



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN
TECNOLOGÍA Y
DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO A.C.



**EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE LOS
PRINCIPALES FACTORES QUE AFECTAN LA
TRANSFORMACIÓN DE CALLO DE CRISANTEMO POR
MEDIO DE AGROBACTERIUM**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA FLORICULTURA

PRESENTA

JUAN UBALDO SÁNCHEZ-VELÁZQUEZ



MÉRIDA, YUCATÁN, FEBRERO 2014



Guadalajara, Jalisco a ____ de _____ de ____

Dr. Ernesto Tapia Campos
Coordinador Académico de la Maestría
en Ciencias de la Floricultura
Guadalajara, Jalisco

Los que suscriben integrantes del jurado de examen de grado del estudiante Juan Ubaldo Sánchez Velázquez, una vez leída y revisada la Tesis titulada “Evaluación de la interacción entre los principales factores que afectan la transformación de callo de crisantemo por medio de Agrobacterium” aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el alumno para aspirar al grado de Maestro en Ciencias de la Floricultura durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente a los ____ días del mes de ____ del año ____.

Presidente

Secretario

Vocal

Vocal

Vocal

Dedicatorias

A Dios, por el regalo de una oportunidad para ser mejor con cada día que nos permite estar en este mundo.

A mis padres; Juan Ubaldo Sánchez Dávila y Martha Jaqueline Velásquez Guevara, quienes siempre me han brindado su apoyo y me han alentado a seguir adelante en todo.

A mi esposa Violeta Álvarez Morales, por su cariño y apoyo incondicionales.

A mi hermana y hermanos; Mayela Jaqueline Sánchez Velázquez, Eduardo Daniel Sánchez Velázquez y Carlos Alejandro Sánchez Velázquez, por todos los momentos agradables que me levantaron el ánimo en todo momento.

Agradecimientos

Al Fondo SEP-CONACyT Ciencia básica, por el apoyo otorgado, a través del proyecto “Modificación genética en la ruta de biosíntesis de las antocianinas en crisantemo”, con clave: 2856 del cual es parte esta tesis de maestría.

Al CONACyT por la beca otorgada con número 325881 para la realización de este trabajo.

Al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, por permitirme realizar los estudios y ensayos necesarios para la realización de este documento.

A los directores de la tesis; Dr. Alberto Uc Vázquez y Dra. Ana Luisa Ramos Díaz por sus consejos, paciencia, tiempo y dedicación en la orientación durante la realización del documento.

A la Dra. Ingrid Mayanín Rodríguez Buenfil, por su asesoría y apoyo durante todo el posgrado y su ayuda en estadística.

Índice de Contenido

	RESUMEN	
	ABSTRACT	
I	INTRODUCCIÓN	1
II	ANTECEDENTES	3
II.I	Características taxonómicas e importancia económica del crisantemo	3
II.II	El cultivo in vitro de crisantemo	3
II.III	Mejoramiento genético	4
II.IV	Transformación genética en plantas	5
II.V	El proceso de transformación de <i>Agrobacterium</i>	6
II.VI	Modificación de <i>Agrobacterium</i> hacia un sistema para la transformación de plantas	9
II.VII	Estrategias para la selección de plantas transformados por <i>Agrobacterium</i>	10
II.VIII	Principales factores que afectan la transformación <i>in vitro</i>	12
II.IX	Concentración de <i>Agrobacterium</i> y periodo de cocultivo	12
II.X	Aplicación de <i>Acetosiringona</i> como potenciador de la transformación	13
II.XI	Métodos de desinfección	14
II.XII	Variedad y tipo de explante empleado para la transformación	15
II.XIII	Eficiencias de transformación	16
III	HIPÓTESIS	19
IV	Objetivos	20
	Objetivo general	20
IV.II	Objetivos particulares	20
V	MATERIALES Y MÉTODOS	21
V.I	Vector de transformación utilizado	21
V.II	Transformación de <i>E. coli</i> con el vector de transformación	21
V.III	Purificación del vector de transformación	22
V.IV	Transformación de la cepa <i>A. tumefaciens</i> LBA4404 con el vector pBI121	22
V.V	Evaluación del efecto de los antibióticos sobre el crecimiento de <i>A. tumefaciens</i> transformada con pBI121	23
V.VI	Obtención del callo de <i>D. grandiflorum</i> Var. Micromargara	23
V.VII	Efecto del antibiótico sobre la viabilidad del callo	24
V.VIII	Procedimiento para la transformación del callo de crisantemo	24
V.IX	Tratamiento histoquímico para detectar la actividad de GUS	25
V.X	Extracción de, ARN y síntesis de cDNA	25
V.XI	Amplificación de <i>uidA</i> , <i>aphA3'II</i> y <i>act-cr</i>	26
V.XII	Análisis estadístico de la transformación de los callos de crisantemo	27
VI	RESULTADOS	29
VI.I	Obtención de <i>A. tumefaciens</i>	29
VI.II	Determinación de la concentración de antibiótico para la inhibición de <i>A. tumefaciens</i> transformada con pBI121	31

