticulturae* 225, 57-66. doi:doi.org/10.17660/ActaHortic.1988.225.6

- Filipecki, M., & Malepszy, S. (2006). Unintended consequences of plant transformation: A molecular insight. *Journal of Applied Genetics*, *47*(4), 277-286. doi:10.1007/BF03194637
- Fisher, D. K., & Guiltinan, M. J. (1995). Rapid, efficient production of homozygous transgenic tobacco plants with *Agrobacterium tumefaciens*: A seed-to-seed protocol. *Plant Molecular Biology Reporter*, *13*(3), 278-289. doi:doi.org/10.1007/BF02670906
- Fitch, M. M., Leong, T. C., He, X., McCafferty, H. R., Zhu, Y. J., Moore, P. H., . . . Atkinson, H. J. (2005). Improved Transformation of Anthurium. *Horticultural Science*, *46*(3), 358–364. doi:doi.org/10.21273/HORTSCI.46.3.358
- Forreiter, C., Kirschner, M., & Nover, L. (1997). Stable Transformation of an Arabidopsis Cell Suspension Culture with Firefly Luciferase Providing a Cellular System for Analysis of Chaperone Activity in vivo. *The Plant cell*, *9*(12), 2171-2181. doi:10.1105/tpc.9.12.2171
- Fraley, R. T., Rogers, S. G., Horsch, R. B., Sanders, P. R., Flick, J. S., Adams, S. P., . . . Woo, S. C. (1983). Expression of bacterial genes in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *80*(15), 4803-4807. doi:10.1073/pnas.80.15.4803
- Fronzes, R., Christie, P. J., & Waksman, G. (2009). The structural biology of type IV secretion systems. *Nature Reviews Microbiology*, *7*(10), 703-714. doi:10.1038/nrmicro2218
- Gamborg, O. L., Miller, R. A., & Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, *50*(1), 151-158. doi:10.1016/0014-4827(68)90403-5

Ganapathi, T. R., Suprasanna, P., Rao, P. S., & Bapat, V. A. (2004). Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)-A model system for tissue culture interventions and genetic engineering. *Indian Journal of Biotechnology*, 3, 171-184.

Garzón, D. F. (2019). Expresión de Tripsina Heteróloga en Suspensiones de Tabaco (*Nicotiana tabacum*) Mediante Nanostraw. *Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE*, 1-89.

Gatz, A., Tomaszewska-Sowa, M., & Figas, A. (2017). Changes accompanying proliferative capacity and morphology of *Nicotiana tabacum* L. callus in response to 2,4-D. *Acta Agrobotanica*, 70(4). doi:10.5586/aa.1725

Gelvin, S. B. (2000). *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51, 223-256. doi:10.1146/annurev.arplant.51.1.223

Gelvin, S. B. (2003). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 67(1), 16-37. doi:10.1128/mnbr.67.1.16-37.2003

George, E., Hall, M., & De Klerk, G.-J. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture* (3rd. ed., Vol. 1). Netherlands: Springer.

Gerstel, D. U. (1961). Essay on the origin of tobacco. *Tobacco Science*, 15, 19-22.

Ghag, S. B., Adki, V. S., Ganapathi, T. R., & Bapat, V. A. (2016). Heterologous protein production in plant systems. *GM Crops & Food*. doi:10.1080/21645698.2016.1244599

Gómez , L. Y., Gómez , S., & Núñez , V. (2018). Estandarización de protocolos de transformación genética en *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens* para la generación de una colección de constructos génicos. *Ciencia en Desarrollo*, 9(2), 9-16.

Gonçalves , I., Machado, C. R., Carvalho de Castro, T., Garcia , M., & Albarello, N. (2015). Compact callus cultures and evaluation of the antioxidant activity of *Hovenia dulcis* Thunb. (Rhamnaceae) under in vivo and in vitro culture conditions. *Journal of Medicinal Plants Research*, 9(1), 2015. doi:10.5897/JMPR2014.5622

Goodspeed, T. H. (1964). *The genus Nicotiana: origins, relationships, and evolution of its species in the light of their distribution, morphology, and cytogenetics*. Waltham Massachusetts: Chronica Botanica .

Goodwin , J., Pastori , G., Davey , M., & Jones, H. (2005). Selectable markers: antibiotic and herbicide resistance. *Methods in Molecular Biology*, 191-202.

Goren, R., Altman, A., & Giladi, I. (1979). Role of Ethylene in Abscisic Acid-induced Callus Formation in Citrus Bud Cultures. *Plant Physiology*, 63(2), 280-282. doi:10.1104/pp.63.2.280

Grijalva , K. J. (2018). *Determinación de condiciones óptimas para el cultivo in vitro de Nicotiana tabacum con miras al desarrollo de un prototipo de sistema de inmersión temporal [Tesis de pregrado]*. UDLA, Quito.

