

ÍNDICE DE CONTENIDO

| | |
|---|----|
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. ANTECEDENTES | 3 |
| <i>Bonellia macrocarpa</i> (Cavanilles) Ståhl & Källersjö | 3 |
| Descripción morfológica de <i>Bonellia macrocarpa</i> (Cavanilles) Ståhl & Källersjö..... | 3 |
| Investigaciones entorno a <i>Bonellia macrocarpa</i> (Cavanilles) Ståhl & Källersjö..... | 5 |
| Cultivo de tejidos vegetales | 6 |
| Transformación genética en plantas | 7 |
| Transformación genética mediante <i>Agrobacterium rhizogenes</i> | 9 |
| Proceso de transformación genética mediante <i>Agrobacterium rhizogenes</i> | 11 |
| Principales funciones de los genes <i>rol</i> de <i>Agrobacterium rhizogenes</i> en las plantas transformadas | 12 |
| Factores que influencian la transformación genética mediante <i>Agrobacterium rhizogenes</i> | 15 |
| Genes marcadores..... | 18 |
| Proteínas fluorescentes como genes reporteros..... | 18 |
| Importancia de las raíces transformadas en la biotecnología vegetal..... | 20 |
| III. JUSTIFICACIÓN | 23 |
| IV. HIPÓTESIS | 23 |
| V. OBJETIVOS | 24 |
| Objetivo general..... | 24 |
| Objetivos específicos..... | 24 |
| VI. MATERIALES Y MÉTODOS | 25 |
| Material vegetal..... | 25 |
| Cepa de <i>Agrobacterium rhizogenes</i> | 25 |
| Estudio de la sensibilidad a cefotaxima sódica de los diferentes explantes de <i>Bonellia macrocarpa</i> (Cavanilles) Ståhl & Källersjö | 26 |
| Inducción de raíces transformadas de <i>Bonellia macrocarpa</i> (Cavanilles) Ståhl & Källersjö..... | 27 |
| Mantenimiento de las raíces transformadas de <i>Bonellia macrocarpa</i> (Cavanilles) Ståhl & Källersjö | 29 |
| Microscopía de fluorescencia | 29 |

| | |
|--|-----------|
| Confirmación de transformación genética en <i>Bonellia macrocarpa</i> (Cavanilles) Ståhl & Källersjö mediante PCR | 29 |
| VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 31 |
| Material vegetal..... | 31 |
| Estudio de la sensibilidad a cefotaxima sódica de los diferentes explantes de <i>Bonellia macrocarpa</i> (Cavanilles) Ståhl & Källersjö..... | 31 |
| Inducción de raíces transformadas de <i>Bonellia macrocarpa</i> (Cavanilles) Ståhl & Källersjö..... | 34 |
| Mantenimiento de las raíces transformadas de <i>Bonellia macrocarpa</i> (Cavanilles) Ståhl & Källersjö | 44 |
| Microscopía de fluorescencia..... | 46 |
| Confirmación de transformación genética en <i>Bonellia macrocarpa</i> (Cavanilles) Ståhl & Källersjö mediante PCR | 48 |
| VIII. CONCLUSIONES..... | 50 |
| IX. PERSPECTIVAS | 51 |
| X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 52 |
| XI. ANEXOS | 75 |

RESUMEN

Bonellia macrocarpa (Cavanilles) Ståhl & Källersjö es una planta empleada en la medicina tradicional maya que posee una amplia gama de actividades biológicas, tales como anticancerígenas, antifúngicidas, antigarrapaticidas y tripanocidas. En este estudio por primera vez se estableció un protocolo para la inducción de raíces transformadas en *B. macrocarpa* usando *Agrobacterium rhizogenes* A15834 pTDT. Los efectos del tipo de explante, el tiempo de infección, los coadyuvantes químicos y la densidad de *A. rhizogenes* sobre el porcentaje de formación de raíces transformadas se investigaron en dos etapas. En la primera etapa se demostró que la glutamina y la acetosiringona tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre el porcentaje de formación de raíces transformadas. La adición de 100 mg/l de glutamina o 100 µM de acetosiringona al medio de cultivo generaron el mayor porcentaje de formación de raíces transformadas en explantes de cotiledones (14.29 %, 25 %, respectivamente) e hipocótilos (25 %, 14.29 %, respectivamente) de *B. macrocarpa*. En contraste, la cisteína, el ditiotreitol y la densidad de *A. rhizogenes* no tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre la variable de respuesta. Por otra parte, en la segunda etapa se encontró que los tratamientos del diseño experimental 2³ tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre el porcentaje de formación de raíces transformadas. El tratamiento que consistió en 10 min de tiempo de infección, 200 mg/l de glutamina y 200 µM de acetosiringona produjo el mayor porcentaje de formación de raíces transformadas en explantes de cotiledón (7.14 %), hipocótilo (24.99 %) y raíz (10.71 %) de *B. macrocarpa*. La confirmación de la integración del ADN-T de *A. rhizogenes* en el genoma de la planta se llevó a cabo con la amplificación del gen *rol C* mediante la reacción en cadena de la polimerasa, y adicionalmente el gen reportero dímero en tandem de la proteína del tomate se expresó establemente en las raíces transformadas. Además, se observó la secreción de saponinas en el medio de cultivo líquido de las raíces transformadas de *B. macrocarpa*. Por lo tanto, el establecimiento de cultivos de raíces transformadas puede convertirse en un método alternativo para el desarrollo futuro de esta especie mediante la producción de metabolitos secundarios valiosos y el estudio de sus actividades biológicas.

Palabras clave: Raíces transformadas, glutamina, acetosiringona, pTDT, *rol C*, saponinas.