

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL
Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la
Producción

“Estandarización del protocolo de transformación genética de células embriogénicas de banano de la variedad ‘Williams’ (AAA) mediada por *Agrobacterium tumefaciens*”

TESIS DE GRADO

Previo a la obtención del Título de:

INGENIERO AGROPECUARIO

Presentada por:

Luis Eduardo Sánchez Timm

GUAYAQUIL-ECUADOR

Año: 2010

AGRADECIMIENTO

Al personal del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) y a la directora del mismo Esther Peralta Ph.D. por apoyarme en la realización de este trabajo, y especialmente al Ph.D. Efrén Santos director de Tesis, por su invaluable ayuda. Este trabajo se financió a través de la Secretaria Nacional de Ciencia y Tecnología (SENACYT) del Gobierno del Ecuador (proyecto PIC-08-0000300) y a través del Gobierno Flamenco de Bélgica (VLIR-IUS, programa de cooperación VLIR-ESPOL, Ecuador).

DEDICATORIA

A MIS PADRES Y AMIGOS, POR HABER SIDO UN APOYO EN MI FORMACIÓN, Y A MI NOVIA MIRNA A QUIEN DEBO TODA MOTIVACIÓN, Y A MI TÍA ESPERANZA QUE HA SIDO UN SOPORTE MÍO Y DE MI FAMILIA.

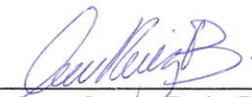
TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



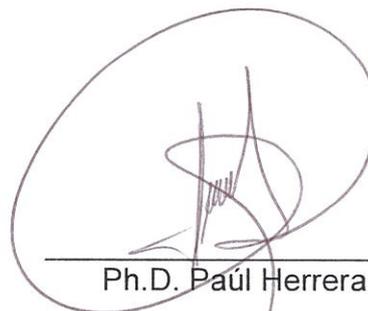
Ing. Francisco Andrade S.
DECANO DE LA FIMCP
PRESIDENTE



Ph.D. Efrén Santos O.
DIRECTOR DE TESIS



Ing. Omar Ruiz B.
VOCAL PRINCIPAL



Ph.D. Paúl Herrera S.
VOCAL ALTERNO

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL.”

(Reglamento de Graduación de la ESPOL).



Luis Eduardo Sánchez Timm

RESUMEN

Ecuador es el primer exportador de banano a nivel mundial, por lo que es indispensable encontrar vías de mejoramiento de variedades comerciales y locales para reducir pérdidas en la producción como las causadas por la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet). Uno de los métodos para la mejora de variedades en banano, es la transformación genética como una alternativa al mejoramiento genético convencional. Un programa de mejora convencional de banano es muy dificultoso debido a los altos niveles de esterilidad, necesidad de cruzamientos interploidales, baja proporción de germinación de semillas y a un largo ciclo de cultivo. La ingeniería genética es una alternativa al mejoramiento convencional y ofrece a los fitomejoradores la oportunidad de superar las limitaciones impuestas por la esterilidad en la mayoría de los cultivares de banano. En el Ecuador, no existen programas de mejoramiento genético en banano usando herramientas de la biotecnología moderna como la transformación genética. Para realizar la implementación de mejora genética de banano mediante la ingeniería genética se deben estandarizar protocolos de transformación. El

objetivo principal de este trabajo fue la estandarización del protocolo de modificación genética en banano mediante el uso del organismo *Agrobacterium tumefaciens*. La transferencia de genes fue realizada a través del co-cultivo de suspensiones de células embriogénicas del cultivar de banano 'Williams' con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105. Los plásmidos usados para la transformación fueron el pCAMBIA1301 (promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor expresando el gen reportero *uidA*^{INT}), el pESKUL1 y el pESKUL7 los cuales contienen distintos promotores de banano que expresan al gen reportero *uidA*^{INT}. El ensayo de expresión temporal en células de banano transformadas genéticamente después de siete días de co-cultivo con *Agrobacterium tumefaciens* mostró que desde 12, 26 y hasta 246 puntos azules se encontraron en las células transformadas con los plásmidos pESKUL1, pESKUL7, y el pCAMBIA1301, respectivamente. La concentración óptima del antibiótico higromicina fue probada para la selección de colonias de células transgénicas. Las concentraciones óptimas de higromicina oscilan entre 12.5 y 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Un protocolo estandarizado para la transformación genética de banano fue desarrollado, formando las bases biotecnológicas para la generación de plantas de banano resistentes a enfermedades por primera vez en el Ecuador.

ÍNDICE GENERAL

	Págs.
RESUMEN.....	VI
ÍNDICE GENERAL.....	VII
ABREVIATURAS.....	X
SIMBOLOGÍA.....	XI
ÍNDICE DE FIGURAS	XII
ÍNDICE DE TABLAS	XIII

INTRODUCCIÓN	1
--------------------	---

CAPÍTULO 1

1. Generalidades.....	5
1.1 Banano 5	
1.1.1 Importancia del banano en el Ecuador	10
1.1.2 Zonas de mayor producción bananera del Ecuador	11
1.1.3 Principales enfermedades que afectan al cultivo	12
1.2 Mejoramiento convencional en banano.....	15
1.2.1 Mejoramiento convencional	15
1.2.2 Bases que afectan al mejoramiento convencional	17
1.2.3 Objetivos y estrategias generales del mejoramiento convencional	19
1.2.4 Principales limitaciones en el mejoramiento convencional de banano y plátano	20

1.3	Mejoramiento mediante transformación genética.....	22
1.3.1	Transformación genética.....	22
1.3.2	Transformación genética mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	23
1.3.3	Transformación por transferencia directa de ADN	24
1.4	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	26
1.4.1	Descubrimiento de transformación genética en plantas mediante <i>A. tumefaciens</i>	26
1.4.2	Genes de virulencia	30
1.4.3	Transferencia e integración del ADN-T al genoma de la célula de la planta	32
1.4.4	Vectores.....	35
1.4.5	Genes reporteros	37

CAPÍTULO 2

2.	Metodología	39
2.1	Diseño Experimental	39
2.2	Material vegetal y condiciones del medio de cultivo.....	40
2.3	Vectores de transformación	41
2.4	Protocolo de transformación	42
2.4.1	Parámetros Probados en la modificación genética de banano	42

2.4.2 Co-cultivo e infección con <i>A. tumefaciens</i>	43
2.4.3 Determinación de la actividad del gen reportero <i>uidA</i> ^{INT}	46
2.4.4 Selección de colonias celulares modificadas genéticamente.....	47
2.4.5 Determinación molecular de líneas modificadas genéticamente de banano.....	48

CAPÍTULO 3

3. Resultados y Discusión	51
3.1 Expresión temporal del gen reportero <i>uidA</i> ^{INT}	51
3.2 Selección de colonias transgénicas estables de células de Banano.....	60
3.3 Determinación molecular de líneas genéticamente modificadas de banano	73

CAPÍTULO 4

4 Conclusiones y Recomendaciones	75
4.1 Conclusiones.....	75
4.2 Recomendaciones	77

APÉNDICES

BIBLIOGRAFÍA

ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético.
ADN	Ácido Desoxirribonucleico.
ADN-T	Ácido Desoxirribonucleico de transferencia.
CIBE	Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador
DBCA	Diseño de Bloques Completamente al Azar.
dNTPs	Desoxirribonucleótido trifosfato.
DSB	Reparación de la ruptura de doble cadena.
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> .
GFP	Proteína Verde Fluorescente.
MS	Murashige y Skoog.
NLS	Señal de localización nuclear bi-partida.
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
PEG	Polyethylene glicol.
Plásmido Ti	Plásmido inductor de tumores.
RD1	Medio MS diluido a la mitad suplementado con 100 mg L ⁻¹ de myo-inositol.
RD2	Medio MS diluido a la mitad suplementado con 1 μM de Benziladenina.
SENACYT	Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología.
SSG	Reparación de brecha de una sola cadena.
T4SS	Secreción del sistema transportador del complejo tipo IV.
<i>uidA</i> ^{INT}	Gen reportero β-Glucuronidasa de <i>E. coli</i> con intrón; Gus.
VIR	Genes de virulencia de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .
X-Gluc	Ácido 5-bromo-4-cloro-3-inolyl-β-D-glucuronico, sal ciclohexilamonio.
YEP	Medio de extracto de levadura y agua de peptona.
YM	Medio de extracto de levadura y manitol.
ZZ	Medio MS diluido a la mitad suplementado con 2, 4-D y 1 μM de zeatina.

SIMBOLOGÍA

ha	Hectárea (Unidad de área)
μ M	micro Molar (Unidad de concentración)
μ m	micro metro (Unidad de medida lineal)
μ L	micro Litro (Unidad volumétrica)
mL	mili Litro (Unidad volumétrica)
pb	pares de bases (Unidad de medida de ADN)
UDO	Unidad de Densidad Óptica (Unidad óptica).
rpm	Revoluciones por minuto.

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 2.1 Representación esquemática de anillamiento en el gen <i>uidA</i> ^{INT}	49
Figura 3.1 Expresión del gen <i>uidA</i> ^{INT} en células embriogénicas de banano variedad 'Williams'	56
Figura 3.2 Análisis fluorométrico en el experimento AT2	59
Figura 3.3 Experimento AT1	61
Figura 3.4 Células fenolizadas en el experimento AT3	63
Figura 3.5 Crecimiento de colonias transgénicas en medio selectivo en el experimento AT4.1	64
Figura 3.6 Crecimiento bacterial en caja con Timentín en experimento AT4.1	66
Figura 3.7 Análisis histoquímico en el experimento AT4.1	68
Figura 3.8 Diagrama de cajas de datos tomados del conteo de colonias sobrevivientes de células embriogénicas putativas transgénicas por tratamiento	72
Figura 3.9 Resultados de PCR de ADN extraído a partir de las células embriogénicas de banano transformadas y su control	74

ÍNDICE DE TABLAS

Págs.

Tabla 1	Expresión temporal del gen <i>uidA</i> ^{INT} en el experimento AT1.....	53
Tabla 2	Expresión del gen <i>uidA</i> ^{INT} en el experimento AT2.....	57
Tabla 3	Resultados del análisis fluorométrico.....	59
Tabla 4	Tabla de prueba del análisis no paramétrico de Kruskal Wallis.	71

ÍNDICE DE APÉNDICES

	Págs.
Apéndice 1 Experimentos pilotos y desarrollo del Diseño experimental.....	79
Apéndice 2 Mapa del vector pCAMBIA1301	82
Apéndice 3 Aislamiento de ADN genómico de células embriogénicas de banano	83
Apéndice 4 Tabla de resultados del análisis fluorométrico.....	85
Apéndice 5 Tabla de resultados del diseño experimental	86
Apéndice 6 Protocolo de transformación genética de células embriogénicas de banano variedad 'Williams' mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	87

INTRODUCCIÓN

Los bananos y plátanos son el cuarto cultivo más importante en los países en vías de desarrollo después del arroz, el trigo y el maíz. El mayor contratiempo en la producción de banano (incluidos de ahora en adelante los plátanos) en el Ecuador es la enfermedad Sigatoka negra, cuyo agente causal es el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet [1]. Aproximadamente entre el 25 y el 30% de la inversión en la producción bananera es requerido para el control de la Sigatoka negra, mayormente a través de fungicidas convencionales. El desarrollo y producción de plantas de banano con resistencia o tolerancia a la Sigatoka negra resultaría en una reducción de la aplicación de los fungicidas para el control de la enfermedad.

Los programas de mejoramiento se enfocan en la generación de plantas con resistencia a estrés biótico o abiótico conduciendo a una mayor producción. Un programa de mejoramiento convencional en banano es dificultoso debido a los altos niveles de esterilidad, necesidad de interploidía, cruzamientos, bajo ratio

de germinación de las semillas y largos ciclos de cultivo [2]. Adicionalmente, un programa de mejoramiento puede proveer unos cuantos híbridos candidatos que pueden ser altamente productivos y resistentes a algunas enfermedades. Sin embargo, otras características pueden perderse, tales como el tiempo de vida del producto o propiedades organolépticas de la pulpa, llevando a una disminución de la demanda del producto en el mercado. La ingeniería genética es una alternativa al mejoramiento convencional y ofrece a los fitomejoradores la oportunidad para superar las limitaciones impuestas por la esterilidad de la mayoría de los cultivares de banano. La transformación genética supera la esterilidad de la mayoría de los cultivos de banano usando suspensiones de células embriogénicas de banano. Dos métodos de transformación genética han sido desarrollados y establecidos en plantas, los cuales incluyen el bombardeo de partículas y la transformación mediada por *Agrobacterium* [2]. La última metodología es la más usada debido al bajo número de copias de genes integrados en el genoma de la planta. A través de la transformación genética, es posible insertar solo los genes necesarios para obtener ciertas características como la resistencia a enfermedades, mientras que las características organolépticas o de post-cosecha pueden ser mantenidas tales como en el cultivar original.

El mejoramiento convencional no es posible en el subgrupo Cavendish debido al alto nivel de esterilidad del gameto femenino [3], incluyendo 'Williams' (genotipo AAA), el cual es una de las variedades de banano más cultivadas en el Ecuador. Por lo tanto, el uso de técnicas de transformación genética tiene el potencial para ser una metodología de importancia para el mejoramiento de banano en el Ecuador. Una de las mayores ventajas de la transformación genética es que los genes integrados en el genoma del banano serán confinados evitando la dispersión de los transgenes al ambiente o cruzamiento con otras especies nativas de banano debido a la esterilidad.

Muchos esfuerzos están enfocados en la generación de bananos cisgénicos (la generación de una planta modificada genéticamente mediante la introducción de genes, con sus promotores originales, de una planta compatible de cruzamiento o de la misma se puede denominar como cisgénica y no transgénica) [4]. Estos bananos cisgénicos (i) deben conducir a una mejor percepción pública, (ii) evitarían el uso de promotores y secuencias regulatorias que son empleadas intensivamente en la generación de plantas transgénicas y pueden ser restringidas por patentes, y (iii) conducirían a una mejor estabilidad y funcionamiento de las secuencias insertadas. Recientemente promotores aislados de banano, fueron identificados en el cultivar de banano 'Three Hand Planty' [5, 6] y podrían ser usados para la generación de bananos modificados

genéticamente. Por lo tanto, la implementación y caracterización de promotores de banano recientemente aislados será una innovación en la generación de bananos genéticamente modificados.

La siguiente investigación fue orientada a la validación de la siguiente hipótesis:

La modificación genética en banano es viable mediante el co-cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* con suspensiones celulares embriogénicas de la variedad de banano 'Williams' obteniendo colonias celulares de banano transgénicas.

El objetivo general de este estudio es el siguiente:

1. Estandarizar el protocolo de transformación genética de células embriogénicas de banano de la variedad 'Williams' (grupo genómico AAA) mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

Los Objetivos específicos son los siguientes:

1. Transferir genes a banano a través del co-cultivo de suspensiones de células embriogénicas con *Agrobacterium tumefaciens*.
2. Obtener líneas transgénicas estables.