Gubiš, J., Vaňková, R., Červená, V., Dragúňová, M., Hudcovicová, M., Lichtnerová, H., . . . Jureková, Z. (2007). Transformed tobacco plants with increased tolerance to drought. *South African Journal of Botany*, 73(4), 505-511. doi:10.1016/j.sajb.2007.03.011

Hague, J. (2015). *How can I confirm Agrobacterium (GV3101) transformation?* Retrieved Julio 07, 2020, from ResearchGate: https://www.researchgate.net/post/How_can_I_confirm_Agrobacterium_GV3101_transformation/5536a845d11b8b7b6a8b45bf/citation/download.

Hamilton, C. M., Frary, A., Lewis, C., & Tanksley, S. D. (1996). Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(18), 9975-9979.

Han, K. H., Meilan, R., Ma, C., & Strauss, S. H. (2000). An *Agrobacterium tumefaciens* transformation protocol effective on a variety of cottonwood hybrids (genus *Populus*). *Plant Cell Reports*, 19(3), 315-320. doi:10.1007/s002990050019

Hansen, G., & Wright, M. (1999). Recent advances in the transformation of plants. *Trends in Plant Science*, 4(6), 226-231. doi:10.1016/S1360-1385(99)01412-0

Hawkins, E. (2017). *What is plant transformation?* Recuperado el 15 de Mayo de 2020, de John Innes Centre: <https://www.jic.ac.uk/blog/what-is-plant-transformation/>

He, Z., Chen, L., Yao, W., & Dai, J. (2008). Recent Progress in Cucumber (*Cucumis sativus*) Transformation. *Recent Progress in Cucumber (Cucumis sativus) Transformation*, 2, 39-44.

Heidari Japelaghi, R., Haddad, R., Valizadeh, M., Dorani Uliiaie, E., & Jalali Javaran, M. (2018). High-Efficiency *Agrobacterium*-Mediated Transformation of Tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Journal of Plant Molecular Breeding*, 6(2), 38-50. doi:10.22058/jpmb.2019.92266.1170

Helgeson, J. (1979). Tissue and cell-suspension culture. En R. D. Durbin , *In Nicotiana: Procedures for Experimental* (págs. 52-58). Washington : U.S. Department of Agriculture.

Hellens, R., Mullineaux, P., & Klee, H. (2000). Technical Focus:A guide to Agrobacterium binary Ti vectors. *Trends in Plant Science*, 5(10), 446-451. doi:10.1016/S1360-1385(00)01740-4

Hellwig, S., Drossard, J., Twyman, R. M., & Fischer, R. (2004). Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nature Biotechnology*, 22(11), 1415-1422. doi:10.1038/nbt1027

Helmer, G., Casadaban, M., Bevan, M., Kayers, L., & Chilton, M. D. (1984). A new chimeric gene as a marker for plant transformation: the expression of Escherichia Coli - galactosidase in sunflower and tobacco cells. *Biotechnology*, 2, 520-527.

Herrera-Estrella, L., Block, M. D., Messens, E., Hernalsteens, J. P., Montagu, M. V., & Schell, J. (1983). Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. *The EMBO journal*, 2(6), 987-995.

Herrera-Estrella, L., Simpson, J., & Martínez-Trujillo, M. (2004). Transgenic Plants: An Historical Perspective. En L. Peña, *Transgenic Plants: Methods and Protocols* (págs. 3-31). Totowa: Humana Press. doi:10.1385/1-59259-827-7:003

Hershfield, V., Boyer, H. W., Yanofsky, C., Lovett, M. A., & Helinski, D. R. (1974). Plasmid ColEI as a molecular vehicle for cloning and amplification of DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71(9), 3455-3459. doi:10.1073/pnas.71.9.3455

Higa de Landoni, J. (1990). *Nicotiana tabacum* L. Recuperado el 04 de Noviembre de 2019, de <http://www.inchem.org/documents/pims/plant/nicotab.htm>

Higo, K., & Higo, H. (1996). Cloning and characterization of the rice CatA catalase gene, a homologue of the maize Cat3 gene. *Plant Molecular Biology*, 30(3), 505-521. doi:10.1007/BF00049328

Hill, J. (2019). *Plant Biotechnology: Experiments and Techniques*. United Kingdom: ED-Tech Press.

Hille, J., Van Kan, J., Klasen, I., & Schilperoort, R. (1983). Site-directed mutagenesis in *Escherichia coli* of a stable R772::Ti cointegrate plasmid from *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*, 154(2), 693-701.

Hirst, K. (2019). *How Long Have Ancient Americans Been Using Tobacco?* Recuperado el Noviembre de 04 de 2019, de <https://www.thoughtco.com/tobacco-history-origins-and-domestication-173038>

Hoekema, A., Hirsch, P. R., Hooykaas, P. J., & Schilperoort, R. A. (1983). A binary plant vector strategy based on separation of vir-and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature*, 179-180. doi:10.1038/303179a0

Hooykaas, P. J., & Schilperoort, R. A. (1992). *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Molecular Biology*, 19(1), 15-38. doi:10.1007/BF00015604

Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffmann, N. L., Eichholtz, D., Rogers, S. G., & Fraley, R. T. (1985). A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 227(4691), 1229-1231. doi:10.1126/science.227.4691.1229

