

## 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 empleado 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 callo 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<sub>600nm</sub> = 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<sub>600nm</sub> = 0.8) with plasmid pSiM24-eGFP.

### KEYWORDS:

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