CAPÍTULO 1

1. GENERALIDADES

1.1 Banano

El banano es uno de los más importantes, pero no muy valorado, cultivo alimenticio en el mundo. Se cultiva en más de 120 países [7], principalmente en trópicos y sub-trópicos, y provee sustento a millones de personas.

El banano es un cultivo perenne muy atractivo en agricultores de países en desarrollo. La fruta puede producir todo el año, y además provee una entrada de dinero o alimento nutritivo.

Musa acuminata (genotipo A) y *Musa balbisiana* (genotipo B) de la familia Musaceae, posee diferentes variedades y diferentes combinaciones de sus genotipos de acuerdo a su nivel de ploidía que incluyen los diploides (AA), triploides (AAA, AAB, ABB) y tetraploides (AAAA, AAAB, AABB) entre los mas cultivables. Los cultivares comestibles poseen nombres comunes como banano, banana, plátano nuevo, guineo. Planta estolonífera, perenne, tiene raíces adventicias y fibrosas. Su pseudotallo mide hasta 3 m de altura, en cuya base se originan las yemas vegetativas, llamadas colinos o hijuelos. Del rizoma nacen las vainas de las hojas, distribuidas en espiral, que son las que forman el pseudotallo. A través de éste, sale la flor cuando la planta madura. Sus hojas son grandes y oblongas, con seudopécíolos largos. La inflorescencia pendular posee flores rojas, femeninas, masculinas o hermafroditas. Su fruto es carnoso de color crema a amarillo. Las variedades o clones que más se conocen son 'Orito' (genotipo AA, Sucrier), del subgrupo Giant Cavendish 'Williams' (genotipo AAA, Gran enano), del subgrupo Plantain el 'Barraganete' y 'Dominico-Hartón' (genotipo AAB, False Horn), entre otros [7].

Los bananos y plátanos son grandes plantas monocotiledóneas herbáceas, clasificadas según Simmonds (1996) dentro de la familia Musáceas, en la sección o serie Eumusa, género *Musa*. Casi todos los cultivares del banano y plátano se derivaron de las especies contenidas en la serie Eumusa, especialmente de las especies *Musa acuminata* y *Musa balbisiana*, originarias de Asia. Las letras A y B designan la especie (*acuminata* y *balbisiana*), respectivamente y la composición genómica con respecto a las dos especies parentales antes mencionadas: *M. acuminata* y *M. balbisiana*. Así tenemos que los plátanos por ejemplo, el plátano ‘Cuerno’, es del grupo AAB, triploide, con dos conjuntos de cromosomas de *acuminata* y uno de *balbisiana*.

El género *Musa* incluye miembros con tipo de reproducción sexual (por semilla) y asexual (cormos y meristemas). El número básico de cromosomas para los bananos y plátanos (incluyendo bananos de cocción tipo AAB y ABB) es de 11 ($2n = 2x = 22$ cromosomas) [8].

Los suelos recomendados para el cultivo del banano deben ser arenosos o de textura media o liviana, profundos, sueltos para que permitan una buena aireación y drenaje, ricos en materia orgánica,

francoarenosos o francolimosos y limosos y húmedos, con pH de 4.5 a 7.5 (óptimo de 6.0 a 6.5) [8].

El mejor clima para el desarrollo de este cultivo está alrededor de los 28°C, máxima 35°C y mínima de 18°C, en altitudes entre los 0 msnm y 2000 msnm, con 1800mm de precipitación anual [8].

El banano fue inicialmente cultivado en el Sur-Este de Asia y Melanesia en pequeños jardines permanentes establecidos en los alrededores, en claros de los bosques por agricultores nómadas y en jardines con otros cultivos. Algunos cultivares con diferentes fondos genéticos y diferentes respuestas a patógenos y pestes, fueron probablemente sembrados juntos, por lo que los problemas de enfermedades no fueron severos bajo estos agro-sistemas que ayudaron a seleccionar cultivares resistentes a enfermedades entre los susceptibles [7].

Hoy las variedades comerciales se cultivan en todas las regiones tropicales del mundo. Es la más cultivada de las frutas tropicales y una de las cuatro más importantes en términos globales, sólo por detrás de la uva, los cítricos y la manzana. Anualmente se producen más de 28 millones de toneladas de fruta, de las cuales

casi dos tercios provienen de Sudamérica. Los principales importadores son Europa, los Estados Unidos, Japón y Canadá.

Brasil es el principal productor mundial de banana, con alrededor de 3 millones de toneladas anuales, destinadas en su mayoría al mercado interno. Lo sigue la India, que produce cantidades similares, también consumidas localmente en su gran mayoría. Tanto Indonesia (2 millones de toneladas/año) como Filipinas (0,5 millones de toneladas/año) exportan la mayoría de su producción a Japón, al igual que la República de China (0,5 millones de toneladas/año). La fruta consumida en Europa procede sobre todo de las plantaciones del occidente africano, en particular de Costa de Marfil, y de Somalia, desde donde 9 millones de toneladas anuales abastecen las mesas europeas, y en menor medida de las posesiones francesas y neerlandesas en el Mar Caribe. El consumo interno en España se ha servido tradicionalmente de los plátanos de postre producidos en Canarias (similares a los de Madera), que exportaban también abundantemente a Europa, pero la liberalización de los mercados los ha hecho retroceder frente a las importaciones de origen africano y sudamericano. Ecuador y Colombia son los principales exportadores de banana en América,

a los que sigue Venezuela, que ha superado el millón de toneladas anuales. La producción de Panamá, Honduras y Costa Rica está principalmente destinada a los Estados Unidos [9].

1.1.1 Importancia del banano en el Ecuador

Ecuador es el primer proveedor de banano a los países de la Unión Europea y el segundo a los Estados Unidos. También se exporta a países de Europa del este, países árabes, Chile, Rusia, Argentina, Nueva Zelanda, Japón y China [10].

Los países que lideran las exportaciones son Ecuador, Costa Rica, Filipinas, y Colombia. Mientras que los mayores productores son India, Brasil, China, Ecuador, Filipinas, Indonesia, Costa Rica, México, Tailandia y Colombia [10].

Desde la época del “Boom” bananero y en el transcurso de pocos años Ecuador se convirtió en uno de los mayores exportadores de banano del mundo satisfaciendo al 25% de la demanda internacional [11]. Existen varias marcas internacionales bajo las cuales aparece nuestro banano nacional como son: Del Monte, Leefruit, Dole, Chiquita, Bonita, entre otras [12].

El cultivo del banano representa un rubro muy importante dentro del sector agropecuario del país contribuyendo con el 3% del PIB nacional y un 15% en el PIB del sector agropecuario, beneficiándose así directamente entre 10 al 12% de la población económicamente activa de esta producción [11, 13].

1.1.2 Zonas de mayor producción bananera del Ecuador.

Dentro de los cultivos en el Ecuador ocupa el cuarto puesto entre los productos más cultivados con 195,259 hectáreas predominando las variedades del subgrupo Giant Cavendish 'Williams', del subgrupo Cavendish 'Gran Enano', 'Valery', y del subgrupo Sucrier 'Orito' y 'Rojo' (genotipo AA) [7, 12].

El banano conjuntamente con el plátano registra el 40% del área agrícola de la costa y el 25% del área agrícola nacional. Las principales provincias a nivel de superficie en producción son: El oro con 43,353 Has, Guayas con 44,646 Has y Los Ríos con 50,419 Has, representando así el 77% de la superficie cultivada.

Esta estructura marca una diferencia en niveles de producción entre las provincias, así tenemos que Los Ríos produce un promedio de 2,070 cajas por Has, en Guayas de 1,600 cajas por has y en El Oro 1,500 cajas por has, produciendo un promedio nacional de 1,400 cajas por Has [12].

1.1.3 Enfermedades que afectan al cultivo.

Sigatoka negra es la enfermedad foliar más destructiva que ataca al género *Musa*. Fue registrada por primera vez en las islas Fiji en 1963, donde en poco tiempo se diseminó desplazando a la Sigatoka amarilla, comportamiento que se presenta en forma similar en la mayoría de las regiones bananeras y plataneras del mundo. Aparentemente, la Sigatoka negra se originó en Papua Nueva Guinea e islas Salomón, desde donde posteriormente y antes de 1927 se dispersó a Taiwan, Hawaii, Filipinas y otras islas del Pacífico asiático. Su ingreso a América Latina es incierto, se registró en 1972 atacando plantaciones de banano en Honduras, aunque existen citas del patógeno desde 1969. En los años siguientes a la década del 70, la enfermedad alcanzó

proporciones epidémicas en los países centroamericanos [7, 12].

La Sigatoka negra es causada por el hongo ascomicete *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, Cuando se reconoció por primera vez en las islas del Pacífico, se le dio el nombre de “Raya Negra”, nombre dado al reconocerse en Centroamérica en 1972 [12].

En plantaciones con bajo nivel de infección, los signos de la Sigatoka negra pueden ser fácilmente confundidos con los signos de la Sigatoka amarilla, especialmente en plantas jóvenes o en colinos bandera, donde las manchas individuales presentan una apariencia circular a ovalada de igual color y aspecto. En ataques severos, es inconfundible en plantas desarrolladas aun sin racimo, por la gran cantidad de rayas y manchas de color café a negro que pueden cubrir toda el área foliar en forma descendente desde la tercera hoja más joven abierta [12, 14].

Los efectos de la enfermedad sobre la planta son similares a los originados por la Sigatoka amarilla, es decir: defoliación,

reducción del vigor vegetativo, pérdida de peso de los racimos, maduración precoz y pérdida de la calidad de la fruta [12].

El mal de Panamá es provocado por el hongo *Fusarium oxysporum f. Cubense*. Es considerada una enfermedad muy perjudicial en las plantaciones bananeras, se encuentra en las zonas templadas y tropicales del mundo. Los síntomas externos se caracterizan por un amarillamiento de las hojas más viejas o un agotamiento en la unión del pecíolo con el pseudotallo. Todas las hojas eventualmente se agobian y mueren, pero el pseudotallo permanece erecto por uno o dos meses hasta que se pudre y se seca, este adquiere una consistencia dura y seca. Los síntomas internos consisten en una decoloración vascular en las vainas externas. En estado muy avanzado puede alcanzar hasta las vainas internas, el tallo verdadero y el pedúnculo de la fruta. Una forma de comprobar la enfermedad producida por este hongo es efectuando un corte transversal en la parte inferior del pseudotallo o del rizoma en donde se

muestra puntuaciones negras, indicadoras de infección interna causada por el hongo [14].

Este hongo se caracteriza por producir tres tipos de esporas: las microconidias, macroconidias y clamidosporas, estas últimas tienen paredes muy gruesas, lo cual las hace muy resistentes a condiciones ambientales desfavorables y a la ausencia de hospedantes. Distintas formas especiales de *F. oxysporum* pueden sobrevivir en un estado de reposo en el suelo durante muchos años, son viables después de 40 años [12, 14].

1.2 Mejoramiento convencional en banano.

1.2.1 Mejoramiento convencional.

Los bananos cultivados son en su mayoría triploides y partenocárpicas. Siendo altamente estériles, son muy difíciles de mejorar convencionalmente. A pesar de estos contratiempos, se ha progresado en el mejoramiento genético convencional de *Musa* en los últimos años y algunas nuevas variedades derivadas de cultivares de

regiones populares están ahora disponibles para más programas de mejoramiento convencional.

Basados en un gran número de accesiones recolectadas en zonas primarias y secundarias de diversidad bananera, el procedimiento inicial de mejoramiento está enfocado en cruzas de triploides (3x) por diploides (2x) apuntando a producir híbridos tetraploides resistentes a enfermedades, desde cultivares triploides parcialmente fértiles. Usando clones diploides resistentes como parentales machos y aprovechando gametos 3x femeninos, producidos por cultivares triploides femeninos parcialmente fértiles, así se han producido, a través del rescate de embriones, producciones de algunos híbridos tetraploides resistentes a enfermedades, teniendo los rasgos del parental madre. También se usan mejoramientos de parentales diploides de cruzas 2x/2x extensivas, para optimizar la producción de híbridos superiores [15].

1.2.2 Bases del mejoramiento convencional.

La mayoría de las especies en la sección Eumusa producen flores masculinas y femeninas en forma separada dentro de la misma inflorescencia. Las flores femeninas aparecen primero que las masculinas, en forma tal que la polinización dentro de la misma inflorescencia tiene que ser de tipo exógena ya que la autopolinización es imposible. Sin embargo, dentro de una misma mata existen varias plantas que sí pueden producir flores masculinas y femeninas en forma sincronizada, por lo que la autopolinización en la misma planta (entre plantas hermanas) si es posible de esa manera. En muy pocos casos, como por ejemplo en *M. acuminata* spp. *Banksii* y *M.acuminara* spp. *Errans*, se producen flores hermafroditas y según J. P. Horry [16] el nivel de heterocigosidad es menor del 10%, y que aún en las subespecies con flores no-hermafroditas el promedio de heterocigosidad es de solamente 25%.

Los bananos silvestres son diploides ($2n = 2x = 22$ cromosomas), producen semillas, generalmente la semilla es

fértil, y la polinización es esencial para el desarrollo del fruto. Los cultivares comerciales son triploides ($2n = 3x = 33$ cromosomas), no producen semillas (solo en muy raras ocasiones y en contados cultivares) y el desarrollo de los frutos no requiere del auxilio de la polinización (partenocárpicos).

La partenocarpia (formación de un fruto sin previa fecundación, frutos sin semilla) y la esterilidad son producto de mecanismos genéticos diferentes. Existe esterilidad genética, así como también la causada por la estructura híbrida del germoplasma. La esterilidad en los triploides sería del tipo estructural; sus flores femeninas son altamente estériles, y las flores masculinas no contienen polen viable.

Los clones diploides, son la base para el mejoramiento genético y ésta es su principal utilidad, ya que son muy poco usados como fuente de alimento. Generalmente son plantas más delgadas, de porte alto, con producción prolifera de hijos, de racimos y dedos pequeños y llenos de semillas. Los triploides son el producto final ideal de todo programa de mejoramiento por ser plantas mucho más vigorosas que los

diploides, con un potencial de producción mucho más alto, racimos grandes y mejor conformados, frutos más largos y gruesos y lo que es esencial, partenocárpicos y estériles. La producción para consumo local es un problema para los diploides, mientras que son usados en un programa de fitomejoramiento ya que permite producir nuevos y más variados materiales genéticos [15].

1.2.3 Objetivos y estrategias generales del mejoramiento convencional.

Los programas de fitomejoramiento de banano y/o plátano de cocción, tienen en general un macro objetivo: el desarrollo de cultivares resistentes a enfermedades y plagas, tales como Sigatoka (negra y amarilla), mal de Panamá, Moko o Marchitez bacterial, nematodos, picudo, entre los más importantes. A esto se le agregan características agronómicas deseables (tamaño y conformación de los dedos) y calidad de la fruta.