VI.III	Obtención del callo de <i>D. grandiflorum</i> , Var. Micromargara.	32
VI.IV	Efecto del antibiótico de desinfección sobre la fenolización del callo	34
VI.V	Establecimiento del diseño experimental	36
VI.VI	Detección de la transformación genética mediante la actividad de GUS	36
VI.VII	Confirmación de la transformación por RT-PCR	38
VI.VIII	Resolución del diseño experimental para la evaluación de los factores: concentración de <i>A. tumefaciens</i> , periodo de cocultivo y concentración de acetosiringona	42
VI.IX	Efecto de la concentración de <i>A. tumefaciens</i> , el periodo de cocultivo y la concentración de acetosiringona, sobre el porcentaje de callos transformados	44
VII	CONCLUSIONES	47
VIII	RECOMENDACIONES	48
IX	LITERATURA CITADA	49

Índice de Tablas

Tabla 1	Comparación entre diferentes protocolos de transformación genética en ornamentales.	17
Tabla 2	Diseño experimental codificado para la evaluación de los principales factores involucrados en la transformación genética del crisantemo: Factor A = Periodo de cocultivo + = 3 días - = 1 día; Factor B = Concentración de <i>A. tumefaciens</i> + = DO600: 2, - = DO600: 1.; Factor C = Concentración de acetosiringona + = 100 µM (0.02g/l), - = 50 µM (0.01g/l).	24
Tabla 3	Accesiones de las secuencias utilizadas para el diseño de oligos usados en la PCR.	26
Tabla 4	Crecimiento de <i>Agrobacterium</i> bajo diferentes concentraciones de antibióticos.	31
Tabla 5	Análisis de rangos múltiples para la comparación de los medios CC3 y CC en la que se muestra el comportamiento de los callos con respuesta a la fenolización.	33
Tabla 6	Análisis de varianza entre los dos medios evaluados para evitar la fenolización del callo de crisantemo.	33
Tabla 7	Análisis de varianza y comparativo entre los diferentes tratamientos para evaluar la respuesta a la sensibilidad del callo frente al antibiótico Timentín.	35
Tabla 8	Número de callos positivos a la transformación en cada una de las repeticiones. Se emplearon 8 callos por tratamiento, para totalizar 24 callos distribuidos en los tres bloques.	42
Tabla 9	Análisis de varianza de los factores evaluados durante la transformación de crisantemo.	43

