

## ÍNDICE

	PÁGINA
RESUMEN	
1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES	3
2.1 Importancia del banano y el plátano	3
2.2 Genero <i>Musa</i>	4
2.2.1 Taxonomía	4
2.2.2 Descripción botánica	6
2.2.3 Enano Gigante	9
2.3 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	10
2.3.1 Mecanismo de infección de <i>A. tumefaciens</i>	11
2.4 Ingeniería Genética	15
2.5 Transformación genética de plantas	15
2.5.1 Métodos de transformación genética	17
2.5.1.1 Transformación mediada por <i>A. tumefaciens</i>	17
2.5.1.1a Método de cocultivo	18
2.5.1.2 Transferencia directa de genes	18
2.5.1.2a Bombardeo por micropartículas	18
2.5.1.2b Microinyección	19
2.5.1.2c Electroporación	20
2.6 Plásmidos	21
2.6.1 Plásmido binario pCambia 2301	21
2.6.2 Plásmido auxiliar pCH32	22
2.6.3 Plásmido binario BIBAC	23
2.7 Vectores usados en <i>A. tumefaciens</i>	24
2.7.1 Vectores binarios o autónomos	25
2.8 Promotores	25

2.9 Marcadores de selección	26
2.10 Genes Reporteros	26
2.11 La $\beta$ -glucuronidasa	27
2.12 Mantenimiento y propagación de tejido meristemático	28
2.13 Amplificación del ADN por PCR	29
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>30</b>
3.1 Objetivo General	31
3.2 Objetivos Particulares	31
<b>4 MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>32</b>
4.1 Mantenimiento y propagación de tejido meristemático	32
4.2 Cepa de <i>A. tumefaciens</i> y vectores	32
4.2.1 Preparación del cultivo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	33
4.3 Transformación genética con <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	34
mediante cocultivo	
4.4 Eliminación de <i>A. tumefaciens</i> y regeneración de explantes transformados	34
4.5 Determinación histoquímica de la actividad de GUS	35
4.6 Actividad específica de la $\beta$ -glucuronidasa	36
4.7 Extracción de ADN de los explantes para pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	36
4.8 Digestión de ADN genómico para análisis de PCR	37
4.9 Amplificación del ADN genómico por PCR	38
<b>5 RESULTADOS Y DISCUSIONES</b>	<b>40</b>
5.1 Mantenimiento y propagación de tejidos meristemáticos de banano Enano Gigante	40
5.2 Transformación de tejido meristemático de banano Enano Gigante por cocultivo	40

5.3 Eliminación de <i>A. tumefaciens</i> de los explantes sometidos a cocultivo	41
5.4 Determinación histoquímica de la actividad de GUS	42
5.5 Actividad específica de la $\beta$ -glucuronidasa	44
5.6 Aislamiento de ADN genómico de explantes de banano Enano Gigante sometidos a cocultivo	45
5.7 Digestión de ADN genómico con enzimas de restricción	47
5.8 Amplificación por PCR de fragmentos del gen <i>NPTII</i> y <i>GUS</i>	47
6 CONCLUSIONES	50
7 BIBLIOGRAFÍA	51
8 ANEXOS	57

## RESUMEN

El banano junto con el plátano representan en importancia el cuarto cultivo como fuente de alimento debido a que se consumen en muchos países del mundo (May *et al.*, 1995). Los cultivares de banano tienen la característica de ser estériles por lo cual su mejoramiento convencional es complicado, no obstante, el método de transformación por cocultivo mediante *Agrobacterium tumefaciens*, se presenta como una alternativa para la integración de nuevas características génicas que permitan su mejoramiento. Para esto se recurrió al establecimiento de un protocolo para la transformación genética de banano Enano Gigante.

En primer lugar los tejidos meristemáticos de banano Enano Gigante fueron mantenidos y subcultivados de acuerdo a la metodología descrita por Shoofs (1997), utilizando el medio MS (Murashige y Skoog, 1962). Para la propagación de los explantes se transfirieron puntas de brotes no diferenciados o yemas cortadas provenientes de los scalps a medio MS. Posteriormente se continuó con la transformación mediada por *A. tumefaciens*; para esto se utilizó la cepa EHA105 conteniendo diferentes combinaciones de vectores binarios y un vector auxiliar, siendo estos *A. tumefaciens* EHA105 con pCambia 2301, *A. tumefaciens* EHA105 con pCambia 2301 y pCH32, y *A. tumefaciens* EHA105 con el vector binario BIBAC2.

La realización de ensayos preliminares de transformación con *Agrobacterium* por cocultivo, permitieron establecer las siguientes condiciones de transformación: 18 horas de inducción con acetosiringona 100  $\mu$ M y 2 h de cocultivo.

Para detectar la transformación del tejido se empleo el método colorimétrico de la actividad de Gus (ácido 5 bromo 4 cloro 3 indolil  $\beta$ -D- glucurónido). Los ensayos de la prueba histoquímica de GUS permitieron observar actividad de  $\beta$ -glucuronidasa en los tres sistemas de vector-bacteria ensayados. Los explantes positivos a la prueba de GUS se sometieron a la reacción en cadena de la polimerasa con el objetivo de amplificar el ADN correspondiente al T-ADN, por lo que fue necesario la extracción del ADN de los explantes positivos a GUS. Esto confirmó la transformación de los explantes positivos a GUS con un 83.33% de muestras positivas con el sistema *A. tumefaciens* EHA105 con pCambia 2301 y pCH32.