

CONTENIDO

P

ÍNDICE DE CUADROS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
APÉNDICE.....	iv
RESUMEN.....	v
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS.....	3
III. REVISIÓN DE LITERATURA	
3.1. Generalidades de la <i>Bixa orellana</i> L.....	4
3.2. Importancia económica.....	4
3.3. Plagas y enfermedades.....	6
3.4. Transformación de plantas.....	7
3.5. Métodos de transformación genética.....	9
3.5.1. Transferencia de genes mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	10
3.5.2. Método de cocultivo.....	11
3.6. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	13

3.6.1. Descripción general.....	13
3.6.2. Estructura del plásmido Ti.....	13
3.6.3. Transmisión de la región T a la planta.....	14
3.7. Vectores.....	17
3.7.1. Vectores co-integrativos.....	18
3.7.2. Vectores binarios.....	19
3.8. Marcadores de selección y genes reporteros.....	19
3.9. Transferencia directa de genes.....	21
3.9.1. Electroporación.....	22
3.9.2. Biobalística.....	23

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Material vegetal.....	25
4.2. Material de laboratorio.....	25
4.3. Componentes y reactivos.....	25
4.4. Preparacion de médios de cultivo.....	26
4.4.1. Medio de cultivo semisólido.....	26
4.4.2. Medio semisólido con antibioticos.....	26
4.4.3. Medio para cultivo bacteriano (Medio YEB).....	27
4.5. Asepsia de semillas.....	27
4.6. Condiciones de pregerminación.....	28

4.7. Germinación de semillas.....	28
4.8. Inducción de brotes.....	29
4.9. Enraizamiento de brotes.....	30
4.10. Transferencia de plantas a condiciones <i>ex vitro</i>	30
4.11. Curva de dosis-respuesta de concentraciones de kanamicina.....	31
4.12. Curva de dosis respuesta de claforán.....	32
4.13. Transformacion de <i>Agrobacterium</i> con el plásmido pBI.121 por electroporación.....	32
4.14. Cultivo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	33
4.15. Transformación de hipocótilos de <i>B. orellana</i> con la cepa transformada de <i>Agrobacterium</i>	34
4.16. Verificación de plantas transgénicas de achiote para el gen Gus.....	35
4.17. Manenimiento de brotes.....	38
V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	39
 VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
6.1. Asepsia de semillas.....	40
6.2. Condiciones de pregerminación.....	40
6.3. Germinación de semillas.....	40
6.4. Inducción de brotes.....	41

6.5. Enraizamiento de brotes.....	43
6.6. Transferencia de plantas enraizadas a condiciones ex vitro y siembra en campo.....	43
6.7. Dosis respuesta al antibiótico kanamicina.....	43
6.8. Curva de dosis respuesta de claforán.....	45
6.9. Transformación de <i>Agrobacterium</i> con el plásmido pBI.121 por electroporación.....	48
6.10. Transformación de hipocótilos de <i>Bixa orellana</i> L.....	49
6.10.1. Experimentos de transformación realizados con la cepa de <i>Agrobacterium</i> LBA 4404::pBI.121.....	49
6.10.2. Experimentos de transformación realizados con la cepa de <i>Agrobacterium</i> PGV 2260::pBI.121.....	52
6.11. Verificación de plantas transgenicas para el gen Gus.....	54
6.12. Mantenimiento de brotes.....	60
 VII. CONCLUSIONES.....	 61
 VIII. PERSPECTIVAS.....	 63
 IX. LITERATURA CITADA.....	 64

RESUMEN

Basándose en un sistema de regeneración de plantas *in vitro* de achiote (*Bixa orellana* L.) usando hipocótilos de dos semanas de edad, en el medio de Phillips y Collins, el cual fue suplementado con 1 mg-L^{-1} de bencil amino purina (6-BAP). Se estableció un protocolo de transformación para esta especie con *Agrobacterium tumefaciens*

Se utilizó el plásmido pBI.121 un vector de expresión en plantas que fue introducido a *Agrobacterium tumefaciens* vía electroporación, el cual contiene el gen Gus (β - glucuronidasa) bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor y el gen de la neomicina fosfotransferasa (*NPT II*).

En el proceso de transformación se usaron dos cepas de *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404: :pBI.121 y PVG 2260: :pBI.121, utilizándose hipocótilos de aproximadamente dos semanas de edad. Por los indicios de la formación de brotes en los experimentos realizados las variables que dieron mejores resultados fueron: 0.1 de densidad óptica , 15 minutos de infección y 48 horas de co-cultivo

La verificación de las potenciales transformantes obtenidas se realizó mediante la prueba histoquímica utilizando el reactivo X-glcA, con el que se demostró la expresión transitoria del gen Gus.