

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
I. INTRODUCCIÓN	5
Objetivo general	6
Objetivos específicos	6
Hipótesis	6
II. REVISIÓN DE LITERATURA	7
2.1. Achiote (<i>Bixa orellana</i>)	7
2.1.1. Clasificación taxonómica	8
2.1.2. Descripción botánica	8
2.1.3. Floración y fructificación	9
2.1.4. Propagación	10
2.1.5. Plagas y enfermedades	11
2.1.6. Cosecha	12

2.1.7. Rendimiento	13
2.1.8. Importancia económica	14
2.1.9. Usos medicinales	16
2.2. Pigmentos carotenoides	17
2.2.1. Bixina	18
2.3. Ingeniería genética de plantas	20
2.4. Transformación genética de plantas	23
2.4.1. Bombardeo por micropartículas	24
2.4.2. Electroporación	25
2.4.3. Transferencia de genes mediada por <i>Agrobacterium</i>	26
2.5. Vectores	27
2.6. Plásmidos	28
2.6.1. Vectores usados en <i>Agrobacterium</i>	29
2.6.2. Vectores co-integrativos	30
2.6.3. Vectores binarios o autónomos	32
2.6.3.1. Promotores	35
2.6.3.2. Marcadores de selección	37
2.6.3.3. Genes reporteros	39
2.6.3.4. La β -glucuronidasa (GUS)	40
2.6.3.5. Sitio múltiple de clonación	41
2.6.3.6. Borde izquierdo y derecho del ADN-T	42

2.7. Influencia del AgNO ₃ en la expresión transitoria del gen <i>uidA</i>	43
2.8. Bacteriófagos	44
2.9. Cósmidos	45
2.10. Opinas	46
2.10.1. Nopalina	47
2.10.2. Octopina	49
2.10.3. Agropina	50
2.11. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	52
2.11.1. Proceso de infección	53
III. MATERIALES Y MÉTODOS	59
3.1. Material vegetal	59
3.1.1. Asepsia y germinación	60
3.2. Medios de cultivo	61
3.3. Cepas bacterianas	61
3.3.1. Transformación de las cepas bacterianas con el plásmido CAMBIA 2301.	63
3.3.2. Aislamiento y purificación del ADN plasmídico (minipreparaciones)	66

3.4. Transformación de achiote (<i>B. orellana</i>) con las cepas LBA4404, EHA105 y C58C1 transformadas con el pCAMBIA 2301	68
3.4.1. Crecimiento y preparación del inóculo bacteriano para la transformación	69
3.4.2. Proceso de transformación	70
3.5. Detección histoquímica de la actividad transitoria de la β -glucuronidasa (GUS)	71
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	73
4.1. Transformación de las cepas LBA4404, EHA105 y C58C1 con el pCAMBIA 2301	73
4.2. Transformación de <i>B. orellana</i> con el pCAMBIA 2301	75
4.2.1. Expresión transitoria del gen <i>uidA</i> a los 3 días	75
4.2.2. Expresión transitoria del gen <i>uidA</i> a los 12 días.	83
4.2.3. Expresión transitoria cualitativa del gen <i>uidA</i>	97
V. CONCLUSIONES	101
VI. LITERATURA CITADA	103
APÉNDICE	115

RESUMEN

El achiote (*Bixa orellana* L.) es un cultivo económicamente importante ya que contiene la bixina, un pigmento usado en la industria alimenticia y medicinal. Su mejoramiento genético por cruzamiento tradicional está restringido por su heterogeneidad y lento crecimiento, por lo cual una alternativa es la transformación vía *Agrobacterium tumefaciens*. En este trabajo se inocularon explantes de hipocotilos de achiote con tres cepas de *A. tumefaciens*; EHA105 (Succinamopina), LBA4404 (Octopina) y C58C1 (Nopalina) transformadas con el plásmido CAMBIA 2301 conteniendo el gen *uidA* (GUS) con un intrón para su expresión en células eucarióticas (vegetales). Durante el proceso de transformación se examinó la influencia del AgNO_3 en la transferencia del ADN-T a las células vegetales mediante cuatro tratamientos a los 3 y 12 días. El tratamiento 2 (AgNO_3 en medio de germinación) (1328 puntos azules/explante) a los 3 días y el tratamiento 3 (AgNO_3 en medios de infección, cocultivo e inducción de brotes) (1072 puntos azules/explante) a los 12 días, mostraron la actividad más alta de GUS. Estos resultados sugieren que el AgNO_3 incrementa la transferencia del ADN-T a las

células de achiote a los 3 días cuando se encuentra en el medio de germinación. Y a los 12 días cuando se encuentra únicamente en los medios de infección, cocultivo e inducción de brotes. Por el contrario si el AgNO_3 es usado en todos los medios, se inhibe la transferencia del ADN-T. La mayor actividad de GUS se observó en las cepas EHA105 y LBA4404. Seleccionándose LBA4404 (octopina) debido a su fácil eliminación con el antibiótico cefotaxima en el medio de inducción de brotes. Por lo que se sugiere a LBA4404 como la cepa más adecuada para la transformación de achiote.