

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVO GENERAL	5
2.1 Objetivos Específicos	5
3. HIPÓTESIS	6
4. REVISIÓN DE LITERATURA	7
4.1 Generalidades de la Familia <i>Agavaceae</i>	7
4.2 Uso de <i>Agave tequilana</i> Weber var. azul	7
4.3 Propagación de <i>Agave tequilana</i> Weber var. azul	8
4.4 Mejoramiento genético convencional en <i>Agave tequilana</i> Weber var. azul	8
4.5 Mejoramiento genético <i>in vitro</i>	9
4.6 Transformación genética	10
4.7 Métodos de transformación genética	12
4.7.1 Sistema de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	12
4.7.2 Electroporación	14
4.7.3 Microinyección de ADN	14
4.7.4 Método de micro láser	14
4.7.5 Biobalística	14
4.8 Condiciones de bombardeo	16

4.9 Construcción de genes	17
5. METODOLOGÍA	18
5.1 Transformación genética mediante biobalística	18
5.1.1 Descripción del material biológico	18
5.1.2 Inducción de callos embriogénicos	18
5.1.3 Preparación del material biológico para el bombardeo	18
5.1.4 Descripción general del sistema PDS 1000-He®	19
5.1.5 Preparación de micropartículas de tungsteno	21
5.1.6 Descripción de los plásmidos	22
5.1.7 Recubrimiento de las micropartículas de tungsteno con ADN	25
5.1.8 Bombardeo	26
5.1.9 Prueba histoquímica de expresión transitoria	27
5.2 Selección del material transgénico	28
5.2.1 Estrategias de selección <i>in vitro</i>	28
5.2.2 Propagación del material transgénico y regeneración de plantas	28
5.3 Aplicación de herbicida	28
5.3.1 Plantas <i>in vitro</i>	28
5.3.2 Plantas en condiciones de invernadero	29
5.4 Análisis molecular del ADN en materiales transgénicos	30
5.4.1 Extracción del ADN genómico de callos y plantas transgénicas	30
5.4.2 Cuantificación de ADN genómico en <i>Agave tequilana</i>	32
5.4.3 Transferencia del ADN transgénico mediante la técnica Southern	33
5.4.4 Hibridación del ADN transgénico	37
5.5 Experimentos de transformación	39
5.5.1 <u>Experimento 1</u>	40

5.5.2 <u>Experimento 2</u>	40
5.5.3 <u>Experimento 3</u>	41
5.5.4 Manejo estadístico de los datos	41
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
6.1 Preparación del material biológico	42
6.2 Bombardeos y prueba histoquímica de expresión transitoria	43
6.2.1 <u>Experimento 1</u>	43
6.2.2 <u>Experimento 2</u>	45
6.2.3 <u>Experimento 3</u>	47
6.3 Selección y propagación del material transgénico	50
6.3.1 <u>Experimento 1</u>	53
6.3.2 <u>Experimento 2</u>	53
6.3.3 <u>Experimento 3</u>	54
6.4 Aplicación de herbicidas	57
6.4.1 Comprobación de resistencia <i>in vitro</i>	57
6.4.2 Comprobación de resistencia <i>ex vitro</i>	60
6.5 Análisis molecular del ADN	63
7. CONCLUSIONES	68
8. BIBLIOGRAFÍA	70
9. GLOSARIO	82
10. ANEXOS	85