

## ÍNDICE

<b>DECLARACIÓN</b> .....	i
<b>DEDICATORIA</b> .....	ii
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	iii
<b>ÍNDICE</b> .....	v
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	viii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>ABREVIATURAS</b> .....	ix
<b>RESUMEN</b> .....	x

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II. HIPÓTESIS</b> .....	3
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	3
3.1. General. ....	3
3.2. Específicos. ....	3
<b>IV. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	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. Micromate.....	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
<b>V.</b>	<b>MATERIALES Y METODOS</b> .....	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 $\beta$ -glucuronidasa (GUS)..	26
5.6.	Evaluación de la transformación y regeneración de Microtomate...	27
5.7.	Ánalisis de datos .....	27
<b>VI.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	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 $\beta$ -glucuronidasa (GUS) .....	30
6.4.	Evaluación de la transformación y regeneración de Microtomate ...	34
<b>VII.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>36</b>
7.1.	Selección y regeneración .....	36
7.2.	Confirmación de la actividad de GUS .....	38
7.3.	Evaluación de la transformación y regeneración de Microtomate....	40
<b>VIII.</b>	<b>CONCLUSIÓN</b> .....	<b>41</b>
<b>IX.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>42</b>
<b>X.</b>	<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>43</b>
<b>XI.</b>	<b>APÉNDICE</b> .....	<b>51</b>

## 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.