La presión o la rigidez en la selección de las progenies prometedoras, se aumenta o disminuye si el producto esperado es un banano de exportación o un banano para consumo local, plátano o bananos de cocción. El mejoramiento y selección para banano de exportación se complica por las exigencias impuestas por el mercado internacional, el cual demanda un tipo de agricultura altamente agresiva y competitiva en donde los estándares de calidad y la alta productividad marcan el éxito o fracaso de las empresas. En cambio, los mercados locales o los productores para autoconsumo demandan principalmente alta tolerancia a plagas y enfermedades, así como una amplia y fuerte adaptación a condiciones marginales, especialmente suelo y clima [15].

1.2.4 Principales limitaciones en el mejoramiento convencional de banano y plátano.

Los cultivares triploides sufren de una gran esterilidad femenina y su polen no es viable, por lo que su uso está limitado a servir únicamente como progenitor femenino, con el agravante de que muy pocos cultivares existentes pueden

prestar este servicio. Debido a su alta infertilidad femenina, la producción de semillas es muy escasa, especialmente cuando se usan padres diploides mejorados y no silvestres. Entre los diploides silvestres (partenocárpicos y no partenocárpicos) más usados, por lo menos al inicio de los diferentes programas de mejoramiento convencional, son: 'Calcutta-4', 'Long Tavoy', 'Paka', 'Pisang Linin' o 'Lidi', 'Pisang jari buaya', 'Tongat', 'Sinwobogi', 'Tjau Lagada', 'Tuu Gia', 'Guyod', entre otros [15].

Como resultado del mejoramiento convencional se pueden obtener híbridos primarios mejorados, los cuales pueden adquirir una resistencia, mas su fruto no es apetecible. Para solucionar esto, se realiza una técnica llamada introgestión, la cual consiste en un mejoramiento por hibridización interespecífica entre una planta receptora y una planta donante, seguido por retro-cruzas con la planta recipiente y simultaneas selecciones para encontrar los caracteres de interés [17].

1.3 Mejoramiento mediante transformación genética.

1.3.1 Transformación genética.

La transformación genética se da cuando un genoma ha sido modificado por un constructo de ADN exógeno derivado de una bacteria, hongo, virus, animal o sintético [18, 19]. Diferentes métodos han sido diseñados para la inserción de genes ajenos a la planta, en el genoma de la misma. Una característica común es que el ADN transformante tiene que atravesar algunas membranas, primero debe entrar a la célula de la planta, penetrando la pared celular, y la membrana de plasma, luego alcanzar el núcleo e integrarse en el cromosoma residente. Para la mayoría de especies, la transferencia de genes se da usando explantes competentes para la regeneración, para obtener plantas fértiles completas.

Los métodos de transformación más exitosos y ampliamente más usados son la transferencia de ADN mediada por *Agrobacterium tumefaciens* y la transferencia directa a través del bombardeo de partículas [20].

1.3.2 Transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

El origen bacteriano de los tumores de agalla de la corona, fue reconocido hace cien años atrás, setenta años después, la integración estable de ADN bacteriano en las células de la agalla de la corona fue descubierta, posicionando al *Agrobacterium* como el único organismo celular en la tierra que es naturalmente capaz de transferir material genético entre los reinos de la vida, de procariontas a eucariotas, aunque recientemente científicos han logrado inducir otras bacterias (*Rhizobium* sp, *NGR234*, *Sinorhizobium meloti* y *Mesorhizobium loti*) para que estas transfieran una secuencia de ADN al genoma de la planta [21, 22]. Desde entonces, *Agrobacterium* ha servido fielmente en la biología vegetal en un único rol bilateral: como una herramienta primaria para la ingeniería genética, para aplicaciones tanto industriales como investigativas, y como un sistema experimental muy útil para estudios de un amplio rango de procesos biológicos básicos. Los estudios comprenden el reconocimiento célula a célula, transporte de célula a célula,

importación nuclear, ensamblaje y desensamblaje de ADN-proteínas complejas, recombinación de ADN, regulación de expresión de genes en las células vegetales. Estos estudios han descubierto información en el proceso de transformación genética mediada por *Agrobacterium* y en los factores envueltos en la infección bacteria-hospedante. Más aun, *Agrobacterium* ha demostrado la transformación genética, bajo condiciones de laboratorio, de numerosas especies además de las plantas, desde hongos hasta células humanas, indicando la verdadera naturaleza básica del proceso de transformación [22].

1.3.3 Transformación por transferencia directa de ADN.

El método de Bio-balística fue desarrollado por la necesidad de transformar especies vegetales originalmente recalcitrantes a la transformación mediada por *Agrobacterium*, incluyendo cereales económicamente importantes. Este método consiste en la liberación de micro-proyectiles, usualmente de oro o tungsteno, recubiertos con ADN y disparados a las células objetivos por aceleración. La

aceleración puede ser provista por una explosión de pólvora o por una descarga de gases a alta presión, como el helio o el CO₂. El análisis molecular de plantas transformadas por bio-balística, generalmente revelan un patrón complejo del transgen, indicando la integración de múltiples copias del ADN bombardeado. Sin embargo, ha sido demostrado que en la mayoría de los casos, estas múltiples copias están organizadas como un simple locus y segregan en un patrón Mendeliano. Como con *Agrobacterium*, un gran número de diversidad de especies vegetales ha sido transformado con el método de bio-balística. Algunas ventajas de este método son las siguientes: (a) una amplia variedad de explantes pueden ser usados para someterse al bombardeo y obtener plantas fértiles; (b) no hay necesidad de vectores de transformación especializados; (c) este es el método más funcional y eficiente para la transformación de cloroplastos.

Otro método es el de la transferencia de ADN directa a protoplastos, usando polyethylene glicol (PEG), fosfato de calcio, o electroporación ha sido probada en varias plantas incluyendo el maíz. Los principales problemas de este

método es la baja reproducibilidad y regeneración de plantas, porque estos métodos son específicos para ciertos cultivares. La técnica de micro-inyección emplea células inmovilizadas, dentro de las cuales el ADN es insertado manualmente. Sin embargo, la tediosa manipulación, necesita un equipamiento sofisticado, y la dificultad de la regeneración en plantas no ha permitido su amplio uso [20].

1.4 *Agrobacterium tumefaciens.*

1.4.1 *A. tumefaciens.*

En 1907, Smith y Townsend demostraron que la bacteria Gram-negativa del suelo *Agrobacterium tumefaciens*, un miembro de la familia *Eubacterial Rhizobiaceae*, es el organismo responsable de la formación de tumores de agalla en la corona en plantas; la formación de estos tumores ocurre como el resultado de una infección bacteriana, usualmente en lugares con heridas, en muchas dicotiledonias y en algunas monocotiledoneas. Este descubrimiento no tiene mayor repercusión hasta que Armin Braun demostró que las células tumorosas fueron transformadas y que la proliferación incontrolada de las

células tumorosas no dependía de la presencia continua de *Agrobacterium*, infiriendo la existencia del principio de transformación inducida.

En 1974, Ivo Zaenen, Jeff Schell y Marc Van Montagu, en la universidad de Ghent, Bélgica, identificaron un megaplásmido que estaba presente solo en las cepas virulentas y ausente en las no virulentas, y lo llamaron plásmido Ti (plásmido inductor de tumores por sus siglas en inglés). Tres años más tarde, Eugene Nester, Milton Gordon, y Mary-Dell Chilton, en la Universidad de Washington, demostraron que solo algunos genes del plásmido Ti eran transferidos al cromosoma de la célula de la planta y eran los responsables de la inducción de tumores. El segmento de ADN transferido a las células de la planta fue llamado ADN-T (ADN de transferencia) y es delimitado por un borde izquierdo y uno derecho, los cuales son 25 pares de bases imperfectas, repeticiones directas.

Los investigadores pensaron que cualquier parte del ADN entre estos bordes podría ser transferido dentro de la célula vegetal e integrado aleatoriamente en el genoma de la

planta. Tomando en cuenta esta consideración el equipo de investigadores de la universidad de Ghent, la compañía Monsanto, y la Universidad de Washington en St. Luis, Missouri, insertaron genes heterólogos (genes o grupo de genes provenientes de otras especies diferentes al organismo a transformar) con regiones regulatorias apropiadas dentro de la región de ADN-T y mostraron que genes exógenos se integraron y se expresaron funcionalmente en las células de la planta. Luego, plásmidos desarmados Ti, los cuales carecían de los ADN-T involucrados en la formación de tumores, fueron usados para producir las primeras plantas transgénicas.

En los años siguientes, desde el experimento temprano usando *Nicotiana tabacum* y *Petunia hybrida* (1983), el sistema de *Agrobacterium* ha sido usado para transformar un amplio rango de especies de plantas dicotiledóneas. A pesar de eso, inicialmente la transformación de cereales era considerada imposible. Unos años después fue demostrado que los cereales tanto como el maíz y el arroz podrían ser

transformados también. Más recientemente, los hongos también han sido transformados usando este sistema [20].

El método de transformación usando *Agrobacterium* tiene algunas ventajas sobre otros métodos de transformación, y está considerado como el primer puesto entre las opciones de transformación en plantas. Estas ventajas incluyen los siguientes aspectos: (a) en un porcentaje significativo de eventos de transformación, una sola copia del ADN-T es integrado en los cromosomas de la células transformadas; (b) numerosos vectores que contienen los bordes del ADN-T y varios genes reporteros y de selección están ahora disponibles, permitiendo a los investigadores elegir la combinación más apropiada para insertar genes heterólogos; (c) es posible transferir fragmentos largos de ADN, incluyendo cromosomas artificiales bacterianos; (d) la transformación *in planta*, sin la necesidad de cultivos de tejidos, es posible en algunas especies como *Arabidopsis thaliana* y *Medicago trunculata* [20].

1.4.2 Genes de virulencia.

Un conjunto de genes de virulencia (*VIR*) están localizados en el plásmido Ti y son muy importantes ya que ellos codifican funciones que están involucradas en el reconocimiento de la célula vegetal, la unión a la misma, la inserción del ADN-T, y su transferencia e integración dentro del genoma de la planta. Así, la región vir del plásmido Ti, la cual tiene aproximadamente 30kb y está organizada en ocho grupos complementarios, *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virG*, *virH* y *virJ* son encargados de proveer la mayoría de los productos responsables del movimiento del ADN-T [22].

El producto de los genes *VirA* y *VirG* ha mostrado reconocer la señal de las moléculas producidas por heridas en las células de las plantas. Este reconocimiento desencadena otros genes vir. El producto del *VirA* es una proteína interna de membrana que reconoce y responde a la presencia de componentes fenolíticos de la planta. *VirA* traduce esta información a la proteína producida por *VirG* que actúa como un activador transcripcional de su propio gen y de otros genes vir. Las proteínas *VirC* y *VirD* son conocidas por estar

involucradas en la generación y subsecuente procesamiento de la copia del ADN-T. *VirD* específicamente produce una endonucleasa de sitio-específico que corta dentro de las 25 pb del borde derecho del ADN-T. Esto permite la generación de una cadena simple, cadena-T, que es subsecuentemente transferida al genoma de la planta. El producto de los genes *VirB* y del *VirE* están envueltos en formar la mayoría de los componentes estructurales que facilitan el movimiento del ADN-T. Aunque el *VirH* no es completamente necesario para la virulencia, se han encontrado mutantes que han atenuado la patogenicidad de ciertas plantas hospederas. Es posible que el producto del *VirH* le permita a la bacteria sobrevivir en la presencia de componentes bactericidas o bacteriostáticos en las plantas. La mutagénesis de la región *Vir* en el plásmido-Ti ha revelado que el locus *VirJ* es inducido por una molécula que da la señal de la planta herida, el acetosyringone. La exanimación de la secuencia de aminoácidos del *VirJ*, ha revelado que es similar a la región del cromosoma del gen *acvB* que es requerida para virulencia. Se cree que el *VirJ* codifica el mismo factor

requerido para la tumorigénesis como el *acvB* desde que puede complementar un fenotipo no virulento en un mutante del *acvB* [23].

1.4.3 Transferencia e integración del ADN-T al genoma de la célula de la planta.

Siguiendo la unión del *Agrobacterium* a la célula y la activación de los genes *Vir*, *A. tumefaciens* transporta una cadena simple ADN-T y algunas proteínas al interior de la célula vegetal. Los componentes transportados son llevados dentro de la célula de la planta hospedera, por una secreción del sistema transportador del complejo tipo IV (T4SS) hecho de unidades proteicas de *VirB* y *VirD4*. El ADN-T se transfiere por medio de una estructura compleja de proteína T4SS, que es facilitada por T4SS-objetivo por motivo de las proteínas *VirD* y *VirE*. Junto al ADN-T, algunas otras proteínas han sido reportadas siendo transportadas dentro del hospedero en la célula vegetal. Esto incluye al *VirD*, *VirE* y al *VirF*, y ellas detallan roles en el transporte e integración del ADN-T.

A través del citosol, el *VirE* está recubierto del complejo ssT-DNA-*VirD*, es transportado con ayuda de las proteínas de la célula de la planta hospedera. Ahora es conocido que el *Agrobacterium* transfiere la cadena-*VirD*-T y el *VirE* por separado, y que el completo-T se ensambla en la célula de la planta hospedera. Mientras que dentro de la célula, el *VirE* covalente, se enlaza al final 5' del ssT-DNA y el resto de la cadena-T se recubre de *VirE* para protegerse de la degradación exonucleolítica en la planta. El movimiento del complejo-T a través del citosol es asistido por una unión a los microtúbulos de las proteínas de la célula hospedera, a través de una señal de localización nuclear bipartida (NLS siglas en inglés) de las proteínas *VirD* y el *VirE* y el motor de dineína. Este NLS interactúa con las proteínas de la unión-NLS que están localizadas en algunos puntos a través de los principales microtúbulos del núcleo. El complejo-T es translocado en el núcleo de la célula hospedera, debido a la interacción con las proteínas interactivas del *VirE*.

Mayerhofer *et al.* [24] propuso dos modelos para la integración del ADN-T: (i) reparación de la ruptura de doble

cadena (DSB) y (ii) la reparación de la brecha de una sola cadena (SSG). El modelo de reparación de la DSB requiere la presencia de una ruptura de cadena doble (ds) en la secuencia del ADN objetivo para que la integración del ADN-T ocurra. Para un modelo de reparación SSG, un corte simple a lo largo del sitio de integración del ADN-T es convertido en una abertura por una endonucleasa 5'-3'. Los extremos cortados son luego parcialmente anillados al ADN objetivo y la cadena flotante es cortada. Luego de la ligación de la cadena-T al ADN objetivo, un corte es introducido en un segundo ADN objetivo y es extendido a un corte por una exonucleasa. El proceso de integración es terminado por la síntesis de una cadena complementaria a la cadena-T y la ligación al final 3' de su nueva cadena sintetizada al ADN objetivo. Este es el modelo preferido para la integración en el genoma de la célula de la planta hospedera, dado por el hecho que el ADN-T es transferido como una cadena simple [25].