Índice de Figuras

Figura 1	Plásmido Ti .mostrando las regiones: borde izquierdo (TL), la región central (TC) y el borde derecho (TR) en el T-DNA. La región de virulencia se encuentra entre el punto OriV y el borde izquierdo, en esta región se encuentran los genes <i>vir</i> responsables de la virulencia y transferencia del T-DNA (Tomado de Gelvin 2003).	7
Figura 2	Diagrama del proceso de transferencia del T-DNA de <i>Agrobacterium</i> a la célula hospedante (Tomado de Tzfira y Citovski 2006). 1) Anclaje de <i>Agrobacterium</i> a la célula vegetal, 2) Señales químicas liberadas por la planta que pueden ser reconocidas por el receptor VirA, 3).	8
Figura 3	Importación del T-DNA al núcleo de la célula vegetal (a y b). Mecanismos de la célula vegetal que <i>Agrobacterium</i> utiliza para insertar el T-DNA en el núcleo y en el genoma de la célula hospedante. (c, d y e).. (Tomado de Tzfira y Citovski 2006).	9
Figura 4	Principales Plásmidos utilizados en la transformación genética de plantas; A) Sistema cointegrado; El gen de interés y la región <i>vir</i> se encuentran en el mismo plásmido, para introducir el gen de interés al plásmido Ti es necesario realizar una recombinación previa con un vector de recombinación. B) Sistema binario; El gen de interés y la región <i>vir</i> se encuentran en plásmidos independientes. No se requieren recombinaciones adicionales (Tomado de Lee y Gelvin 2008).	10
Figura 5	Mapa completo del plásmido pBI121 (Tomado de Wu 1988), en el cual se observan las diferentes regiones que forman parte del T-DNA: Bordes izquierdo (LB) y derecho (RB), NOS prom.: Promotor de la nopalina sintasa, NPTII CDS: gen que codifica para la enzima Neomicin fosfotransferasa II, NOS term: Terminador de la nopalina sintasa, 35S prom: promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, GUS CDS: Gen de la enzima β -glucoronidasa, Sitios de restricción dentro de la región de T-DNA: PstI, SphI, HindIII, EcoRV, XbaI, BamHI, SmaI, SacI y EcoRI.	21
Figura 6	Crecimiento de <i>Agrobacterium</i> tras plaquear 20 μ l de bacterias en medio SOC, sobre medio LB solido adicionado con 100 μ g/ml de Estreptomicina y 50 μ g/ml de Kanamicina, durante 24 hrs a 30°C.	29
Figura 7	Digestión de pBI121 con diferentes enzimas de restricción. En círculos rojos, la ubicación de los fragmentos obtenidos. M) Marcador de peso molecular 1000kb labber, 1) Plásmido pbI121, 2) Digestión con PstI, 3), Digestión con EcoRI en conjunto con HindIII, 4) plásmido pAL4404.	30
Figura 8	Evaluación del efecto de los antibióticos Timentín y cefotaxina sobre el crecimiento de <i>A. tumefaciens</i> . A) Crecimiento de <i>Agrobacterium</i> en medio LB solido adicionado con 100 μ g/ml de Estreptomicina y 50 μ g/ml de Kanamicina, B) Crecimiento de <i>A. tumefaciens</i> en medio LB sólido, adicionado con 250 μ g/ml de Timentín, C) Crecimiento de <i>A. tumefaciens</i> en medio LB sólido, adicionado con 250 μ g/ml de carbenicilina.	31
Figura 9	Cultivo in vitro de <i>D. grandiflorum</i> . A)Planta de <i>D. grandiforum</i> Var. Micromargara, propagada in vitro clonalmente en medio de cultivo TC4. B)	32

Producción de brotes en segmentos de tallo, propagados en medio CT4, C) Callo de *D. grandiflorum* Var. *Micromargara* fenolizado tras 9 días de haber sido cultivado en medio CC3, D) Regeneración de callo originado en explantes de hoja.