Hosein, F. N., Lennon, A. M., & Umaharan, P. (2012). Optimization of an Agrobacterium-mediated Transient Assay for Gene Expression Studies in *Anthurium andraeanum*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 137(4), 263-272. doi:10.21273/JASHS.137.4.263

Hraška, M., Rakouský, S., & Čurn, V. (2006). Green fluorescent protein as a vital marker for non-destructive detection of transformation events in transgenic plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86(3), 303-318. doi:10.1007/s11240-006-9131-1

Husin, M. A., Hasan, M., & Taha, R. M. (2005). Callus Induction from Tobacco (*Nicotiana tabacum*) Leaf Explants for the Production of Quinone. *Developments in Chemical Engineering and Mineral Processing*, 13(5-6), 563-572. doi:10.1002/apj.5500130506

Ikeuchi, M., Sugimoto, K., & Iwase, A. (2013). Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression[OPEN]. *The Plant Cell*, 25(9), 3159-3173. doi:10.1105/tpc.113.116053

Jain , S. K., & Borthakur, S. K. (1986). Solanaceae in Indian Tradition, Folklore, and Medicine. En W. G. D'Arcy, *Solanaceae: Biology and Systematics* (págs. 577-584). New York, USA: Columbia University Press.

Jayaswal, R. K., Veluthambi, K., Gelvin, S. B., & Slightom, J. L. (1987). Double-stranded cleavage of T-DNA and generation of single-stranded T-DNA molecules in *Escherichia coli* by a virD-encoded border-specific endonuclease from *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*, 169(11), 5035-5045. doi:10.1128/jb.169.11.5035-5045.1987

Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., & Bevan, M. W. (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal*, 6, 3901-3907.

Jones, H. D. (2003). GENETIC MODIFICATION | Transformation, General Principles. En B. Thomas, *Encyclopedia of Applied Plant Sciences* (págs. 377-382). Oxford: Elsevier. doi:<https://doi.org/10.1016/B0-12-227050-9/00197-6>

Jorgensen, R., Snyder, C., & Jones, J. (1987). T-DNA is organized predominantly in inverted repeat structures in plants transformed with *Agrobacterium tumefaciens* C58 derivatives. *Molecular and General Genetics*, 207(2), 471-477. doi:10.1007/BF00331617

Jouanin, L., Brasileiro, A. C., Leplé, J. C., Pilate, G., & Cornu, D. (1993). Genetic transformation: a short review of methods and their applications, results and perspectives for forest trees. *Annales des Sciences Forestières*, 50(4), 325-336. doi:10.1051/forest:19930401

Kaeppler, H. F., Somers, D. A., Rines, H. W., & Cockburn, A. F. (1992). Silicon carbide fiber-mediated stable transformation of plant cells. *Theoretical and Applied genetics*, 84, 560-566. doi:10.1007/bf00224152

Kalia, A. (2018). Nanotechnology in Bioengineering: Transmogrifying Plant Biotechnology. En D. Barh, & V. Azevedo, *Omics Technologies and Bio-Engineering* (págs. 211-229). Academic Press. doi:doi.org/10.1016/B978-0-12-815870-8.00012-7

Kato, K., Matsumoto, T., Koiwai, A., Mizusaki, S., Nishida, K., Noguchi, M., & Tamaki, E. (1972). Liquid. In G. Terui, *Fermentation Technology Today* (pp. 689-695). Kyoto.

Keshavareddy, G., Kumar, A., & Ramu, S. V. (2018). Methods of Plant Transformation- A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7, 2656-2668. doi:10.20546/ijcmas.2018.707.312

Kirchhoff, J., Raven, N., Boes, A., Roberts, J. L., Russell, S., Treffenfeldt, W., . . . Schillberg, S. (2012). Monoclonal tobacco cell lines with enhanced recombinant protein yields can be generated from heterogeneous cell suspension cultures by flow sorting. *Plant Biotechnology Journal*, *10*(8), 936-944. doi:10.1111/j.1467-7652.2012.00722.x

Klee, H., Horsch, R., & Rogers, S. (1987). Agrobacterium-Mediated Plant Transformation and its Further Applications to Plant Biology. *Annual Review of Plant Physiology*, *38*(1), 467-486. doi:10.1146/annurev.pp.38.060187.002343

Ko, T.-S., & Korban, S. S. (2004). Enhancing the frequency of somatic embryogenesis following Agrobacterium-mediated transformation of immature cotyledons of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill.]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, *40*(6), 552-558. doi:10.1079/IVP2004566

Kohli, A., Gahakwa, D., Vain, P., Laurie, D., & Christou, P. (1999). Transgene expression in rice engineered through particle bombardment: molecular factors controlling stable expression and transgene silencing. *Planta*, *208*(1), 88-97. doi:10.1007/s004250050538

Komari, T. (1989). Transformation of callus cultures of nine plant species mediated by agrobacterium. *Plant Science*, *60*(2), 223-229. doi:10.1016/0168-9452(89)90170-2

Komari, T., & Kubo, T. (1999). Methods of Genetic Transformation: Agrobacterium tumefaciens. In I. Vasil, *Molecular improvement of cereal crops* (pp. 43-82). Dordrecht: Springer Netherlands. doi:10.1007/978-94-011-4802-3_4