1.4.4 Vectores.

Tradicionalmente, la manipulación y propagación de ADN recombinante se ha realizado utilizando plásmidos especialmente modificados, denominados genéticamente vectores [26]. Los vectores o plásmidos son moléculas de ADN circular replicable y autónoma, distinta del genoma bacterial normal y no es esencial para la sobrevivencia de la célula bajo condiciones no selectivas. Algunos plásmidos son capaces de integrarse en el genoma del huésped. Los genes introducidos en el plásmido suelen incluir aquellos que confieren resistencia a antibióticos, para permitir el metabolismo de sustratos 'inusuales'. Éstos son candidatos atractivos para la modificación y su uso como vectores, particularmente si se multiplican rápidamente y no se 'pierden' fácilmente por el hospedero en condiciones no selectivas. Una de las características óptimas de un plásmido, es su tamaño pequeño, esto significa que su resistencia al daño por roturas, y esta eficiencia es tomada por la bacteria, en el proceso denominado transformación.

Existen dos tipos de multiplicación de plásmidos, la relajada y la encadenada, la primera no está ligada a la división celular, y la replicación del plásmido ocurrirá con mayor frecuencia que la replicación cromosomal, llegando a un gran número de moléculas de plásmidos por célula, y cualquier vector con un origen de replicación en *E. coli* se replicará (junto con cualquier ADN incorporado). Al contrario, la replicación encadenada, está sincronizada con la división celular. El replicón puede tener asociados elementos *cis* de la actina.

Algunos genes de resistencia a antibióticos, permiten a las células que contienen el plásmido, a ser seleccionadas: si las células son plaqueadas en medio que contiene un antibiótico apropiado, solo aquellas que contengan el plásmido crecerán para formar colonias. El gen de resistencia puede ser usado, para la detección de aquellos plásmidos que contengan el ADN insertado. Los marcadores de resistencia a antibióticos más usados en plásmidos para expresión recombinante, confieren resistencia a: ampicilina, kanamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Los plásmidos

contenientes del gen de resistencia a la ampicilina, están acompañados por la expresión de la β -lactamasa del gen *bla*. Esta enzima es secretada al periplasma, donde es catalizada la hidrólisis del anillo β -lactam. [27].

1.4.5 Genes reporteros.

La utilización de marcadores celulares es una herramienta imprescindible en la biología celular y molecular. El desarrollo de la tecnología del ADN recombinante junto con la incorporación de marcadores enzimáticos (genes reporteros) tales como la luciferasa, β -glucuronidasa (GUS), entre otros, ha posibilitado el desarrollo de toda una tecnología de marcaje celular que aborda estudios tanto de localización celular de proteínas de interés como análisis de secuencias promotoras o la interacción de proteínas *in vivo*, entre otros.

El carácter enzimático de los marcadores celulares implica un procesamiento del tejido y su posterior incubación con el substrato correspondiente, permitiendo detectar la localización del enzima mediante precipitados colorigénicos

o reacciones quimioluminiscentes. A mediados de los 90, la incorporación de la tecnología de proteína de fluorescencia verde (Green Fluorescent Protein, GFP) revolucionó el marcaje celular. La posibilidad de detectar marcadores proteicos *in vivo*, en un entorno celular natural y sin previa manipulación del tejido ofrecía alternativas muy interesantes a los marcadores enzimáticos utilizados hasta la fecha [28].

CAPÍTULO 2

2. Metodología.

2.1 Diseño experimental

El diseño experimental usado para el presente análisis (Apéndice 1) es el diseño completamente al azar (DCA), este diseño fue elegido debido a que al trabajar en un laboratorio, las fuentes de variación son más controlables, y en el presente análisis no se presentó ninguna.[29].

La prueba de significación usada para saber si existen diferencias significativas estadísticas entre la distribución de los datos de los tratamientos fue la prueba de Kruskal-Wallis

el cual es un análisis alternativo no paramétrico al análisis de variancia usual, para probar si un grupo de datos proviene de la misma población. Intuitivamente, es idéntico al ANOVA con los datos reemplazados por categorías. Ya que es una prueba no paramétrica, la prueba de Kruskal-Wallis no asume normalidad en los datos de cada tratamiento, en oposición al tradicional ANOVA. Se asume bajo la hipótesis nula que los datos vienen de la misma distribución [30, 31]. Los datos usados para el análisis fueron el número de colonias sobrevivientes ante distintas dosis del antibiótico higromicina.

2.2 Material vegetal y condiciones del medio de cultivo.

Las suspensiones de células embriogénicas (SCE) del cultivar de banano 'Williams' (grupo genómico AAA) fueron desarrolladas a partir de inflorescencias masculinas (Sofía Korneva, comunicación personal) y fueron subcultivadas cada dos semanas en medio ZZ que contiene medio MS [32] diluido a la mitad suplementado con 5 μ M 2,4-D y 1 μ M de zeatina [5].

2.3 Vectores de transformación.

Los vectores que contienen los promotores de banano (variedad 'Three Hand Planty') fusionados con el gen reportero β -glucuronidasa (*uidA*^{INT}, GUS) contienen secuencias de 1.7 kilo pares de bases (kpb) y 0.6 kpb, las cuales fueron insertadas por delante del gen *uidA*^{INT} del pCAMBIA1391Z (pESKUL1 y pESKUL7, respectivamente [5]). El plásmido pESKUL1 contiene el promotor 17-1 (1.7 kpb) que posee actividad diferenciada a estrés de baja temperatura [6] y la secuencia se encuentra en la base de datos del GenBank del "National Center for Biotechnology Information" (NCBI) bajo el número de accesoión EU161097. El plásmido pESKUL7 contiene el promotor 85-1 (0.6 kpb) de banano [5]. Los vectores pESKUL1 y pESKUL7 fueron facilitados por la Universidad Católica de Lovaina en Bélgica (KULeuven) a través del "Laboratory of Tropical Crop Improvement". Otros vectores fueron adquiridos en CAMBIA (www.cambia.org) e incluyen el pCAMBIA1391Z (que contiene el *uidA*^{INT} sin promotor) usado como vector control

y el pCAMBIA1301 (con el gen reportero *uidA*^{INT} expresado por el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor). Todos los vectores utilizan el gen de selección higromicina fosfotransferasa (*hpt*) expresado por el promotor 35S duplicado (Apéndice 2). La clonación de los vectores en *A. tumefaciens* fue realizada de acuerdo a Santos-Ordóñez [5].

2.4 Protocolo de transformación.

2.4.1 Parámetros probados en la modificación genética de banano.

Con el fin de estandarizar el protocolo de modificación genética en banano, diferentes parámetros fueron probados. El experimento AT1 se centró en la expresión temporal del gen reportero *uidA*^{INT} de los diferentes promotores: 35S en el pCAMBIA1301 y los promotores de banano identificados en la variedad 'Three Hand Planty' (grupo genómico AAB, número de accesión del Centro Internacional de Tránsito ITC.0185) en los plásmidos pESKUL1 y pESKUL7 [5]. En el experimento AT2 se midió la expresión temporal del

plásmido pCAMBIA1301. Debido a la amplia fenolización de las células de banano después de una semana de selección, tres experimentos independientes fueron realizados: diferentes concentraciones de *Agrobacterium tumefaciens* (0.4 y 0.2 UDO₆₀₀, experimento AT3) y de los antibióticos usados (50, 25, 20, 15 y 12.5 µg mL⁻¹ de higromicina; 200 y 100 µg mL⁻¹ de mezcla de Timentín®, experimentos AT4.1 y AT4.2) fueron probados para evitar la fenolización de las líneas de células de banano durante el período de selección.

El protocolo de transformación genética de banano se basó en el método desarrollado por Pérez-Hernández *et al.* [33].

2.4.2 Co-cultivo e infección con *A. tumefaciens*.

Usando una punta de pipeta, se tomó una pequeña cantidad de la superficie de la bacteria congelada (almacenada a -80°C) y fue colocada sobre el medio YM sólido selectivo (0.1 g/L NaCl, 0.2 g/L MgSO₄-

7H₂O, 0.5 g/L K₂PO₄-3H₂O, 0.4 g/L de extracto de levadura, 10 g/L manitol, 13 g/L de bactoagar, pH7.0 ajustado con KOH), suplementado con el antibiótico de selección kanamicina con una concentración de 50 µg mL⁻¹. Después por rayado, usando un asa de platino, se esparcieron las bacterias y se dejaron en oscuridad a 28°C durante 48 horas. Luego, usando una punta de pipeta, se tomó una pequeña porción de una colonia aislada y se agitó en medio YEP líquido selectivo (5 g/L NaCl, 10 g/L, peptona, y 10 g/L de extracto de levadura, pH7.5) suplementado con kanamicina (50µg mL⁻¹), y fue dejada por 24 horas a 28°C a 200 rpm, hasta que alcanzaron una UDO₆₀₀ de 1.2 unidades. Después, se procedió a centrifugar el medio a 4,500 rpm durante 15 minutos, para precipitar las bacterias. Luego se eliminó el medio líquido y se resuspendió en ZZ líquido suplementado con acetosyringone, y se ajustó hasta una UDO₆₀₀ de 0.4 unidades para inducir el *Agrobacterium*.

Cuidadosamente se transfirieron muestras individuales de 200 μ L de suspensiones de células embriogénicas ajustadas al 33% de volumen celular (aproximadamente 50 mg de peso fresco de células) a placas de 24 pocillos usando una punta cortada de pipeta de 1 mL. Luego, fue agregado 1-mL de medio ZZ líquido con la dilución de *Agrobacterium* inducido en cada pocillo de la placa, que contiene las células embriogénicas a ser transformadas. Se agregó 1 mL de medio a las células que no iban a ser transformadas como control. Se incubaron las placas por 6 horas a 25°C y 25 rpm en la oscuridad.

La mezcla de células embriogénicas y bacterias fueron transferidas sobre una malla estéril de poliéster de 50 μ m sobre papel filtro para remover el exceso de *Agrobacterium* y medio ZZ líquido. Después se transfirió individualmente las mallas que contienen las muestras celulares infectadas a placas Petri de 5 cm de diámetro, con medio semisólido ZZ a pH 5.6 suplementado con acetosyringone. Finalmente

se incubaron las placas de co-cultivo de 6 a 7 días a 21°C en oscuridad.

2.4.3 Determinación de la actividad del gen reportero *uidA*^{INT}.

Luego de siete días de co-cultivo con *A. tumefaciens*, la actividad del gen *uidA*^{INT} fue evaluada. Las mallas de poliéster con las mezclas de células transformadas fueron transferidas a una caja Petri de 5 cm de diámetro, cada una con un papel filtro esterilizado en autoclave, y luego histoquímicamente teñidas para medir la actividad temporal del GUS (ATG) en presencia del sustrato X-Gluc de acuerdo a Jefferson *et al.* [34] y Santos-Ordóñez [5]. La frecuencia de la ATG fue expresada como el número de puntos azules por muestra de 50 mg de peso fresco de células de dos a ocho repeticiones. El conteo de los puntos azules fue realizado usando un estereoscopio y las imágenes fueron tomadas con una cámara digital. Las colonias transformadas estables fueron histoquímicamente teñidas como fue descrito

previamente luego de ocho semanas bajo presión selectiva. El análisis fluorométrico para medir la actividad enzimática del GUS fue desarrollado de acuerdo a los procedimientos modificados de Jefferson *et al.* [34] y Santos-Ordóñez [5]. Después de siete días de co-cultivo, se usaron entre 100 a 200 mg de peso fresco aproximadamente para el análisis fluorométrico.

2.4.4 Selección de colonias de células transformadas.

Según la metodología de Remy *et al.* [35] y Santos Ordóñez [5], descritas en su mayoría por Pérez-Hernández *et al.* [33], luego de siete días de co-cultivo, las mezclas celulares fueron transferidas a medio ZZ sólido con una concentración de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de higromicina (Invitrogen) para la selección de las células modificadas genéticamente, y $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ de mezcla de Timentín® para la eliminación de la agrobacteria (mezcla que contiene sal disódica ticarcilina y clavulanato de potasio de SIGMA en relación 15:1). Las células fueron incubadas en

oscuridad a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, con un subcultivo cada dos semanas de dos a tres meses. Diferentes concentraciones de higromicina fueron probadas durante el proceso de selección, éstas incluyen concentraciones de 50, 25, 20, 15 y $12.5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para la regeneración, las colonias celulares de banano, putativamente transgénicas, fueron transferidas a medio RD1 (medio MS diluido a la mitad, suplementado con 100 mg L^{-1} de mioinositol) para la inducción de embriones de acuerdo a Santos-Ordóñez [5].

2.4.5 Determinación molecular de líneas modificadas genéticamente de banano.

Luego de 10-12 semanas de selección, se procedió a realizar una extracción de ADN mediante el protocolo de Santos-Ordóñez [5] (Apéndice 3), a partir de la cual se realizó un análisis por PCR, usando GoTaq (catalogo # M7122, Promega). Los iniciadores utilizados fueron GUSF1 (TTCTTGGTTAGGACCCTTTTCTC) y GUSR1

(GACCCACACTTTGCCGTAAT) que amplifican específicamente el gen reportero *uidA*^{INT} (Figura 2.1).

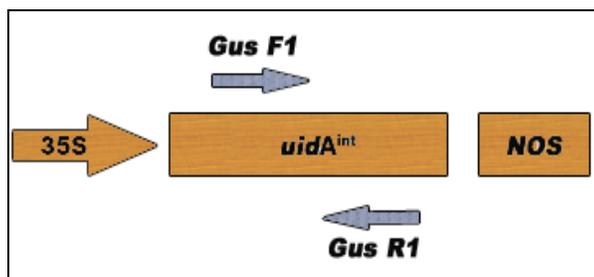


FIGURA 2.1 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL LUGAR DE ANILLAMIENTO DE LOS INICIADORES PARA AMPLIFICACIÓN DEL GEN REPORTERO *uidA*^{INT} PRESENTE EN EL VECTOR pCAMBIA1301. La PCR fue realizada en tubos Eppendorf de 0,2

mL. La mezcla para la PCR contuvo GoTaq 1 x (PROMEGA), 10 μM de cada primer, y 2,5-10 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ de ADN en un volumen total de 20 μL . El programa de PCR consistió de una desnaturalización inicial a 95,0°C por 2 minutos, luego 35 ciclos de desnaturalización a 95,0°C por 30 segundos, anillamiento de los iniciadores a 60,0°C por 30 segundos, y elongación a 68,0°C por 1 minuto y terminando con una elongación final a 68,0°C por 2 minutos.

Fuente: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Laboratorio de Biología Molecular.

Una vez culminado el programa, se colocó el producto de la PCR en un gel de agarosa al 1.5% en buffer SB 1X (NaOH 0.4g/L, ácido bórico 2.5 g/L), se dejó correr a 120 V por una hora y luego se analizó la presencia de bandas usando luz UV en el equipo GEL-DOC-XR de Bio-Rad.

