



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
DIRECCIÓN GENERAL DE INSTITUTOS TECNOLÓGICOS
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE MÉRIDA

ITM

**"ACTIVIDAD ENDÓGENA TIPO β -GLUCURONIDASA
EN TEJIDOS DE COCOTERO (*Cocos nucifera L.*)**

OPCIÓN I

(TESIS PROFESIONAL)

**PARA OPTAR AL GRADO DE:
INGENIERO BIOQUÍMICO**

**PRESENTA:
JOSÉ EFRAÍN RAMÍREZ BENÍTEZ**

**MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO
2003**

CONTENIDO

| | Página |
|--|--------|
| ÍNDICE DE FIGURAS | iii |
| ÍNDICE DE CUADROS | v |
| ABREVIATURAS | vi |
| RESUMEN | vii |
| | |
| CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| | |
| 1.1. REVISIÓN DE LITERATURA | 4 |
| 1.1.1. <i>EL COCOTERO</i> | 4 |
| 1.1.1.1. DESCRIPCIÓN TAXONÓMICA | 4 |
| 1.1.1.2. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA | 4 |
| 1.1.1.3. VARIEDADES DEL COCOTERO EN MÉXICO | 10 |
| 1.1.2. <i>CULTIVO DEL COCOTERO</i> | 14 |
| 1.1.2.1. IMPORTANCIA Y UTILIDAD DEL CULTIVO | 14 |
| 1.1.2.2. PROBLEMÁTICA DEL COCOTERO EN MÉXICO | 15 |
| 1.1.2.3. ALTERNATIVAS DE SOLUCIÓN | 17 |
| 1.1.3. <i>TRANSFORMACIÓN GENÉTICA</i> | 19 |
| 1.1.3.1. DEFINICIÓN | 19 |
| 1.1.3.2. GENES REPORTEROS | 20 |
| 1.1.4 <i>ACTIVIDAD ENDÓGENA TIPO β-GLUCURONIDASA (GUS) EN PLANTAS</i> | 23 |
| | |
| 1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 26 |
| | |
| 1.3. OBJETIVOS | 27 |
| 1.3.1 <i>OBJETIVOS GENERALES</i> | 27 |
| 1.3.2. <i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i> | 27 |
| | |
| 1.4. HIPÓTESIS | 28 |

| | Página |
|--|-----------|
| CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS | 29 |
| 2.1. MATERIAL VEGETAL | 29 |
| 2.2. TINCIÓN HISTOQUÍMICA PARA β-GLUCURONIDASA | 30 |
| 2.3. MÉTODO HISTOLÓGICO | 31 |
| 2.4. ENSAYO FLUOROMÉTRICO PARA β-GLUCURONIDASA | 32 |
| CAPÍTULO III. RESULTADOS | 36 |
| 3.1. CARACTERIZACIÓN HISTOQUÍMICA DE LA ACTIVIDAD TIPO β-GLUCURONIDASA | 36 |
| 3.2. ENSAYO FLUOROMÉTRICO DE LA ACTIVIDAD TIPO β-GLUCURONIDASA | 49 |
| 3.3. EFECTO DEL pH EN LA ACTIVIDAD ENDÓGENA TIPO β-GLUCURONIDASA EN TEJIDOS DE <i>Cocos nucifera</i> L | 51 |
| 3.4. EFECTO DEL METANOL EN LA ACTIVIDAD ENDÓGENA TIPO β-GLUCURONIDASA EN TEJIDOS DE <i>Cocos nucifera</i> L. | 58 |
| CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN GENERAL | 60 |
| CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 65 |
| BIBLIOGRAFÍA | 67 |

RESUMEN

El cocotero (*Cocos nucifera L.*), palma intertropical característica y fuente de recursos para el hombre desde tiempos inmemoriales (Fremond et al, 1975), actualmente se encuentra amenazada por el Amarillamiento Letal (AL), enfermedad que año con año devasta cientos de hectáreas cultivadas en todo el mundo. Se han propuesto diferentes estrategias de solución, siendo la transformación genética una alternativa que ofrece la posibilidad de generar individuos genéticamente estables resistentes a la enfermedad mediante la inserción de genes cuya expresión involucre algún mecanismo bioquímico para la eliminación o inhibición del patógeno. El éxito en la transformación de especies vegetales depende en gran medida en la habilidad para identificar y seleccionar tales individuos de una población los cuales expresen los genes introducidos, generalmente mediante la inserción de genes reporteros en las células transformadas. Entre estos últimos, uno de los más populares y versátiles es el gen *uidA* que codifica la síntesis de la enzima β -glucuronidasa (GUS), la cual en presencia de sustratos adecuados (glucurónidos), es posible medir su actividad enzimática tanto cualitativa como cuantitativamente. Esta enzima es sumamente estable en valores de pH elevados y en presencia de disolventes orgánicos. Sin embargo, se ha observado en callos proembriogénicos de cocotero la presencia de cierta actividad tipo β -glucuronidasa, lo cual representaría una limitante en el uso del gen *uidA* en un protocolo de transformación de esta especie.

En el presente estudio se encontró que la actividad tipo β -glucuronidasa se encuentra en inflorescencia inmadura, polen y embrión de plantas de cocotero, así como en callos proembriogénicos, hojas y raíces de cultivos in vitro de la misma especie. Se comprobó que la respuesta tipo GUS al 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -glucurónido era mayor en inflorescencia

inmadura, polen, embrión y callo embriogénico. La magnitud de la actividad tipo GUS en callos embriogénicos es considerable.

Tanto la elevación del pH como la adición de metanol al 20 % en la solución de tinción histoquímica para GUS no tuvieron efecto considerable en polen y callos proembriogénicos, por lo que el uso del gen *uidA* en la transformación de estos tejidos no es factible ante la imposibilidad de distinguir entre tejidos transformados y no transformados.