- Figura 10** Seguimiento de la transformación de callos de crisantemo Var. *Micromargara* durante la transformación y análisis histoquímico. A) Planta de *D. grandiflorum* Var. *Micromargara*, las flechas indican las hojas usadas para inducir formación de callo. B) callo obtenido a partir de explantes de hoja al momento de la infección con *A. tumefaciens*. C) Callo comenzando con el oscurecimiento después de 3 días de cocultivo con *A. tumefaciens*. Los círculos muestran la apariencia interna del callo, con coloración verde. D) callo transformado, totalmente fenolizado tras la desinfección de *A. tumefaciens* con 250 µg/ml de Timentín. **37**
- Figura 11** Evaluación de la transformación de los callos de crisantemo por ensayo histoquímico para la detección de GUS. A) Callo de crisantemo var. *Micromargara* sin transformar, sometido a ensayo histoquímico y conservado en etanol al 70%, ninguna coloración azul es visible. B) Callo de crisantemo var. *Micromargara* transformado bajo las condiciones del tratamiento 5 y conservado en etanol al 70%, la zona transformada del callo se aprecia de color azul en una línea horizontal por la mitad del callo. **38**
- Figura 12** Comprobación de la transformación. A) Amplificación de fragmentos de GUS en todos los tratamientos con al menos un callo transformado. M) Marcador molecular 100 bp low ladder de Sigma Aldrich, 1) Control positivo, amplificación a partir de ADN plasmídico, 2) tratamiento 1, 3) tratamiento 2, 4) tratamiento 3, 5) Tratamiento 4, 6) tratamiento 5, 7) tratamiento 6, 8) tratamiento 7, 8) tratamiento 7. B) Secuenciación de un fragmento amplificado del tratamiento 5 y su alineación; Alineación de la región amplificada de *uidA* con la secuencia del gen. En azul los oligos Forward al inicio y Reverse al final. En rojo la similitud entre la secuencia amplificada y la secuencia del gen. Similitud del 99%. **39**
- Figura 13** Comprobación de la transformación por amplificación de fragmentos de NPTII en los callos transformados del tratamiento 5, bloque 3. A) M) Marcador molecular 100 bp low ladder de Sigma Aldrich, 1) Control positivo, 2) Control negativo, 3) callo 1, 4) callo 2, 5) callo 3, 6) callo 4, 7) callo 5, 8) callo 6, 9) callo 7, 10) callo 8. Todos los callos fueron amplificados con *act-cr* B) Alineación de la secuencia de NPTII con la secuencia del T-DNA del vector obtenida del fragmento amplificado del callo 4. En rojo la similitud entre la secuencia amplificada y la secuencia del T-DNA. Similitud del 99%. **40**
- Figura 14** Amplificación de GUS, NPTII y Actina a partir de cDNA de un callo del tratamiento 5. A) M) Marcador molecular, 1) control positivo de GUS a partir de ADN plasmídico, 2) Control negativo de GUS, 3) Fragmento amplificado de GUS a partir de cDNA, 4) Control positivo de NPTII a partir de ADN plasmídico, 5) Control negativo de NPTII, 6) Fragmento amplificado de NPTII a partir de cDNA, 7) Control positivo de Actina, amplificado a partir de ADN genómico, 8) Control negativo de Actina, 9) Fragmento amplificado de Actina a partir de cDNA. B) Alineación de la región amplificada del gen *Act-cr* con el mismo gen. En rojo la similitud **41**

entre la secuencia amplificada y la secuencia del gen. La secuencia amplificada tiene 81% de similitud.

Índice de Gráficas

Grafica 1	Incremento en el porcentaje de callos fenolizados, del día 0 al día 10 de cultivo en medio CC, con diferentes concentraciones de Timentín.	35
Grafica 2	Gráfica de medias que muestra la fenolización de los callos en medio CC adicionado con diferentes concentraciones de antibiótico Timentín. En el eje de las x la concentración de Timentín en $\mu\text{g/ml}$, en el eje de la y, el porcentaje de fenolización de los callos por tratamiento.	36
Grafica 3	La línea de corte en la gráfica de Pareto muestra la distancia a la cual los factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la transformación. El color azul de las barras indica el nivel bajo del factor, mientras el color gris indica el nivel alto del factor.	43
Grafica 4	Efectos principales sobre la transformación de callos de crisantemo var. Micromargara. El grado de inclinación en las barras azules indica el impacto sobre la transformación, siendo <i>Agrobacterium</i> el único que muestra una inclinación suficiente para lograr un efecto estadísticamente significativo.	45
Grafica 5	Interacción no significativa entre la concentración de acetosiringona (μM) y los días de cocultivo, en la que la transformación se favorece a una concentración de acetosiringona de $100\mu\text{M}$ durante 1 día de cocultivo.	46