CAPÍTULO 3

3. Resultados y discusión.

3.1 Expresión temporal del gen reportero *uidA*^{INT}.

La utilización de marcadores celulares es una herramienta imprescindible en la biotecnología celular y molecular. El desarrollo de la incorporación de marcadores enzimáticos, tales como el *uidA*^{INT}, ha posibilitado el desarrollo de toda una tecnología de marcaje celular que aborda estudios tanto de localización celular de proteínas de interés como análisis de secuencias promotoras y su eficiencia, ayudándonos así, para medir el éxito de la transformación se midió la actividad

temporal del gen reportero *uidA*^{INT} después de siete días de co-cultivo con *Agrobacterium tumefaciens*, sin la presencia de antibióticos. En el análisis de actividad temporal del gen *uidA*^{INT} de dos muestras (cada muestra contiene aproximadamente 50mg de peso fresco de células de banano en una malla de poliéster) por tratamiento en el primer experimento (AT1), se detectó 0 puntos azules en los controles (células de banano no transformadas), mientras que en las células transformadas usando el vector pCAMBIA1391Z que no contiene promotor en el gen *uidA*^{INT} mostró un punto azul luego de 48 y 120 horas de incubación con X-Gluc en una muestra (Tabla 1). Debido a las propiedades de actividad del aumentador del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor [36] que expresa el marcador de selección para resistencia a la higromicina, la expresión del gen reportero puede observarse ocasionalmente. Por lo tanto, el pCAMBIA1391Z es usado como control negativo de los eventos de transformación como es sugerido en CAMBIA (http://www.cambia.org/daisy/bioforge_legacy/3725.html)

debido a la presencia del promotor 35S del marcador del gen de selección en los vectores pESKUL1, pESKUL7 y pCAMBIA1301. Aunque uno de los puntos azules fue observado solo en una muestra, la actividad de los promotores de banano probados fue confirmada en las células embriogénicas transformadas con el pESKUL1 (12 y 0 puntos azules) y el pESKUL7 (26 y 17 puntos azules). Se observó una actividad más alta en las células transformadas con el pCAMBIA1301 en comparación con las líneas pESKUL1 y el pESKUL7 (Tabla 1). Estos resultados confirman la baja actividad de los promotores de banano observados en otros cultivares incluyendo en las variedades de banano ‘Three hand Planty’ (grupo genómico AAB) y ‘Gran Enano’ (AAA) cuando son comparados con otros promotores como el del 35S [5] y el de ubiquitina de maíz [6].

TABLA 1 EXPRESIÓN TEMPORAL DEL GEN *uidA*^{INT} EN EL EXPERIMENTO AT1

Tratamiento ¹	Número de puntos azules		
	Horas después de incubación con X-Gluc		
	24	48	120
Control	0	0	0
Control	0	0	0
pCAMBIA1391Z	0	1	1

pCAMBIA1391Z	0	0	0
pESKUL1	0	11	12
pESKUL1	0	0	0
pESKUL7	19	19	26
pESKUL7	7	12	14
pCAMBIA1301	90	242	244
pCAMBIA1301	220	247	246

¹ Control: células embriogénicas sin transformar; pCAMBIA1391Z gen reportero *uidA*^{INT} sin promotor; pESKUL1 gen reportero *uidA*^{INT} con el promotor 17-1; pESKUL7 gen reportero *uidA*^{INT} con el promotor 85-1; pCAMBIA1301 gen reportero *uidA*^{INT} con el promotor 35S.

Fuente: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Laboratorio de Biología Molecular.

Un experimento independiente de transformación (AT2) fue desarrollado usando solo el vector pCAMBIA1301 para la verificación de la eficiencia de transformación debido al gran número de puntos azules contabilizados con este constructo (Tabla 1). La expresión del gen *uidA*^{INT} fue medida (Figura 3.1) y el número de puntos azules se duplicó en comparación con el tratamiento del pCAMBIA1301 del experimento anterior (Tablas 1 y 2) obteniendo un promedio de 488 ± 18 puntos azules, resultados relativamente bajos

comparados con los obtenidos por Arinaitwe [25] con un promedio de $1,400 \pm 100$ puntos azules, en el cultivar 'Gran Enano', el cual mostró los mayores niveles de expresión del *uidA*^{INT} usando el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, frente a otros cultivares [25]. El análisis histoquímico es un indicador de la eficiencia de transformación al contabilizar el número de puntos azules después de una semana de co-cultivo de SCE de banano con *A. tumefaciens* indicando las células de banano que fueron transformadas. Diferentes SCE del cultivar 'Williams' fueron usadas en los dos experimentos independientes (AT1, AT2) y puede ser la causante de la variación, indicando que la segunda SCE tiene una mayor competencia para la transformación.

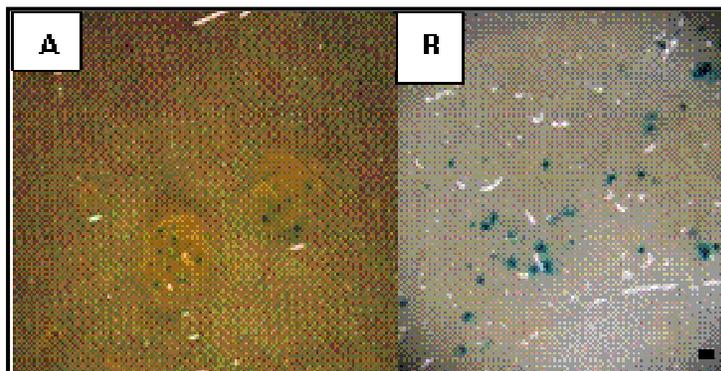


FIGURA 3.1 EXPRESIÓN DEL GEN *uidA*^{INT} EN CÉLULAS EMBRIOGÉNICAS DE BANANO VARIEDAD 'WILLIAMS'. Análisis histoquímico de la expresión del gen reportero *uidA*^{INT} en células de banano después de 7 días en co-cultivo con *A. tumefaciens* conteniendo el plásmido pCAMBIA1301. La barra representa 200 μ m. (A) Experimento AT1. (B) Experimento AT2.

Fuente: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Laboratorio de Biología Molecular.

TABLA 2 EXPRESIÓN DEL GEN *uidA*^{INT} EN EL EXPERIMENTO AT2

Tratamiento¹	Número de puntos azules
Control	0
Control	0
Control	0
pCAMBIA1391Z	0
pCAMBIA1301	509
pCAMBIA1301	473
pCAMBIA1301	287
pCAMBIA1301	484

¹ Control: células embriogénicas sin transformar; pCAMBIA1391Z gen reportero *uidA*^{INT} sin promotor; pCAMBIA1301 gen reportero *uidA*^{INT} con el promotor 35S.

Fuente: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Laboratorio de Biología Molecular.

Complementario al análisis histoquímico, el ensayo fluorométrico cuantitativo de la enzima GUS fue realizado a partir de extractos de colonias combinadas de banano luego de una semana de co-cultivo con *Agrobacterium* (Figura

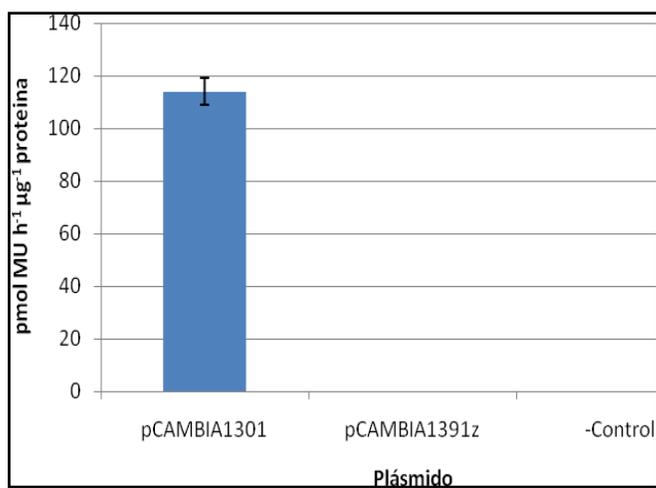
3.2). Como se observó en el análisis histoquímico (Figura 3.1) la actividad enzimática de GUS fue claramente detectada en las colonias celulares transformadas con el pCAMBIA1301 (Figura 3.2). El promedio de la actividad alcanzada fue de $114 \text{ pmol MU h}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ de proteína en el tratamiento con pCAMBIA1301 mientras que en las células transformadas con pCAMBIA1391Z (ausencia de promotor en gen reportero) no se detectó actividad alguna del *uidA*^{INT}, así como en las células no transformadas (Tabla 3), Estos resultados son muy parecidos a los obtenidos por Chee *et al.* [37] con un promedio de $104 \text{ pmol MU h}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ de proteína con el pCAMBIA1301 transformado por la metodología del bombardeo de partículas luego de dos días desde la transformación de embriones inmaduros de banano del cultivar 'Mas' (AA). El análisis cuantitativo confirmó el éxito en la transformación genética de banano.

TABLA 3 RESULTADOS DEL ANÁLISIS FLUOROMÉTRICO.

Tratamiento	Promedio (pmol/hxµg de proteína)	Desviación Estandar	Error Estandar
pCAMBIA1301	114	8,91	5,15
pCAMBIA1391Z	0	0	0
CONTROL	0	0	0

¹ pCAMBIA1301: gen reportero *uidA*^{INT} con el promotor 35S; pCAMBIA1391Z: gen reportero *uidA*^{INT} sin promotor; Control: células embriogénicas sin transformar. Cada extracción de proteínas para el análisis fue realizada a partir de 150 mg de tejido fresco aprox. Datos completos en el apéndice 4.

Fuente: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Laboratorio de Biología Molecular.



Fuente: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Laboratorio de Biología Molecular.

FIGURA 3.2 ANÁLISIS FLUOROMÉTRICO EN EL EXPERIMENTO AT2.

Análisis fluorométrico de la expresión del gen reportero *uidA*^{INT} en extracto proteico de células de banano después de 7 días en co-cultivo con *A. tumefaciens* conteniendo el plásmido pCAMBIA1301 con el gen reportero *uidA*^{INT} con el promotor 35S del Virus del Mosaico de la coliflor, pCAMBIA1391Z con el gen reportero *uidA*^{INT} sin promotor, y como control negativo células embriogénicas sin transformar. Cada extracto fue realizado a partir de 150 mg de tejido fresca aprox.

3.2 Selección de colonias transgénicas estables de células de banano.

Después de una semana de selección para los eventos transgénicos en medio ZZ con los antibióticos higromicina ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) y la mezcla de Timentín® ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$) las células de banano se fenolizaron (Figura 3.3) y eventualmente no se mostró ningún crecimiento de las mismas en el experimento AT1.

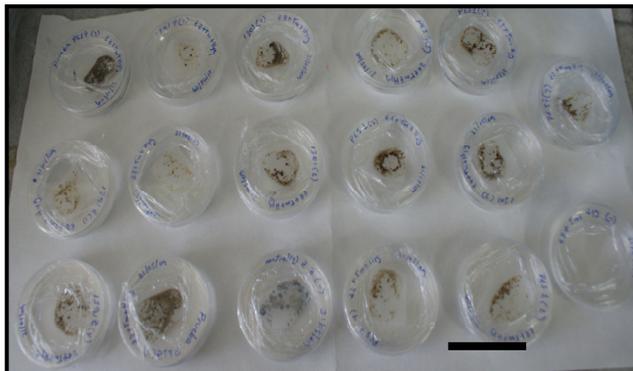


FIGURA 3.3 EXPERIMENTO AT1. Células de banano transformadas luego de una semana de selección en medio sólido ZZ suplementado con Timentín ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$) e higromicina ($50\mu\text{g mL}^{-1}$). La barra representa 5 cm.

Fuente: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Laboratorio de Biología Molecular.

Debido a la amplia fenolización de las células de banano después de una semana de selección, tres experimentos independientes fueron realizados. Diferentes concentraciones de *Agrobacterium tumefaciens* (0.4 y 0.2 UDO_{600} , experimento AT3) y de los antibióticos usados (50, 25, 20, 15 y $12.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de higromicina; 200 y $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Timentín®, experimentos AT4.1 y AT4.2) fueron probados para evitar la fenolización de las líneas de células de banano durante el período de selección.

Una semana después de la selección con antibióticos, no se encontró una diferencia entre los patrones de fenolización entre las muestras con distintas concentraciones de *Agrobacterium* en el experimento AT3 (Figura 3.4). El procedimiento de selección en el experimento AT3 (decrecimiento de las concentraciones de higromicina de 50 a 25 y 12.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ durante los primeros tres subcultivos, respectivamente, y luego se mantuvieron en 12.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) revela que colonias celulares putativamente transgénicas crecieron después de ocho semanas de selección (Figura 3.5). Por lo tanto, dos experimentos adicionales fueron realizados para probar distintas concentraciones del agente selectivo (AT4.1 y AT4.2). Experimentos realizados en otros laboratorios [5] usando los vectores pESKUL1 y pESKUL7 para la transformación mediada por *Agrobacterium* de SCE de banano, revelaron que la concentración de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de higromicina era suficiente para la selección de eventos transgénicos estables. Sin embargo, el reactivo higromicina usado por Santos-Ordóñez [5] y el usado en el presente

estudio sugieren que ambos antibióticos poseen distinta actividad (Lászlo Sági, Serge Remy, “Laboratory of Tropical Crop Improvement”, Universidad Católica de Lovaina 2009, comunicación personal).

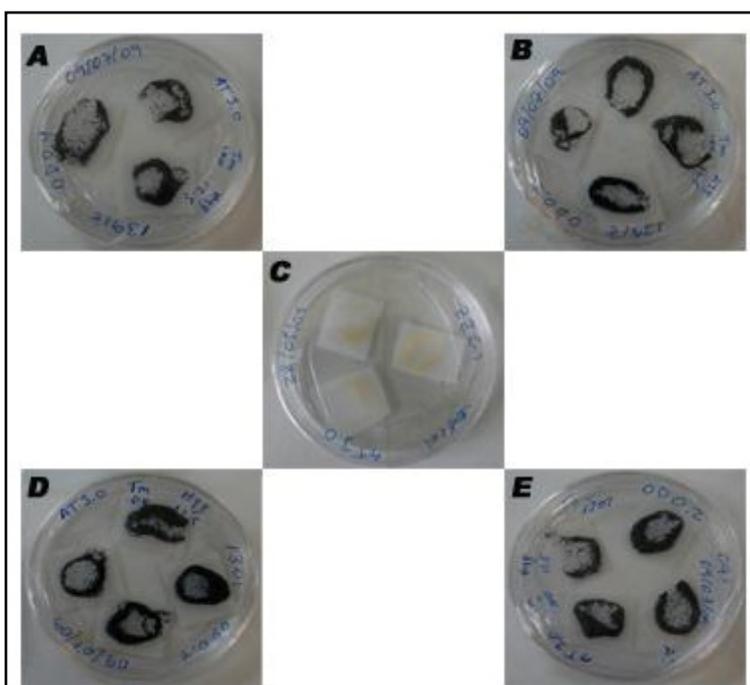


FIGURA 3.4 CÉLULAS FENOLIZADAS EN EL EXPERIMENTO AT3. Células de banano sub-cultivadas en medio ZZ sólido suplementado con los antibióticos Timentín ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$) e higromicina ($50\mu\text{g mL}^{-1}$) luego de dos semanas de selección, cada caja contiene distintos plásmidos y concentraciones de *A. tumefaciens* durante el co-cultivo líquido como se explica a continuación: plásmido pCAMBIA1391Z $\text{UD}_{600} = 0.4$ (A), plásmido pCAMBIA1391Z $\text{UD}_{600} = 0.2$ (B), control, células sin transformar (C),

plásmido pCAMBIA1301 UDO₆₀₀ = 0.4 (D), plásmido pCAMBIA1301 UDO₆₀₀ = 0.2 (E).