Komari, T., Takakura, Y., Ueki, J., Kato, N., Ishida, Y., & Yuji, Y. (2006). Binary vectors and super-binary vectors. *Methods in Molecular Biology*, *343*, 15-41. doi:10.1385/1-59745-130-4:15

Komatsu, A., Ohtake, M., Hasegawa, H., Terakawa, T., & Wakasa, K. (2006). Transgenic rice for animal feed with high tryptophan content generated by a selectable marker- and vector backbone-free technology. *Plant Biotechnology*, 23(1), 39-46. doi:10.5511/plantbiotechnology.23.39

Komori, T., Imayama, T., Kato, N., Ishida, Y., Ueki, J., & Komari, T. (2007). Current Status of Binary Vectors and Superbinary Vectors. *Plant Physiology*, 145(4), 1155-1160. doi:10.1104/pp.107.105734

Koncz, C., & Schell, J. (1992). Exploitation of *Agrobacterium tumefaciens*. In S. Brody, D. Cove, & S. Ottolenghi, *Development: The Molecular Genetic Approach* (pp. 217-224). Berlin: Springer. doi:https://doi.org/10.1007/978-3-642-77043-2_16

Koob, G. F., Arends, M. A., & Le Moal, M. (2014). Chapter 7 - Nicotine. En *Drugs, Addiction, and the Brain* (págs. 221-259). San Diego: Academic Press. doi:10.1016/B978-0-12-386937-1.00007-6

Kose, E., & Koç, N. K. (2003). *Agrobacterium*-Mediated Transformation of Cucumber (*Cucumis Sativus* L.) and Plant Regeneration. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 17(2), 56-62. doi:10.1080/13102818.2003.10817059

Kumar, S. (2015). *Callus Tissue: Morphology, Internal Structure and Characteristics (With Diagram)*. Recuperado el 09 de Junio de 2020, de Biology Discussion: <https://www.biologydiscussion.com/plant-tissues/callus-tissue/callus-tissue-morphology-internal-structure-and-characteristics-with-diagram/14591#:~:text=Morphology%3A,to%20describe%20its%20external%20morphology.&text=On%20that%20basis%2C%20even%20callus,s>

Kumar, M. (2014). *How can I confirm Agrobacterium (GV3101) transformation?* Recuperado el 07 de Julio de 2020, de ResearchGate: https://www.researchgate.net/post/How_can_I_confirm_Agrobacterium_GV3101_transformation

Kumar, S. (2015). *Biology Discussion*. Recuperado el 05 de Enero de 2020, de Cell Suspension Culture: Definition, Principle, Protocol and Importance | Plant Tissue: <http://www.biologydiscussion.com/plant-tissues/cell-suspension-culture/cell-suspension-culture-definition-principle-protocol-and-importance-plant-tissue/14601>

Kuta, D. D., & Tripathi, L. (2005). Agrobacterium-induced hypersensitive necrotic reaction in plant cells: a resistance response against *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *African Journal of Biotechnology*, 4(8), 752-757. doi:10.4314/ajb.v4i8.15199

Kutty, P. C., Parveez, G. K., & Huyop, F. Z. (2010). An easy method for agrobacterium tumefaciens-mediated gene transfer to nicotiana tabacum cv. TAPM26. *Journal of Biological Sciences*, 10(6), 480-489. doi:dx.doi.org/10.3923/jbs.2010.480.489

Kutty, P. C., Parveez, G. K., & Huyop, F. Z. (2011). Agrobacterium tumefaciens-infection strategies for greater transgenic recovery in nicotiana tabacum cv. TAPM26. *International Journal of Agricultural Research*, 6(2), 119-133. doi:dx.doi.org/10.3923/ijar.2011.119.133

Lacroix, B., Li, J., Tzfira, T., & Citovsky, V. (2006). Will you let me use your nucleus? How Agrobacterium gets its T-DNA expressed in the host plant cell. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 84, 333-45. doi:10.1139/y05-108

Lazzeri, P. A., Brettschneider, R., Lührs, R., & Lörz, H. (1991). Stable transformation of barley via PEG-induced direct DNA uptake into protoplasts. *Theoretical and Applied Genetics*, *81*(4), 437-444. doi:10.1007/BF00219433

Lee, C.-Y., Agrawal, D., Wang, C.-S., Yu, S.-M., Chen, J., & Tsay, H.-S. (2008). T-DNA Activation Tagging as a Tool to Isolate *Salvia miltiorrhiza* Transgenic Lines for Higher Yields of Tanshinones. *Planta medica*, *74*(7), 780-786. doi:10.1055/s-2008-1074527

Lee, L. Y., & Gelvin, S. B. (2008). T-DNA Binary Vectors and Systems. *Plant Physiology*, *146*(2), 325-332. doi:10.1104/pp.107.113001

Lewis, R., & Nicholson, J. (2007). Aspects of the evolution of *Nicotiana tabacum* L. and the status of the United States *Nicotiana* Germplasm Collection. *Genetic Resources and Crop Evolution*, *54*, 727-740. doi:10.1007/s10722-006-0024-2