Resumen

El crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzevelev) es una de las flores de corte y maceta más importantes comercialmente del mundo, solo después de rosas y claveles. Numerosos trabajos reportan el mejoramiento genético del crisantemo, para la obtención de nuevas variedades, incluyendo transformaciones genéticas mediadas por *Agrobacterium tumefaciens*. Otros estudios realizados fueron con el objeto de incorporar características novedosas en la planta, tales como: modificación en la arquitectura de la planta, tamaño y color del capítulo, por mencionar los más importantes. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos por establecer protocolos de mejoramiento genético aplicables a todas las variedades del crisantemo, ciertas variedades han mostrado ser recalcitrantes y altamente dependientes del genotipo e influenciados por diversos factores bióticos y abióticos, como: el tipo de explante utilizado, la concentración de inóculo de *A. tumefaciens* durante la infección, el periodo de cocultivo de la bacteria con el explante, el uso y concentración de acetosiringona, además de ser afectado en su capacidad de regeneración al eliminar la bacteria utilizando antibióticos convencionales en crisantemo como cefotaxina, teniendo como resultados rangos que van de 0.4% en la eficiencia de transformación para las variedades recalcitrantes a 57% en las variedades no recalcitrantes. El objetivo de este trabajo fue evaluar la interacción de los principales factores que afectan la transformación genética del crisantemo (*D. grandiflorum*) variedad micromargara, por medio de *A. tumefaciens* cepa LBA4404. Se evaluaron los siguientes factores: periodo de cocultivo (1 y 3 días), concentración del inóculo de *A. tumefaciens* (D.O.₆₀₀ 1 y 2) y concentración de acetosiringona (100 y 50 µM), utilizando como explante, callo obtenido a partir de hoja de crisantemo var. micromargara, así como la determinación del efecto del antibiótico utilizado para eliminar la bacteria, sobre el oscurecimiento del callo. Los resultados mostraron que la concentración de *A. tumefaciens* (Concentración de D.O.₆₀₀ 2) para la transformación genética de crisantemo var. micromargara, fue el factor con mayor influencia para la transformación, mientras que los otros dos factores evaluados, no tuvieron un efecto estadísticamente significativo. Los resultados nos permiten recomendar la utilización del tratamiento 5 (Concentración de *A. tumefaciens* en D.O.₆₀₀ 2, 1 día de cocultivo y concentración de acetosiringona a 100 µM), ya que este tratamiento resultó ser el más eficiente para la transformación (29.16%). También se determinó que una concentración de Timentín de 250µg/ml durante la desinfección es adecuada para contener el crecimiento de *A. tumefaciens* cepa LBA4404, con mínimas afectaciones sobre el callo.

Palabras clave: Crisantemo (*Dendranthema grandiflorum*) Var. micromargara, Transformación genética, *Agrobacterium tumefaciens*, Timentín.

Abstract

Chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzevelev) is one of the commercial cut and potted flowers more important in the world, just after roses and carnations. Several works reports the genetic improvement of chrysanthemum, to obtain new varieties, included genetic transformations mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Other studies were done to incorporate new characteristics in the plant, such as: modification in the architecture of the plant, size and color of the flower, as the more important, nevertheless the efforts to establish protocols for genetic improvement applicable to all the varieties of chrysanthemum, many varieties has shown to be recalcitrant and highly dependent of the genotype, and been influenced by many biotic and abiotic factors such as: kind of explant, inoculum concentration of *A. tumefaciens* during infection, coculture time of the explant with the bacteria, use and concentration of acetosiringona, in addition to be affected in their regeneration capacity when bacteria is eliminated, by conventional antibiotics, such as cefotaxine, getting results on transformation efficiency since 0.4% in the more recalcitrant varieties, to 57% in the more susceptible. The objective of this work was to evaluate the interaction between the factors that affect the transformation efficiency in chrysanthemum (*D. grandiflorum*), var. micromargara, with *A. tumefaciens* strain LBA4404. The factor evaluated were: coculture time (1 to 3 days), *A. tumefaciens* concentration in the inoculum (DO₆₀₀ 1 or 2) and acetosiringona concentration (50 to 100 µM), with callus explants from leaf, obtained from chrysanthemum variety micromargara, as well as the determination of the effect of the antibiotic timentin to eliminate the bacteria, over the browning of the callus. Results shows that the concentration of *A. tumefaciens* (Concentration of D.O₆₀₀ 2), for the genetic transformation of the chrysanthemum var. micromargara, was the factor with the highest influence for transformation, while the other two factors evaluated, has not a statistically significance effect. This results allow us to recommend the utilization of treatment 5 (*A. tumefaciens* concentration of D.O. = 2, 1 day of coculture time and 100 µM of acetosiringona concentration), now that this treatment results with the higher transformation efficiency (29.16%). We also determine a concentration of 250 µg/ml during the disinfection was better to contain the *A. tumefaciens* strain LBA4404 growth, with minimal afectations on the callus.