Fuente: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Laboratorio de Biología Molecular.

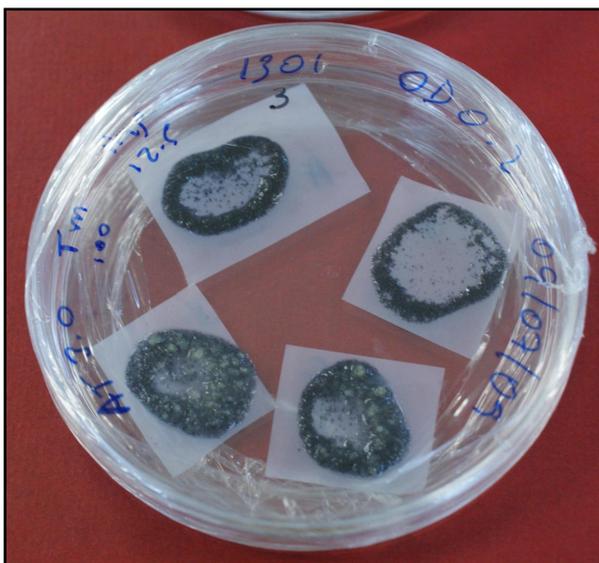


FIGURA 3.5 CRECIMIENTO DE COLONIAS TRANSGÉNICAS EN MEDIO SELECTIVO EN EL

EXPERIMENTO AT4.1. Colonias putativas transgénicas de células de banano luego de ocho semanas de selección, después de disminuir la concentración de higromicina a $12.5 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Fuente: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Laboratorio de Biología Molecular.

La concentración de la mezcla de antibióticos (componentes de Timentín®) para la eliminación del *A. tumefaciens* fue determinada por la comparación del crecimiento bacteriano en medio semisólido durante la selección de las líneas transgénicas de banano. A una concentración de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ se detectó crecimiento bacteriano (Figura 3.6). Por lo tanto, la concentración óptima de los componentes de Timentín® fue la de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ debido a la ausencia de crecimiento bacteriano, como es recomendado por Remy *et al.* [35], Pérez-Hernández *et al.* [33] y Santos-Ordóñez [5].

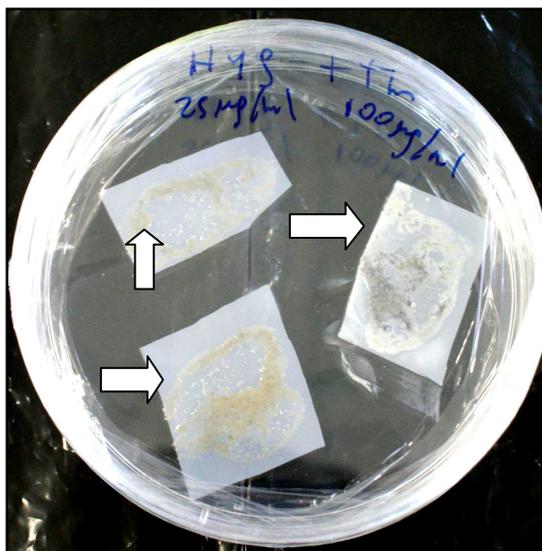


FIGURA 3.6 CRECIMIENTO BACTERIAL EN CAJA CON TIMENTÍN EN EXPERIMENTO AT4.1. Células embriogénicas subcultivadas en ZZ sólido suplementado con Timentín (100µg MI-1) e higromicina (25µg mL⁻¹) luego de dos semanas en selección. Las flechas indican crecimiento de *A. tumefaciens*.

Fuente: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Laboratorio de Biología Molecular.

Diez semanas de selección con diferentes concentraciones de higromicina en el experimento AT4.1 (50, 25 y 12.5 µg mL⁻¹) revela la presencia de colonias de células putativas transgénicas en el tratamiento con 12.5 µg mL⁻¹ de

higromicina (194 ± 24 colonias de células, promedio de cuatro muestras). Cuatro muestras con aproximadamente $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ y tres muestras de cuatro de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ mostraron una fenolización generalizada y no se detectó ninguna colonia de células. Solo una muestra mantenida a una concentración de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ de higromicina mostró 26 colonias de células transgénicas putativas. El análisis histoquímico luego de 12 semanas de selección reveló que las colonias celulares fueron transformadas siendo subcultivadas en higromicina a una concentración de 25 y $12.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 3.7). Por lo tanto, el análisis histoquímico revela la presencia del ADN-T de pCAMBIA1301 en el genoma de las colonias de células de banano.

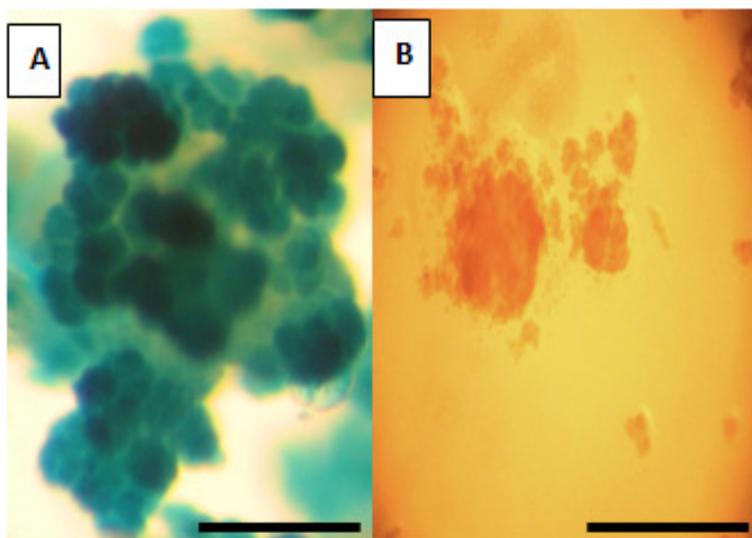


FIGURA 3.7 ANÁLISIS HISTOQUÍMICO EN EL

EXPERIMENTO AT4.1. Análisis histoquímico de células transformadas con el pCAMBIA1301 con el gen reportero *uidA*^{INT} con el promotor 35S(A), Control, células de banano sin transformar (B), luego de 12 semanas de selección, incubadas a 37°C durante 4 horas en presencia de X-Gluc. La barra representa 200 µm.

Fuente: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Laboratorio de Biología Molecular.

Luego de todas las pruebas mencionadas anteriormente, se realizó el experimento AT4.2 usando una mayor cantidad de tratamientos para medir la concentración óptima del agente de selección higromicina (12.5, 18, 20, 25, 50 µg mL⁻¹)

manteniendo la misma concentración de Timentín® ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$) para eliminar cualquier traza de *Agrobacterium tumefaciens*. Se realizó el conteo de colonias sobrevivientes luego de 10 semanas de selección en cada tratamiento (Apéndice 5) donde se pudo constatar que la concentración recomendada de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ resultaba letal tanto para las células embriogénicas transformadas como para las no transformadas con el gen de resistencia a la higromicina (higromicina fosfotransferasa, *hpt*). Como resultado, a menor concentración del agente de selección, mayor número de colonias sobrevivientes fueron observadas por tratamiento, donde el mejor tratamiento fue el que poseía la concentración de $12.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ con un promedio de 204 ± 28 colonias; frente a la dosis recomendada la cual no obtuvo ningún crecimiento. Estos resultados son elevados comparados con los obtenidos por Arinaitwe [25] con un promedio de 89 ± 20 colonias putativas transgénicas del cultivar 'Gran Enano' con el agente de selección *ntpII* luego de ocho semanas de selección, con lo que se puede inferir una mayor frecuencia de eventos estables transgénicos

utilizando el agente selectivo higromicina frente a otros antibióticos como la geneticina [25] o se obtuvo una mayor estabilidad de los insertos del ADN-T en las células embriogénicas de banano cuando se compara con respecto a los promedios obtenidos en el análisis histoquímico del *uidA*^{INT} de ambos trabajos (sección 3.1). El análisis usado para encontrar diferencias significativas del número de colonias sobrevivientes después del período de selección entre tratamientos fue el de Kruskal Wallis (sección 2.1) donde se comprueba que los grupos de datos de cada tratamiento son de poblaciones estadísticas diferentes. Se encontraron cuatro grupos distintos donde se pueden apreciar que hay tratamientos que son estadísticamente iguales pero distintos de los demás, obteniendo así cuatro grupos diferentes (Tabla 4). Estandarizando así el protocolo de transformación genética suspensiones de células embriogénicas de banano de la variedad 'Williams' (AAA) mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Apéndice 6).

TABLA 4 TABLA DE PRUEBA DEL ANÁLISIS NO PARAMÉTRICO DE KRUSKAL WALLIS.

Tratamientos ¹	Mediana	Grupos
T1	0	A
T2	0	AB
T3	79,86	BC
T4	160	CD
T5	209	D

Análisis no paramétrico de Kruskal Wallis donde cada letra muestra diferencias significativas al 5%. Cada tratamiento se realizó a partir de 50 mg de tejido fresco aproximadamente, con ocho repeticiones por tratamiento.¹ Concentraciones del antibiótico higromicina (T1=50; T2=25; T3=20; T4=15; T5=12.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Se contaron el número de colonias de banano sobrevivientes al período de selección (10 semanas) como indicativo de presencia de colonias transgénicas (se muestra la mediana).

Fuente: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Laboratorio de Biología Molecular.

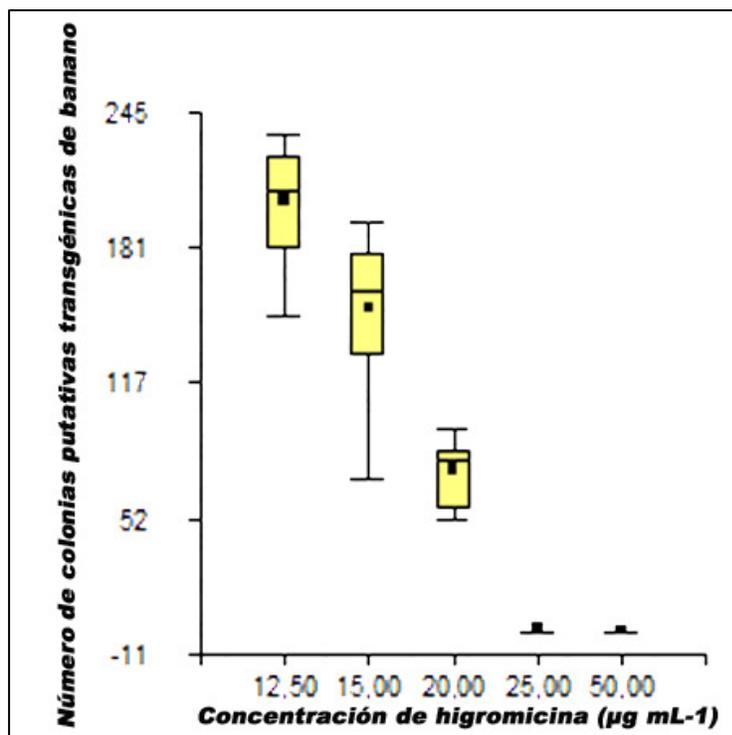


FIGURA 3.8 DIAGRAMA DE CAJAS DE DATOS TOMADOS DEL CONTEO DE COLONIAS SOBREVIVIENTES DE CÉLULAS EMBRIOGÉNICAS PUTATIVAS TRANSGÉNICAS POR TRATAMIENTO. Los

conteos fueron realizados luego de diez semanas en selección usando distintas concentraciones de higromicina (12.5, 15, 20, 25 y 50 µg mL⁻¹). El conteo fue realizado a partir de 50 mg de tejido fresco con ocho repeticiones por tratamiento.

Fuente: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Laboratorio de Biología Molecular.

3.3 Determinación molecular de líneas modificadas genéticamente de banano.

Finalmente, la comprobación de la integración del ADN-T en el genoma de las células embriogénicas de banano, se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa. El ADN de las muestras de células embriogénicas transformadas se uso como ADN molde en la PCR en combinación con iniciadores específicos que se anillan al gen reportero *uidA*^{INT} presente tanto en el plásmido pCAMBIA1301 como en el pCAMBIA1391Z. Las células embriogénicas no transformadas y el control del PCR (agua) fueron usados como controles negativos, mientras como controles positivos se usaron directamente los plásmidos. Se detectaron amplicones en las muestras de ADN de células transformadas con los plásmidos pCAMBIA1301 y pCAMBIA1391Z confirmando la transformación genética de las células de banano (Figura 3.9).

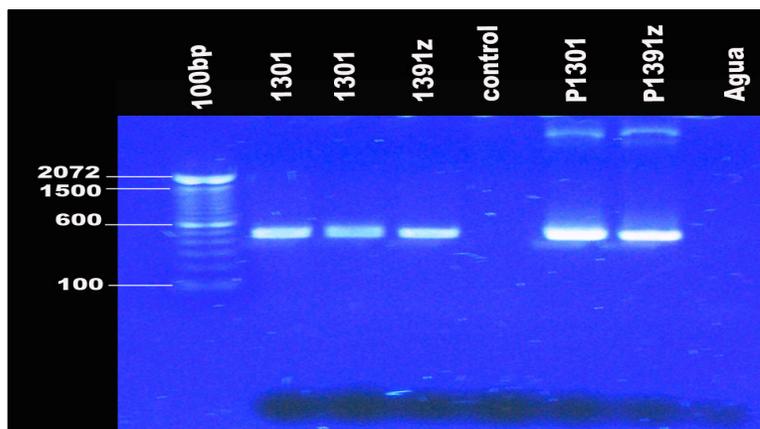


Figura 3.9 RESULTADOS DE PCR DE ADN EXTRAÍDO A PARTIR DE LAS CÉLULAS EMBRIOGÉNICAS DE BANANO

TRANSFORMADAS Y SU CONTROL. Gel de agarosa al 1.5% con el producto de PCR (469 pb) generado usando los iniciadores GUSF-1 y GUSR-1 de las células embriogénicas (1301 se refiere al plásmido pCAMBIA1301; 1391z al plásmido pCAMBIA1391Z). Los controles positivos usados fueron los plásmidos pCAMBIA1301 (P1301) y pCAMBIA1391Z (P1391z). Control se refiere a células no transformadas. Marcador de peso molecular se indica como 100bp y el tamaño en pares de bases de bandas referenciales es ilustrado a la izquierda.

Fuente: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Laboratorio de Biología Molecular.