Li, S., Cong, Y., Liu, Y., Wang, T., Shuai, Q., Chen, N., . . . Li, Y. (2017). Optimization of Agrobacterium-Mediated Transformation in Soybean. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 246. doi:10.3389/fpls.2017.00246

Li, Y., Li, S., Dong, Y., Zhang, Y., Fu, C., & Yu, L. (2012). Stable transformation of suspension-cultured *Glycyrrhiza inflata* batalin cells with *Agrobacterium tumefaciens*. *Zeitschrift Fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, *67*(11-12), 603-610. doi:10.1515/znc-2012-11-1211

López, E., Proaño, K., Jadán, M., & Mihai, R. (2015). Callus tissue induction and analysis of GUS reporter gene expression in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) transformed with *Agrobacterium tumefaciens*. *Romanian Biotechnological Letters*, *20*(2), 10205-10211.

Lörz, H., Paszkowski, J., Dierks-Ventling, C., & Potrykus, I. (1981). Isolation and characterization of cytoplasts and miniprotoplasts derived from protoplasts of cultured cells. *Physiologia Plantarum*, 53(3), 385-391. doi:10.1111/j.1399-3054.1981.tb04517.x

Loyola-Vargas, V. M., De-La-Peña, C., Galaz-Ávalos, R. M., & Quiroz-Figueroa, F. R. (2008). Plant tissue culture. En J. M. Walter, & R. Rapley, *Molecular Biotechnology Handbook* (págs. 875-904). Totowa: Humana Press. doi:10.1007/978-1-60327-375-6_50

Magdum, S. (2013). Effect of Agrobacterium Induced Necrosis, Antibiotic Induced Phytotoxicity and Other Factors in Successful Plant Transformation. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 9, 98-112.

Magnuson, N. S., Linzmaier, P. M., Reeves, R., An, G., HayGlass, K., & Lee, J. M. (1998). Secretion of biologically active human interleukin-2 and interleukin-4 from genetically modified tobacco cells in suspension culture. *Protein Expression and Purification*, 13(1), 45-52. doi:10.1006/prep.1998.0872

Mayo, K. J., Gonzales, B. J., & Mason, H. S. (2006). Genetic transformation of tobacco NT1 cells with *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Protocols*, 1(3). doi:10.1038/nprot.2006.176

Medina, R., & González, X. (2004). *Organogénesis directa in vitro [Tesis de pregrado]*. Zamorano, Honduras.

Mehrotra, S., & Goyal, V. (2016). Agrobacterium-Mediated Alien Gene Transfer Biofabricates Designer Plants. In R. R. Watson, & V. R. Preedy, *Genetically Modified Organisms in Food* (pp. 63-73). San Diego: Academic Press.

Méndez-Muñoz, L., Campos-Delgado, S., Obando-Coronado, M., & Garro-Monge, G. (2019). Establecimiento de un protocolo de transformación transitoria y estable de *Nicotiana tabacum* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. *Revista Tecnología en Marcha*, 32(1), 77-91. doi:10.18845/tm.v32i1.4120

Mersereau, M., Pazour, G. J., & Das, A. (1990). Efficient transformation of *Agrobacterium tumefaciens* by electroporation. *Gene*, 90(1), 149-151. doi:10.1016/0378-1119(90)90452-w

Molina, J. (2015). *Análisis funcional del gen candidato de avirulencia(SIX8) del hongo Fusarium oxysporum en Nicotiana benthamiana median el vector PGR106*. Sangolquí: ESPE.

Mondal, M., & Kundu, S. (2017). An efficient regeneration system for the genetic transformation of *Nicotiana tabacum* L . cv . Petit Havana SR 1 without Auxine and optimization of Hygromycin concentration for selection. *International Journal of Sciences & Applied Research*, 4(8), 1-10.

Mozo, T., & Hooykaas, P. (1992). Design of a novel system for the construction of vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Molecular and General Genetics*, 236(1), 1-7. doi:10.1007/BF00279636

Mubeen, H., Naqvi, R., Masood, A., Shoaib, M., & Raza, S. (2016). Gene transformation: Methods, Uses and Applications. *Pharmaceutical and Biological Sciences*, 4(2).

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

Murphy, D. J. (2004). Overview of Applications of Plant Biotechnology. En P. Christou, & K. Klee, *Handbook of Plant Biotechnology*. Wiley.

Nagata, T., & Kumagai, F. (1999). Plant cell biology through the window of the highly synchronized tobacco BY-2 cell line. *Methods in Cell Science*, 21(2), 123-127. doi:10.1023/A:1009832822096

Nanasato, Y., Konagaya, K.-i., Okuzaki, A., Tsuda, M., & Tabei, Y. (2013). Improvement of Agrobacterium-mediated transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) by combination of vacuum infiltration and co-cultivation on filter paper wicks. *Plant Biotechnology Reports*, 7(3), 267-276.

