

SEP

SEIT

**DIRECCIÓN GENERAL DE EDUCACIÓN TECNOLÓGICA
AGROPECUARIA**

INSTITUTO TECNOLÓGICO AGROPECUARIO No. 2
“Ing. José Alberto Navarrete Ruiz”

**TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE SUSPENSIONES
CELULARES EMBRIOGÉNICAS DE *Musa acuminata* CV
ENANO GIGANTE POR *Agrobacterium tumefaciens*.**

TESIS

que presenta:

MARÍA NATIVIDAD RODRÍGUEZ CAN

Como requisito parcial para obtener el título de:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA



Conkal, Yucatán, México

2004

08/11/04

CONTENIDO

	Pág.
Índice de cuadros	vii
Índice de figuras	viii
RESUMEN	ix
SUMMARY	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Generalidades de Plátanos y Bananos	3
2.2. Clasificación taxonómica	5
2.3. Importancia del cultivo	7
2.4. <i>Musa acuminata</i> AAA cv. Enano Gigante	9
2.5. Cultivo de Tejidos Vegetales	10
2.5.1. Cultivo de células en suspensión	11
2.6. Generalidades de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	12
2.6.1. Proceso de infección de <i>A. tumefaciens</i>	13
2.7. Plásmidos	18
2.7.1. Vector binario pCambia 2301	18
2.7.2. Vector binario BIBAC2	19
2.7.3. Vector binario pCLDO4541	20
2.8. Transformación de plantas	21
2.8.1. Método de cocultivo	22
2.8.2. Marcadores de selección y genes reporteros.	23
2.9. Amplificación de ADN por la técnica de PCR.	25
III. OBJETIVOS	26
3.1. Objetivo general	26
3.2. Objetivos particulares	26
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	27
4.1. Ubicación del área de trabajo	27
4.2. Material vegetal	27
4.3. Mantenimiento y subcultivos de las suspensiones celulares	27

4.4. Metodología del cultivo de la bacteria	28
4.4.1. cultivo de la <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	29
4.5. Transformación con <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	29
4.5.1. Determinación de transformación por la actividad de Gus	32
4.6. Amplificación de ADN por PCR	33
4.7. Verificación por PCR de la ausencia de <i>A. tumefaciens</i>	34
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
5.1. Mantenimiento y subcultivos de las suspensiones celulares	35
5.2. Transformación con <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	36
5.3. Determinación de transformación por la actividad de Gus.	40
5.4. Amplificación de ADN por PCR	42
VI. CONCLUSIONES	45
VII. LITERATURA CITADA.	46
VIII. APÉNDICE.	54

RESUMEN

Estos cultivos son de gran importancia socioeconómica a nivel mundial, debido a la gran cantidad de variedades que se utilizan como alimento básico para millones de personas en muchos países en vías de desarrollo (Dion *et al*, 2002). Uno de los grandes problemas de estos cultivos es que tienen la característica de ser estériles y su mejoramiento convencional resulta sumamente complicado; además de ser seriamente amenazados por la incidencia de numerosas plagas y enfermedades.

Por tal motivo, el presente trabajo se realizó con la finalidad de brindar alternativas para la integración de genes con características que permitan su mejoramiento. En este trabajo se utilizó la infección con *Agrobacterium tumefaciens* para la transformación de suspensiones celulares embriogénicas de *Musa acuminata* cv. Enano gigante. En el cual se utilizaron células en suspensión que fueron subcultivadas con medio Ma2 utilizando el método descrito por Lerma *et al.*, (2002). Para la transformación se utilizaron las cepas C58C1 con el vector PCLDO4541::115 kb de ADN genómico de Calcuta IV y con el vector BIBAC2::50 kb de ADN genómico de Calcuta IV y la cepa EHA105 con el vector pCambia 2301. Permitiendo establecer las siguientes condiciones de transformación: 30min de cocultivo con 50 μ M de acetosiringona y 1.5 de D.O₆₀₀ bacteriana ; o bien 12 hr de cocultivo sin acetosiringona utilizando 1 de D.O₆₀₀ bacteriana.

Para detectar la transformación se utilizó el método colorimétrico de la actividad de Gus; al igual que la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con el objetivo de amplificar el ADN correspondiente al T-ADN. Ambas pruebas confirmaron la transformación positiva de las células.