CAPÍTULO 4

4. Conclusiones y recomendaciones.

4.1 Conclusiones.

Los resultados de los análisis histoquímico, fluorométrico y de la reacción en cadena de la polimerasa confirmaron que las células de banano del cultivar 'Williams' co-cultivadas con *A. tumefaciens* fueron modificadas genéticamente. Se obtuvo una eficiencia de transformación de 194 ± 24 y 204 ± 28 colonias transgénicas putativas por muestra después de 10 semanas de selección en dos experimentos independientes, bajo selección a $12.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de higromicina.

El análisis de la expresión del gen reportero *uidA*^{INT} revela que, los promotores de banano 17-1 y 85-1 del cultivar 'Three Hand Planty'

tienen una actividad inferior a la del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor en células embriogénicas de banano de la variedad 'Williams' después de una semana de co-cultivo con *Agrobacterium tumefaciens*.

La selección por antibiótico usando higromicina como agente de selección a una concentración de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ mostró ser nocivo para las células embriogénicas transformadas de banano, con el gen de resistencia a la higromicina expresada con el promotor 35S duplicado del virus del mosaico de la coliflor.

La concentración óptima de higromicina, utilizada para el proceso de selección durante 10 semanas de eventos transgénicos en la variedad de banano 'Williams' transformados con el plásmido pCAMBIA1301 fue de $12.5 \mu\text{g mL}^{-1}$, donde se obtuvo un mayor número de colonias putativas transgénicas (hasta 204 ± 28).

4.2 Recomendaciones.

Cuando se utiliza el antibiótico higromicina como agente de selección es recomendable realizar una curva de mortalidad usando diferentes concentraciones debido a la necesidad de optimizar el protocolo de selección de líneas de banano transgénicas estables, puesto que el producto puede tener distinta actividad de acuerdo a la marca y lote.

Para la verificación de líneas de células de banano transgénicas estables, se recomienda realizar el análisis de "Southern blot" para comprobar la presencia del ADN-T en el genoma nuclear de las células de las líneas transgénicas de banano. Es recomendable realizar este análisis una vez las líneas transgénicas independientes se hayan regenerado en vitroplantas, para así tener una mayor cantidad de tejido para realizar la extracción de ADN.

APÉNDICES

APÉNDICE 1

EXPERIMENTOS PILOTOS Y DESARROLLO DEL DISEÑO EXPERIMENTAL.

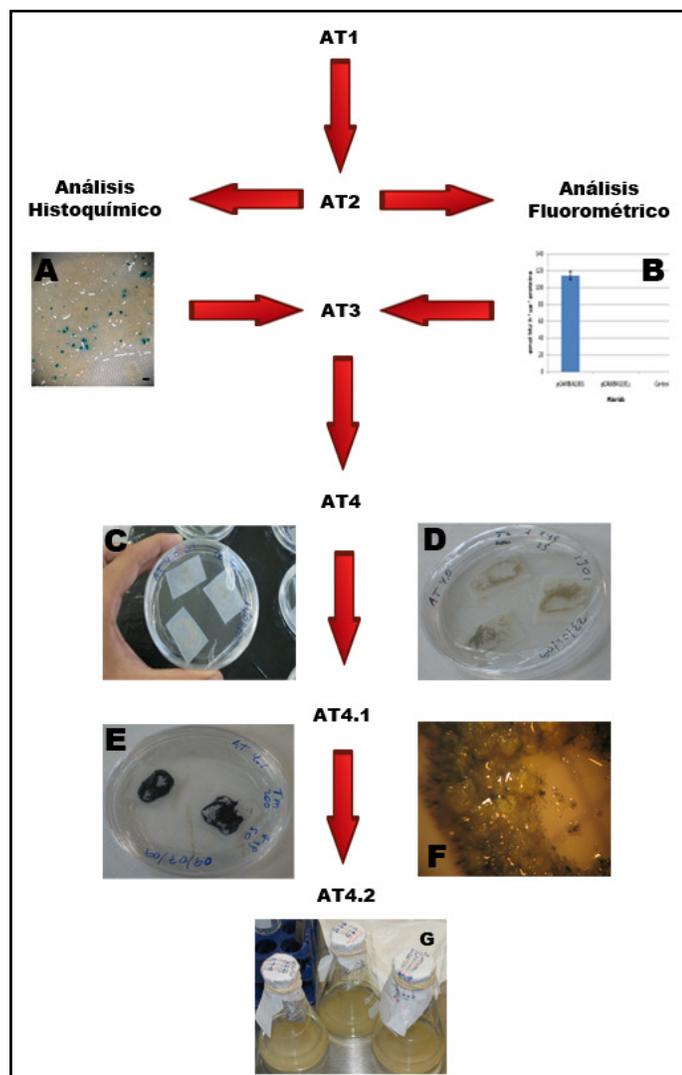
El experimento AT1 fue desarrollado para medir la eficiencia de distintos plásmidos para seleccionar el mejor de todos para el desarrollo de la tesis y probar el protocolo de modificación genética de células embriogénicas de banano mediada por *A. tumefaciens*, según describe Pérez-Hernandez [33]; eligiendo por su eficiencia al promotor pCAMBIA1301 el cual usa el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV por sus siglas en inglés).

Una vez seleccionado el plásmido a usar para el desarrollo de la tesis, se realizó el experimento AT2 para medir la eficiencia de transformación temporal usando un análisis histoquímico según Jefferson *et al.* [34] y la actividad enzimática del producto del gen reportero *uidA*^{INT} con respecto al tiempo (24, 48 y 120 horas) para determinar el momento en que será realizado el conteo en la tesis, dándonos como resultado que a las 48 horas se normalizaba la aparición de los puntos azules (Tabla 3.1), razón por la cual cada conteo fue realizado a las 48 horas de aplicado el buffer conteniendo el sustrato de X-Gluc.

Luego de determinado el momento para la realización del conteo, se realizó un experimento para probar distintas UDO_{600} (0.4 y 0.2) de *Agrobacterium tumefaciens* y las concentraciones recomendadas de antibiótico [33], mas no hubo diferencia alguna entre tales concentraciones de la bacteria, pero al momento de realizar la selección por antibiótico (Timentín $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ e higromicina $50 \mu\text{g mL}^{-1}$), se presentaba una fenolización total de las células embriogénicas, resultando en una mortandad del 100%.

Una vez determinado que el problema eran los antibióticos, se realizó el experimento AT4.1, en el cual se hicieron combinaciones de distintas dosis de Higromicina (50, 25, $12.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) y Timentín (200 y $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) obteniendo contaminación (crecimiento del *Agrobacterium tumefaciens*) con lo que se podía concluir que concentraciones de Timentín menores a la recomendada ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$) no eran suficientes para eliminar a esta agrobacteria, por lo que se realizó el experimento AT4.2 dejando la concentración de Timentín constante ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$) y realizando tratamientos con distintas concentraciones de higromicina como se puede observar en la metodología.

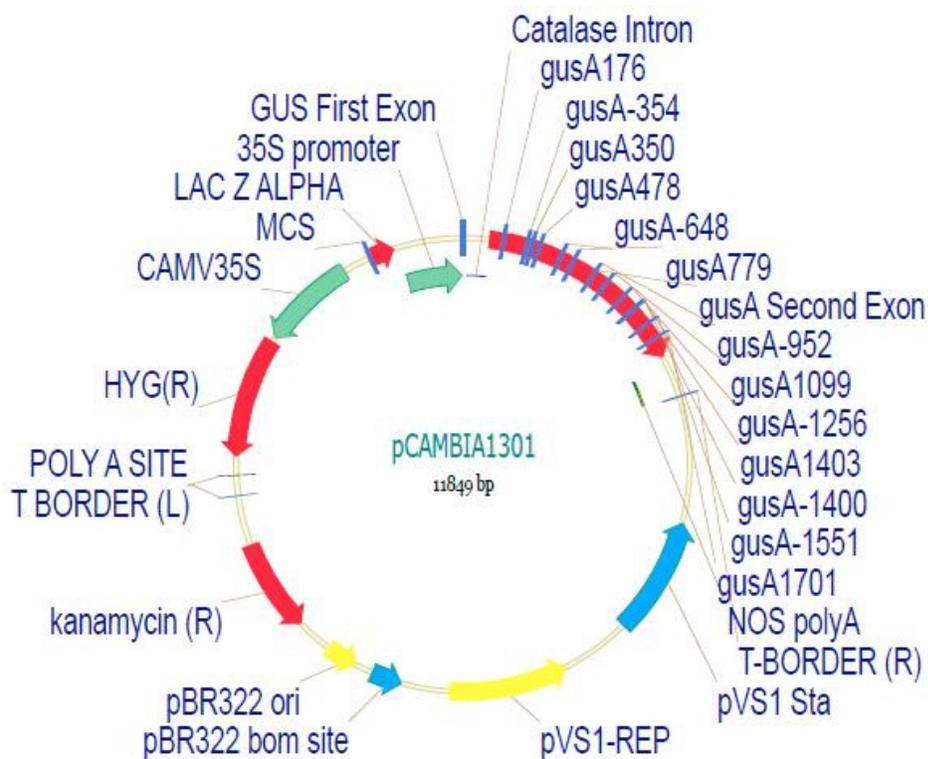
ESQUEMA DE REALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO



Fuente: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Laboratorio de Biología Molecular.

APÉNDICE 2

MAPA DEL VECTOR pCAMBIA1301.



Fuente: www.cambia.org

Vector pCambia1301 con el gen reportero *uidA*^{INT} (GUS) con el intrón de la catalasa, activado por el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CAMV35S). Este vector contiene el gen de resistencia a la higromicina como agente de selección de eventos transgénicos.

APÉNDICE 3

AISLAMIENTO DE ADN GENÓMICO DE CÉLULAS EMBRIOGÉNICAS DE BANANO.

Combinación de los Protocolos de Aislamiento de ADN de DellaPorta *et al.* [38] y Aljanabi *et al.* [38, 39] modificados por Santos-Ordóñez [5].

1. Tomar 50 mg de tejido liofilizado o 100-300 mg de tejido fresco.
2. Pulverizar el tejido fresco usando nitrógeno líquido hasta obtener un polvo muy fino en un mortero y transferir a un tubo de Eppendorf de 2 mL.
3. Adicionar 1 mL del buffer de extracción (concentración final):
 - 100mM Tris pH 8.0
 - 50mM EDTA
 - 500 mM NaCl
 - 10 mM β -Mercaptoetanol (0.7 μ l de 99.9% de pureza)
 - 2% PVP10.000
4. Adicionar 80 μ l (53 μ l) 20% (30%) **SDS** (sodium dodecyl sulphate, 1.32% final), vortex e **incubar por 10 min a 55°C**.
5. Adicionar 330 μ l 5 M **K-Ac** (acetato de potasio 1.17 M final), vortex brevemente, centrifugar por 10 min a 12.000 rpm a 4°C
6. Remover sobrenadante (SN) evitando los debris.

7. Adicionar 750 μL de 6M NaCl, vortex por 30 segundos.
8. Adicionar RNasa ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$ concentración final) al SN por 15 min a 37°C .
9. Centrifugar a 12,000 rpm por 10 min a 4°C y transferir el SN a un nuevo tubo Eppendorf (resistente a cloroformo).
10. Adicionar un volumen igual de cloroformo:isoamilalcohol (24:1) e invertir muchas veces el tubo. Centrifugar a 12,000 rpm por 5 min y transferir la fase acuosa superior a un nuevo tubo.
11. Adicionar un volumen igual de **isopropanol** al SN, mezclar bien e incubar las muestras a -20°C por lo menos por 30 min (menos tiempo a menos temperatura). El protocolo puede pararse aquí, y las muestras almacenarlas en el congelador (-20°C).
12. Centrifugar a 12.000 rpm a 4°C por 20 min.
13. Lavar el pellet con **70% etanol** (centrifugar por 5 min a 4°C) y secar brevemente.
14. Disolver el pellet en 50-300 de agua ultrapura o buffer TE (Tris-EDTA).
15. Determinar concentración y calidad de ADN mediante gel de garosa y/o espectrofotómetro.

APENDICE 4

TABLA DE RESULTADOS DEL ANÁLISIS FLUOROMÉTRICO.

Temp.	mg Tejido	Constructo	Medio	Concentración de proteínas. (µg/ml; 30/11/2006)	Ensayo MUG	µM MU/ pocillo	µM MU /muestra	nM MU/ muestra	1.0 h x prot conc	Actividad GUS (pmol/h x µg protein)	Actividad GUS		
											Promedio (pmol/h x µg protein)	DE	ES
37°C	~150	pcambia1301	zz	852,9653333	08/07/2009	1,0599	105,992	105992	852,97	124,2626	58,37719	43,047	14,3488491
37°C	~150	pcambia1301	zz	1288,869667	13/07/2009	1,4099	140,992	140992	1288,9	109,3917			
37°C	~150	pcambia1301	zz	928,4383333	14/07/2009	1,0057	100,567	100567	928,44	108,3181			
37°C	~150	pcambia1301	zz	1732,283333	22/07/2009	0,387	38,7	38700	1732,3	22,34046			
37°C	~150	pcambia1301	zz	2785,074667	22/07/2009	0,3306	33,0625	33063	2785,1	11,87132			
37°C	~150	pcambia1301	zz	1153,736333	13/08/2009	0,5207	52,0667	52067	1153,7	45,12874			
37°C	~150	pcambia1301	zz	2039,903	13/08/2009	0,6877	68,7667	68767	2039,9	33,71075			
37°C	~150	pcambia1301	zz	1289,498667	14/08/2009	0,5275	52,75	52750	1289,5	40,90737			
37°C	~150	pcambia1301	zz	2425,019667	14/08/2009	0,7145	71,45	71450	2425	29,46368			
37°C	~150	pcambia1391z	zz	829,629	08/07/2009	0	0	0	829,63	0	0	0	0
37°C	~150	pcambia1391z	zz	1115,635333	13/07/2009	0	0	0	1115,6	0			
37°C	~150	pcambia1391z	zz	853,4833333	14/07/2009	0	0	0	853,48	0			
37°C	~150	pcambia1391z	zz	1040,073667	22/07/2009	0	0	0	1040,1	0			
37°C	~150	pcambia1391z	zz	2978,558667	22/07/2009	0	0	0	2978,6	0			
37°C	~150	pcambia1391z	zz	826,7463333	13/08/2009	0	0	0	826,75	0			
37°C	~150	pcambia1391z	zz	2025,714333	13/08/2009	0	0	0	2025,7	0			
37°C	~150	pcambia1391z	zz	2419,334333	14/08/2009	0	0	0	2419,3	0			
37°C	~150	control 1	zz	1371,086	13/08/2009	0	0	0	1371,1	0	0	0	0
37°C	~150	control 1	zz	1834,987333	14/08/2009	0	0	0	1835	0			
37°C	~150	control 2	zz	830,9383333	13/08/2009	0	0	0	830,94	0	0	0	0
37°C	~150	control 2	zz	1123,694	14/08/2009	0	0	0	1123,7	0			

Fuente: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Laboratorio de Biología Molecular.