Narusaka, Y., Narusaka, S., & Iwabuchi, M. (2012). Methods to Transfer Foreign Genes to Plants. *Transgenic Plants - Advances and Limitations*. doi:10.5772/32773

NCBI. (2020). *Nicotiana tabacum*. Recuperado el 14 de Abril de 2020, de National Center for Biotechnology Information: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=4097>

Negash, A., Puite, K., Schaart, J., Visser, B., & Krens, F. (2000). In vitro regeneration and micro-propagation of enset from Southwestern Ethiopia. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 62(2), 153-158. doi:10.1023/A:1026701419739

Nester, E. W., Gordon, M. P., Amasino, R. M., & Yanofsky, M. F. (1984). Crown Gall: A Molecular and Physiological Analysis. *Annual Review of Plant Physiology*, 35(1), 387-413. doi:10.1146/annurev.pp.35.060184.002131

Niedz, R. P., & Bausher, M. G. (2002). Control of In vitro contamination of explants from greenhouse- and field-grown trees. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 38(5), 468-471. doi:10.1079/IVP2002316

Nocarova, E., & Fischer, L. (2009). Cloning of transgenic tobacco BY-2 cells; an efficient method to analyse and reduce high natural heterogeneity of transgene expression. *BMC Plant Biology*, 9, 44. doi:10.1186/1471-2229-9-44

Ogita, S. (2015). Plant cell, tissue and organ culture: the most flexible foundations for plant metabolic engineering applications. *Natural Product Communications*, 10(5), 815-820.

Ow, D. W., Wet, J. R., Helinski, D. R., Howell, S. H., Wood, K. V., & Deluca, M. (1986). Transient and Stable Expression of the Firefly Luciferase Gene in Plant Cells and Transgenic Plants. *Science*, 234(4778), 856-859. doi:10.1126/science.234.4778.856

Păcurar, D. I., Thordal-Christensen, H., Păcurar, M. L., Pamfil, D., Botez, C., & Bellini, C. (2011). *Agrobacterium tumefaciens*: From crown gall tumors to genetic transformation. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 76(2), 76-81. doi:10.1016/j.pmpp.2011.06.004

Paramesh, H., Fakrudin, B., & Kuruvinashetti, M. (2010). Genetic transformation of a local variety of tomato using gus gene: an efficient genetic transformation protocol for tomato. *International Journal of Agricultural Technology*, 6, 87-97.

Pathi, K. M., Tula, S., & Tuteja, N. (2013). High frequency regeneration via direct somatic embryogenesis and efficient *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of tobacco. *Plant Signaling & Behavior*, 8(6). doi:10.4161/psb.24354

Pazour, G. J., & Das, A. (1990). Characterization of the VirG binding site of *Agrobacterium tumefaciens*. *Nucleic Acids Research*, 18(23), 6909-6913.

Perl, A., Lotan, O., Abu-Abied, M., & Holland, D. (1996). Establishment of an *Agrobacterium*-mediated transformation system for grape (*Vitis vinifera* L.): the role of antioxidants during grape-*Agrobacterium* interactions. *Nature Biotechnology*, 624-628. doi:10.1038/nbt0596-624

Persson, S., Wyatt, S. E., Love, J., Thompson, W. F., Robertson, D., & Boss, W. F. (2001). The Ca(2+) status of the endoplasmic reticulum is altered by induction of calreticulin expression in transgenic plants. *Plant Physiology*, 126(3), 1092-1104. doi:10.1104/pp.126.3.1092

Phillips, G. C., Hubstenberger, J. F., & Hansen, E. E. (1995). Plant Regeneration by Organogenesis from Callus and Cell Suspension Cultures. En O. L. Gamborg, & G. C. Phillips, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture: Fundamental Methods* (págs. 67-79). Berlin: Springer. doi:doi.org/10.1007/978-3-642-79048-5_6

Potrykus, I. (1991). Gene transfer to plants: assessment of published approaches and results. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 205-225.

Rakoczy-Trojanowska. (2002). Alternative methods of plant transformation-a short review. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 7(3), 849-858.

Ravindra, B., Teixeira da Silva, J., & Nataraja, K. (2008). Green Fluorescent Protein in the Genetic Transformation of Plants. *Transgenic Plant Journal*, 2, 86-109.

Rayle, D. L., Ross, C. W., & Robinson, N. (1982). Estimation of Osmotic Parameters Accompanying Zeatin-Induced Growth of Detached Cucumber Cotyledons. *Plant Physiology*, 70(6), 1634-1636.

Rivera, A. L., Gómez-Lim, M., Fernández, F., & Loske, A. M. (2012). Physical methods for genetic plant transformation. *Physics of Life Reviews*, 9(3), 308-345. doi:10.1016/j.plrev.2012.06.002

Rosales-Mendoza, S., Paz-Maldonado, L. M., & Soria-Guerra, R. E. (2012). Chlamydomonas reinhardtii as a viable platform for the production of recombinant proteins: current status and perspectives. *Plant Cell Reports*, 31(3), 479-494. doi:10.1007/s00299-011-1186-8

Rossi, L., Hohn, B., & Tinland, B. (1996). Integration of complete transferred DNA units is dependent on the activity of virulence E2 protein of Agrobacterium tumefaciens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(1), 126-130.

