

ÍNDICE

DECLARACIÓN	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE	v
ÍNDICE DE CUADROS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ABREVIATURAS	ix
RESUMEN	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. HIPÓTESIS	3
III. OBJETIVOS	3
3.1. General.	3
3.2. Específicos.	3
IV. REVISIÓN DE LITERATURA	4
4.1. Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	4
4.1.1. Clasificación taxonómica	5
4.1.2. Descripción botánica	5
4.1.3. Usos e importancia económica	6
4.1.4. Plagas y enfermedades	8
4.2. Microtomate..	9
4.3. Transformación genética de plantas	10
4.3.1. Métodos de transferencia directa de ADN	11

4.3.2.	Método de Transferencia indirecta mediada por <i>A. tumefaciens</i>	12
4.4.	Funcionamiento del sistema <i>Agrobacterium</i>	14
4.4.1.	Reconocimiento célula-célula	16
4.4.2.	Señales de la planta	16
4.4.3.	Activación transcripcional	16
4.4.4.	Transducción de señales	17
4.4.5.	Metabolismo del ADN-T	17
4.4.6.	Transporte intracelular	17
4.4.7.	Importe nuclear	18
4.4.8.	Integración del ADN-T	18
4.5.	Propiedades de la planta que afectan la transformación mediada por <i>A. tumefaciens</i>	19
V.	MATERIALES Y METODOS	21
5.1.	Material biológico	21
5.2.	Asepsia y germinación	22
5.3.	Medios de cultivo	22
5.4.	Transformación de EHA105 CON EL PLÁSMIDO cambia2301 ...	23
5.4.1.	Aislamiento y purificación del ADN plasmídico	23
5.5.	Transformación de microtomate con la cepa EHA105 transformada con pCAMBIA2301	24
5.5.1.	Preparación del inóculo	24
5.5.2.	Proceso de transformación	24
5.5.3.	Selección y regeneración	24
5.5.4.	Detección histoquímica de la β -glucuronidasa (GUS)..	26
5.6.	Evaluación de la transformación y regeneración de Microtomate...	27
5.7.	Análisis de datos	27
VI.	RESULTADOS	28

6.1.	Transformación de la cepa EHA105 con el pCAMBIA 2301	28
6.2.	Selección y regeneración de los explantes en los medios D1 y D2..	29
6.3.	Confirmación de la actividad de β -glucuronidasa (GUS)	30
6.4.	Evaluación de la transformación y regeneración de Microtomite ...	34
VII.	DISCUSIÓN	36
7.1.	Selección y regeneración	36
7.2.	Confirmación de la actividad de GUS	38
7.3.	Evaluación de la transformación y regeneración de Microtomite.....	40
VIII.	CONCLUSIÓN	41
IX.	PERSPECTIVAS	42
X.	REFERENCIAS	43
XI.	APÉNDICE	51

RESUMEN

En el presente estudio se inocularon explantes de hoja cotiledonaria de microtomate con la cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens* transformada con el plásmido CAMBIA 2301, el cual contiene el gen *uidA* (GUS) con un intrón. Se evaluó el efecto de la combinación de dos factores: tiempo de inoculación (infección) y tiempo de cocultivo, en la transformación de los explantes de microtomate utilizando 16 tratamientos. De acuerdo a una Anova para un diseño bifactorial, los diferentes tiempos de inoculación tuvieron un efecto significativo en la expresión de GUS en los brotes ($P < 0.01$), al igual que los tiempos de incubación en cocultivo ($P < 0.01$). Sin embargo, la interacción de los dos factores no tuvo un efecto significativo en la expresión de GUS ($P > 0.05$). En la prueba de comparación múltiple de Duncan, los tiempos de inoculación que mejor resultado dieron fueron los de 30 y 40 min y los mejores tiempos de cocultivo fueron de 24 y 48 h ($P < 0.05$), lo que nos sugiere que un incremento en estos tiempos aumenta la eficiencia de la transformación. Dado que la interacción no fue significativa, se tomaron las frecuencias de transformación, donde el tratamiento P, de 40 minutos de inoculación y 48 horas de cocultivo, tuvo el valor más alto de transformación (59.1%). Al evaluar posteriormente el protocolo, utilizando el tratamiento P, se obtuvo una frecuencia de regeneración de brotes de un 87.1% y una frecuencia de transformación de hasta 67.4%. Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que se obtuvo un protocolo de transformación genética vía *A. tumefaciens* eficiente y reproducible para microtomate.