APÉNDICE 5

TABLA DE RESULTADOS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL.

Repeticiones		tratamientos				
		1	2	3	4	5
1		234	129	0	1	0
2		211	184	71	0	0
3		225	179	83	0	0
4		180	155	58	0	0
5		207	146	97	0	0
6		226	72	53	0	0
7		197	193	85	0	0
8		149	165	90	0	0
Σ tratamientos		1629	1223	537	1	0
Promedio de tratamientos		203,625	152,875	67,125	0,125	0
Promedio de tratamientos²		2653641	1495729	288369	1	0

Fuente: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Laboratorio de Biología Molecular.

APÉNDICE 6

PROTOCOLO ESTANDARIZADO DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE CÉLULAS EMBRIOGÉNICAS DE BANANO DE LA VARIEDAD 'WILLIAMS' (AAA) MEDIADA POR *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*.

CULTIVO Y PREPARACIÓN DE *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

Stocks de bacterias: son almacenados a -80°C en 20% de glicerol, en medio líquido con los antibióticos apropiados.

Sembrado: aislar colonias puras en medio sólido selectivo (con antibióticos apropiados) YM.

Contenido de medio YM:

NaCl:	0.1 g/L
MgSO ₄ •7H ₂ O:	0.2 g/L
K ₂ HPO ₄ •3H ₂ O:	0.5 g/L
Extracto de levadura:	0.4 g/L
Manitol:	10.0 g/L
Bactoagar:	1.3 %
pH:	7.0

Incubación: 28°C por 48 horas. Se puede mantener las placas a 4°C en almacenamiento temporal (máximo 1 semana).

Tubos de inoculación: contienen 3 mL de medio líquido YEP con los antibióticos apropiados con colonias puras de bacterias (en tubos de 15 mL). Incubar a 28°C y 210 rpm hasta obtener 1.2 unidades a un UDO₆₀₀ (30 horas aproximadamente). Unos 3 mL de medio son suficientes para media placa de infección luego de la dilución

Contenido de medio YEP:

Bacto Peptone: 10 g/L

Bacto Yeast Extract: 10 g/L

NaCl: 5 g/L

pH: 7.5

Dilución de bacterias cultivadas: centrifugar a 4500 rpm por 10 minutos, descartar el sobrenadante y suavemente resuspender el pellet en medio ZZ liquido esterilizado por filtro (pH 5.6 como mínimo) suplementar con acetosyringone (AS). La concentración final del acetosyringone debería ser 200 μ M desde una solución en stock preparada de DMSO a 500 mM (no debe estar esterilizada pero debería siempre recién preparada). Medir UDO_{600} , y ajustar con el medio citado a 0.4 unidades.

CO-CULTIVO DE AGROBACTERIUM TUMEFACIENS CON SUSPENSIONES CELULARES EMBRIOGÉNICAS DE BANANO

Placas de infección: Preparar placas rotuladas de 24-pocillos para infección añadiendo 200 μ L (usar puntas azules de pipeta cortadas) de 33% de suspensión de células embriogénicas en cada pocillo.

Infección: Cuidadosamente añadir 1 mL de la suspensión de bacteria diluida-inducida en cada pocillo de la placa de infección.

Condiciones de la infección: Incubar la placa de infección por 6 horas a 25°C y 25 rpm en oscuridad.

Co-cultivo en medio semisólido: Muy gentilmente pipetear la mezcla de las células usando puntas cortadas de pipeta y transferir a una malla de poliéster de 50 μm , ubicada en la cima de un grupo de papeles filtros esterilizados para remover el medio líquido. Transferir la malla de poliéster que contengan las células a las placas de co-cultivación.

Placas de co-cultivación: preparar medio semisólido ZZ. Tener cuidado al ajustar el pH a 5.9 luego de añadir el Phytigel. Después de autoclavar, dejar enfriar el medio hasta 60 °C y añadir AS a una concentración final de 200 μM . El pH final del medio debe ser 5.6. Usar 10 mL de medio por placa Petri de 5-cm de diámetro. Estas placas pueden ser preparadas el día antes del experimento y almacenadas a 4 °C.

Condiciones de Co-cultivacion: 21 °C en la oscuridad por 6-7 días.

Prueba de expresión temporal: preparar placas Petri de 5-cm de diámetro con papel filtro de un diámetro de 45 mm. Seis o siete días después de la infección, colocar la malla de poliéster con las células en la cima de los papeles filtro y saturar con 500 μL de solución X-Gluc (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1% ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolyl- β -glucuronico disuelto en DMSO, 0.5 mM ferrocianide, 0.5 mM ferricianide, 1% ácido ascórbico, 10 mM EDTA y 2%

CHAPS). Cerrar las placas y sellarlas bien con plástico adhesivo e incubar a 37°C por 4-5 horas. Contar el número de puntos azules bajo el microscopio binocular.

Selección de los transformantes: Empezar la selección en medio ZZ suplementado con Timentín (200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para la eliminación del *Agrobacterium* y el antibiótico selectivo higromicina (12.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) en placas Petri de 5-cm de diámetro. Incubar en oscuridad a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por 2-3 meses, con sub-cultivaciones cada 2 semanas. Transferir a medio RD1 suplementado con higromicina (12.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y mantener a 25°C por cuatro a seis semanas, para luego sub-cultivar los embriones en medio RD2 para regeneración de plantas (Timentín es usualmente no requerido para la eliminación de *Agrobacterium* luego de la selección en placas con ZZ).

BIBLIOGRAFÍA

- [1] TAZÁN CABEZAS L “ El cultivo del plátano en el Ecuador. Ministerio de Agricultura y Ganadería”. Subsecretaría Regional del Litoral, Sur y Galápagos. Editorial Raíces, Guayaquil, Ecuador. 72 p. 2003.
- [2] SWENNEN R, ARINAITWE G, CAMMUE BPA, François I, Panis B, Remy S, Sági L, Santos E, Strosse H, Van den houwe I “Transgenic approaches for resistance to *Mycosphaerella* leaf spot diseases in *Musa* spp”. Jacome L, Lepoivre P, Marin D, Ortiz R, Romero R, Escalant JV (ed.). *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. Proceedings of the 2nd International workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas. San José, Costa Rica, 20-23 May 2002. INIBAP, Montpellier, France: 209-238. Disponible en : <http://bananas.bioversityinternational.org/files/files/pdf/publications/mycosphaerella.pdf>
- [3] SÁGI L “Genetic engineering of Banana for disease resistance – Future Possibilities”. In: *Diseases of Banana, Abacá and Enset*. D.R. Jones, editor. CAB International, Wallingford, UK, 1999. pp. 465-515

- [4] SCHOUTEN HJ, KRENS FA, JACOBSEN E “Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants”: International regulations for genetically modified organisms should be altered to exempt cisgenesis, 2006. EMBO Reports 7: 750-753
- [5] SANTOS-ORDÓÑEZ EG “Characterization and isolation of T-DNA tagged banana promoters active during *in vitro* regeneration and low temperature stress”. Dissertationes de agricultura. Ph.D. thesis 787. Katholieke Universiteit Leuven, Belgium. Faculteit Bio-Ingenieurswetenschappen. 188 p. 2008.
- [6] SANTOS E., REMY R., THIRY E., WINDELINCKX S., SWENNEN R., SÁGI L., accepted. “Characterization and isolation of a T-DNA tagged banana promoter active during *in vitro* culture and low temperature stress”. BMC Plant Biology 9: 77. doi:10.1186/1471-2229-9-77
- [7] JONES D., “Diseases of Banana, Abacá and Enset”, 2000 CAB international, Wallingford, UK, pp 1-143.

- [8] (2002). *Manual agropecuario : tecnologías orgánicas de la granja integral autosuficiente*. Bogotá: Fundación Hogares Juveniles Campesinos; IBALPE. Pp 1093.
- [9] LUCÍN VIRGINIA, OCHOA ÁLVARO, Tesis Análisis de mercado de la industria del banano, Escuela Superior Politécnica del Litoral, 2009 Guayaquil-Ecuador. Pp. 114
- [10] IICA. 2004. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. Documento técnico para la competitividad de la cadena Plantación-Harina. Puré-Banano. [http://: www.iica-ecuador.org](http://www.iica-ecuador.org). (Visitado Diciembre 2009).
- [11] SICA, 2003. Servicio de información y censo agropecuario del Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador. Disponible en; [http://: www.sica.gov.ec](http://www.sica.gov.ec) (Consultado: Diciembre 2009)
- [12] MAURA LUIS, Tesis Manejo alternativo de Sigatoka Negra, utilizando biofertilizantes, en plantaciones comerciales de banano Cavendish, variedad Williams, cantón Taura, Escuela Superior Politécnica del Litoral, 2007 Guayaquil-Ecuador. Pp. 108.

- [13] Ex-Programa Nacional del Banano. 2001. El cultivo del Banano. SICA, Servicio de información y Censo Agropecuario del Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador Programa Nacional del Banano. http://www.sica.gov.ec/agronegocios/biblioteca/Ing%20Rizzo/perfiles_producto/banano.pdf (consultado; Diciembre 2009).
- [14] (2007) Control de plagas y enfermedades en los cultivos, Bogotá: Grupo Latino Editores, primera edición, Pp. 740.
- [15] TOMEKPÉ K., JENNY C., ESCALANT J.V.. 2004. In : Picq Claudine (ed.), Vézina Anne (ed.). First International congress on #Musa#: harnessing research for improved livelihoods, 6-9 July 2004, Penang, Malaysia. Abstract guide. Montpellier : INIBAP, p. 3. International Congress on Musa: Harnessing Research for Improved Livelihoods. 1, 2004-07-06/2004-07-09, Penang, Malaisie http://publications.cirad.fr/une_notice.php?dk=522131 visitado: 08/11/2009.

- [16] SHARROCK, S. L., HORRY, J. P. AND FRISON, E. A. 2001. The state of the use of Musa diversity. In: H.D. Cooper, C. Spillane and T. Hodgkin(eds.). Broadening the Genetic Base of Crop Production. IPGRI/FAO 2001. pp 223-243.
- [17] JACOBSEN E, SCHOUTEN HJ (2007) Cisgenesis strongly improves introgression breeding and induced translocation breeding of plants. Trends in Biotechnology 25: 219-223
- [18] FRANKLIN E. ROSALES* Y LUIS E. POCASANGRE*, Mejoramiento convencional de banano y plátano: Estrategias y logros. Memorias Acorbat Cartagena de Indias, Colombia 2002, Pp. 617.
- [19] Kirakosyan ARA, KAUFMAN PETER B. Recent Advances in Plant Biotechnology, Editor, Springer Science+ Business Media, LLC 2009.
- [20] LUIS HERRERA-ESTRELLA, JUNE SIMPSON, AND MIGUEL MARTÍNEZ TRUJILLO (2005), In: Transgenic Plants Methods and protocols, volumen 286. Peña Leandro, editor, Humana Press Inc. Pp. 437.

- [21] VALDERRAMA ANA M., ARANGO I. RAFAEL, AFANADOR K. LUCÍA, Transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*: “Ingeniería genética natural aplicada”. 2005, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellin. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Pp 17.
- [22] TZVI TZFIRA, CITOVSKY VITALY, (2008) *Agrobacterium* From Biology to Biotechnology, editor. Springer Science+Business Media, LLC, 233 Spring Street, New York, NY, USA. Pp 750.
- [23] EUGENIE WOYTOCICH ADRIENNE (1997), Investigation on genetic transformation of tobacco and canola with potential antifungal genes. Ph.D thesis Pp. 225.
- [24] MAYERHOFER, R., KONCZ-KALMAN, Z., NAWRATH, C, BAKKEREN, G., CRAMERI, A., ANGELIS, K., REDEI, G.P., SCHELL, J., HOHN, B. AND KONCZ, C. 1991. T-DNA integration: a mode of illegitimate recombination in plants. EMBO J. 10: 697-704.
- [25] ARINAITWE GEOFREY (2008), An improved *Agrobacterium*-Mediated transformation Method for Banana and Plantain (*Musa* spp), PhD. Thesis Pp 156.

- [26] MURILLO JESÚS, (2008) Herramientas biotecnológicas en fitopatología, Pallas Vicente, Escobar Carolina, Rodríguez Pablo y Marcos José, editors, Mundi-Prensa, Madrid-Barcelona, México. Pp 205-206.
- [27] HARBRON STUART, (2009), Molecular Biology and Biotechnology, 5th edition . Walker John M., Rapply Ralph, editors, RSC publishing, Cambridge, UK.
- [28] SÁNCHEZ NAVARRO JESÚS A, CUBERO JAIME Y PALLÁS VICENTE, (2008) Herramientas biotecnológicas en fitopatología, Pallas Vicente, Escobar Carolina, Rodríguez Pablo y Marcos José, editors, Mundi-Prensa, Madrid-Barcelona, México. Pp 241-242.
- [29] SILVA E. , “Diseños experimentales” Escuela Superior Politécnica del Litoral, Manual de estudiantes (2008), pp 14-15.
- [30] THOMAS M. LITTLE, F. JACKSON HILLS, “Métodos estadísticos para la investigación en la agricultura”, Trillas, Universidad de California (1991). Pp 235-243.

- [31] MONTGOMERY D., 1991 Diseño y Análisis de Experimentos, Grupo Editorial Iberoamérica. Pp 112-116.
- [32] MURASHIGE, T., SKOOG, F., "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures," *Physiologia Plantarum*, 15, 1962, pp. 473-497.
- [33] PÉREZ-HERNÁNDEZ, J. B., REMY, S., SWENNEN, R., AND SÁGI, L., "Banana (*Musa* sp.)," Wang K. (ed.), *Methods in Molecular Biology*, vol. 344: *Agrobacterium Protocols 2/e*, volume 2. Humana Press Inc., Totowa 2006, NJ, pp. 167-175.
- [34] JEFFERSON, R. A., KAVANAGH, T. A., AND BEVAN, M. W., "GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants," *EMBO Journal* 6, 1987, pp. 3901-3907.
- [35] REMY, S., THIRY, E., COEMANS, B., WINDELINCKX, S., SWENNEN, R., AND SÁGI, L., "Improved T-DNA vector for tagging plant promoters via high-throughput luciferase screening," *Biotechniques*, 38, 2005, pp. 763-70.

- [36] BENFEY, P. N., AND CHUA, N. H., "The cauliflower mosaic virus 35S promoter: combinatorial regulation of transcription in plants," *Science* 250, 1990, pp. 959-966.
- [37] CHEE W., JALIL M., ABDULLAH M., OTHMAN R., KHALID N., 'Comparison of β -glucuronidase expression and anatomical localization in bombarded immature embryos of banana cultivar Mas via biolistic transformation', *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 2005 Vol. 13 Pp. 15-22
- [38] DELLAPORTA SL, WOOD J, HICKS JB (1983) A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reports* 1: 19-21
- [39] ALJANABI, S. MARTINEZ, I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR- based techniques. *Nucleic Acids Research* 25. Pp. 4692 – 4693.