Rubi, J. A. (1999). *Transformación biobalística de cultivares Indica y Japónica de Oryza sativa L. Selección en higromicina y expresión estable del inhibidor de tripsina de cebada BTI-Cme (Gen Itr1) [Tesis de doctorado]*. Universidad Politécnica de Madrid, España.

Sahoo, D., Dey, N., & Maiti, I. (2014). pSiM24 is a novel versatile gene expression vector for transient assays as well as stable expression of foreign genes in plants. *PloS One*, 9(6). doi:10.1371/journal.pone.0098988

Salazar, E., & Romero, C. (1996). Cultivo in vitro de segmentos de hojas de ajonjolí (*Sesamum indicum* L.). *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)*, 13(3), 293-302.

Sambrook, & Russell. (2001). *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring: Laboratory Press.

Sánchez, J. U. (2014). *Evaluación de la interacción entre los principales factores que afectan la transformación de callo de crisantemo por medio de Agrobacterium (Tesis de Maestría)*. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C, Mérida.

Sangwan, R., Ochatt, S., Nava, J. E., & Sangwan, B. (2012). T-DNA insertion mutagenesis. *Plant Mutation Breeding and Biotechnology*.

Santner, A., Calderon-Villalobos, L. I., & Estelle, M. (2009). Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature Chemical Biology*, 5(5), 301-307. doi:10.1038/nchembio.165

Sarkar, A. (2009). *Plant Stem Cells*. India: Discovery Publishing House.

Shen, W. J., & Forde, B. G. (1989). Efficient transformation of *Agrobacterium* spp. by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research*, 17(20), 8385.

Shumin, Z., Yanxia, C., Bang, Z., & Wei, Z. (2014). Optimization of BY2 cell suspension as a stable transformable system. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 42(2), 472-477. doi:10.15835/nbha4229523

Siari, C. (2012). Genes marcadores. *Apuntes de Fisiología Vegetal*. Recuperado el 2 de Enero de 2019, de <http://fisiolvegetal.blogspot.com/2012/12/genes-marcadores.html>

Sigma-Aldrich. (2020). *Growth Regulators – Plant Tissue Culture Protocol*. Recuperado el 05 de Enero de 2020, de Sigma-Aldrich: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/growth-regulators.html>

Silva, R. G., Coppede, J. S., Silva, J. O., & Zingaretti, S. M. (2018). Efficient method for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of tobacco nodal segments. *Genetics And Molecular Research*, 17(4), 6. doi:10.4238/gmr18072

Skoog, F., & Miller, C. O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 11, 118-130.

Smith, R. H. (2013). *Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments* (3ra. Edición ed.). San Diego: Academic Press.

Sommergruber, K., Barta, A., Thompson, D., Hartmuth, K., Matzke, M. A., & Matzke, A. J. (1986). The expression of a nopaline synthase - human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant Molecular Biology*, 6(5), 347-357. doi:10.1007/BF00034942

Spurr, H. W., & Welty, R. E. (1975). Characterization of Endophytic Fungi in Healthy Leaves of *Nicotiana* spp. *Phytophatology*, 65, 2614-2621.

Sreeramanan, S., Maziah, M., Abdullah, M. P., Meon, S., Xavier, R., & Nor'Aini, M. F. (2005). Physical and Biological Parameters Affecting Transient GUS and GFP Expression in Banana via Particle Bombardment. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 13(1), 35-57.

Stolarz, A., Macewicz, J., & Lörz, H. (1991). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Plant Physiology*, 137(3), 347-357. doi:10.1016/S0176-1617(11)80144-6

Su, W. W., & Lee, K.-T. (2007). Plant Cell and Hairy Root Cultures – Process Characteristics, Products, and Applications. En S.-T. Yang, *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources* (págs. 263-292). Amsterdam: Elsevier. doi:doi.org/10.1016/B978-044452114-9/50011-6

Sun, Q., Zhao, Y., Sun, H., Hammond, R. W., Davis, R. E., & Xin, L. (2011). High-efficiency and stable genetic transformation of pear (*Pyrus communis* L.) leaf segments and regeneration of transgenic plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(2), 383-390. doi:10.1007/s11738-010-0557-z

Sundaresan, G., & Gambhir, S. S. (2002). Radionuclide Imaging of Reporter Gene Expression. En A. Toga, & J. Mazziotta, *Brain Mapping: The Methods* (págs. 799-818). San Diego: Academic Press. doi:10.1016/B978-012693019-1/50031-9

Sutcliffe, J. (1978). Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 75(8), 3737–3741.

Tomaszewska-Sowa, M., Figas, A., Keutgen, N., & Keutgen, A. J. (2016). Establishing an efficient explant superficial sterilization protocol for in vitro micropropagation of bear's garlic (*Allium ursinum* L.). *Herba Polonica*, 61(4), 66-77. doi:doi.org/10.1515/hepo-2015-0032

TRAMIL. (2017). *Nicotiana tabacum*. Recuperado el 06 de Noviembre de 2019, de TRAMIL: <http://www.tramil.net/en/plant/nicotiana-tabacum>

- Tzfira, T., Li, J., Lacroix, B., & Citovsky, V. (2004). Agrobacterium T-DNA integration: molecules and models. *Trends in genetics*, 20(8), 375-383. doi:10.1016/j.tig.2004.06.004
- Vaghchhipawala, Z., Rojas, C. M., Senthil-Kumar, M., & Mysore, K. S. (2011). Agroinoculation and agroinfiltration: simple tools for complex gene function analyses. *Methods in Molecular Biology*, 678, 65-76. doi:10.1007/978-1-60761-682-5_6
- Van der Krol, A. R., Mol, J. N., & Stuitje, A. R. (1988). Antisense genes in plants: an overview. *Gene*, 72(1-2), 45-50. doi:10.1016/0378-1119(88)90126-6
- Van, L. H. (2011). *Tobacco (Nicotiana tabacum) Habitat*. Recuperado el 01 de Noviembre de 2019, de http://bioweb.uwlax.edu/bio203/2011/vanhoof_loga/habitat.htm
- Vasil, I. K. (1984). *Laboratory Procedures and Their Applications*. Orlando, Florida: Academic Press.
- Veluthambi, K., Gupta, A., & Sharma, A. (2003). The current status of plant transformation technologies. *Current Science*, 84(3), 368-380.
- Villégier, A. S., Blanc, G., Glowinski, J., & Tassin, J. P. (2003). Transient behavioral sensitization to nicotine becomes long-lasting with monoamine oxidases inhibitors. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 76(2), 267-274. doi:10.1016/s0091-3057(03)00223-5
- Waldron, C., Murphy, E. B., Roberts, J. L., Gustafson, G. D., Armour, S. L., & Malcolm, S. K. (1985). Resistance to hygromycin B : A new marker for plant transformation studies. *Resistance to hygromycin B : A new marker for plant transformation studies*, 5(2), 103-108. doi:10.1007/BF00020092

Wang , G. L., & Fang, H. J. (1998). *Principles and Techniques of Plant Genetic Engineering*. Beijing: Science Press.

Wang, H. H., Yin, W. B., & Hu, Z. M. (2009). Advances in chloroplast engineering. *Journal of Genetics and Genomics*, 36(7), 387-398. doi:10.1016/s1673-8527(08)60128-9

Wigge, P. (2006). PCR Analysis of Agrobacterium. *Cold Spring Harbor Protocols*, 7. doi:10.1101/pdb.prot4667

Wuest, D. M., Hou, S., & Lee, K. (2011). 3.52 - Metabolic Engineering. En M. Moo-Young, *Comprehensive Biotechnology* (2da. Edición ed., págs. 617-628). Burlington: Academic Press. doi:doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00229-4

Xing, Y., Yang, Q., Ji, Q., Luo, Y., Zhang, Y., Gu, K., & Wang, D. (2010). Optimization of Agrobacterium-mediated transformation parameters for sweet potato embryogenic callus using β -glucuronidase (GUS) as a reporter. *African Journal of biotechnology*, 6(22), 2578-2584. doi: 10.5897/AJB2007.000-2411

Xu, J., Dolan, M. C., Medrano, G., Cramer, C. L., & Weathers, P. J. (2012). Green factory: plants as bioproduction platforms for recombinant proteins. *Biotechnology Advances*, 30(5), 1171-1184. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.020

Yadav, N. S., Vanderleyden, J., Bennett, D. R., Barnes, W. M., & Chilton, M. D. (1982). Short direct repeats flank the T-DNA on a nopaline Ti plasmid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(20), 6322-6326.

Yin, Z., Bartoszewski, G., Szwacka, M., & Malepszy, S. (2005). Cucumber transformation methods—the review. *Biotechnologia*, 1(68), 95-113.

Zambryski, P. (1988). Basic processes underlying *Agrobacterium*-mediated DNA transfer to plant cells. *Annual Review of Genetics*, 22, 1-30. doi:10.1146/annurev.ge.22.120188.000245

Zambryski, P., Joos, H., Genetello, C., Leemans, J., Montagu, M., & Schell, J. (1983). Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *The EMBO Journal*, 2(12), 2143-2150.

Zhao, Q., Jing, J., Wang, G., Wang, J. H., Feng, Y. Y., Xing, H. W., & Guan, C. F. (2010). Optimization in *Agrobacterium*-mediated transformation of *Anthurium andraeanum* using GFP as a reporter. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13(5), 9-10. doi:10.2225/vol13-issue5-fulltext-2

Zimmerman, J. L. (1993). Somatic Embryogenesis: A Model for Early Development in Higher Plants. *The Plant Cell*, 5(10), 1411-1423. doi:10.1105/tpc.5.10.1411

Zinabu, D., Gebre, E., & Shekata, J. (2018). Explants Sterilization Protocol for In-vitro Propagation of Elite Enset (*Ensete ventricosum* (Welw.) Chessman) Cultivars. *sian Journal of Plant Science and Research*, 8(4), 1-7.

Capítulo 8: Anexos