Key Words: Chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*) Var. micromargara, Genetic transformation, *Agrobacterium tumefaciens*, Timentin.

I. INTRODUCCIÓN

La industria florícola nacional ha experimentado entre el 2003 y 2011 un crecimiento sostenido del 4% en promedio en consumo interno y 1.8% en exportaciones, alcanzando en al año 2011 un valor de 5 646 000. 00 pesos (SIAP, 2013), este incremento en la demanda de flores tanto a nivel nacional como internacional, también ha generado la necesidad de una mayor oferta de nuevas variedades, por lo que actualmente, existe interés en el sector ornamental en generar nuevas variedades que puedan cumplir con los requerimientos de la demanda, ya sea con características ornamentales novedosas o mejorando la resistencia de las plantas frente a enfermedades y estrés ambiental principalmente (To y Wang, 2006).

A nivel mundial el crisantemo (*Dendrathera grandiflorum* Tzevelv) ocupa el tercer lugar en importancia por su participación en el mercado ornamental, mientras que en México representa aproximadamente la séptima parte del mercado en el sector ornamental, siendo las variedades polar y margara las dominantes en cuanto a superficie cultivada con el 88% (SIAP, 2012). Es un cultivo industrializado y social que tiene un alto beneficio neto, una elevada relación mano de obra-superficie (uso de mayor número de jornales por superficie cultivada) y su cultivo recibe fuertes inversiones en infraestructura (Cermeño, 2007).

La disponibilidad de variedades y cultivares de crisantemo es amplia y año con año se generan nuevas variedades. La obtención de las nuevas variedades ha sido a través de las cruza entre especies emparentadas para la obtención de híbridos que presentan características nuevas e importantes desde el punto de vista ornamental. Otra estrategia utilizada por los mejoradores para la generación de nuevas variedades es la inducción de mutaciones o biología sintética (Herrerros, 1995). El mejoramiento tradicional mediante cruza, involucra un proceso largo y tedioso basado en entrecruzamientos de especies cercanas filogenéticamente y en la selección de las características deseadas (Novak y Brunner, 1992). Uno de los inconvenientes es que a través de este tipo de mejoramiento el número de genes disponibles para nuevas características está limitado al repertorio genético de los parentales (Cassanova *et al.*, 2005).

En las últimas tres décadas se han desarrollado nuevas técnicas biotecnológicas para la obtención de nuevas variedades vegetales, a través de la manipulación genética con lo que se han obtenido cereales (Kramer *et al.*, 2000), frutas (Santos *et al.*, 2009), vegetales (Davis *et al.*, 1991) y plantas ornamentales (Le *et al.*, 2001) con características que no pueden obtenerse por métodos de mejoramiento tradicional, como resistencia a herbicidas o a insectos (Kramer *et al.*, 2000).

Múltiples trabajos reportan para crisantemo, el desarrollo de protocolos exitosos de modificación genética mediado por *Agrobacterium tumefaciens*. Sin embargo estos protocolos son útiles para algunas variedades, mientras que en otras variedades estos protocolos no son aplicables y resultan con menor eficiencia, debido a que cada variedad responde de manera distinta frente a factores como la interacción con la cepa de bacteria utilizada para la transformación, el medio y condiciones del cultivo *in vitro* y la capacidad de regeneración de cada uno de los materiales (Sherman *et al.*, 1998), por lo que un protocolo de transformación genética establecida para una variedad, no es aplicable necesariamente a otras variedades, por ejemplo en la variedad Orlando el factor determinante fue un periodo de cocultivo de 2 días (Song *et al.*, 2012), mientras que para la

variedad Lineker el periodo de cocultivo de 4 a 5 días fue más eficiente para la transformación.

Una de las limitantes para la transformación es que a la fecha no se ha determinado la relación entre los factores que puedan afectar la transformación, si bien algunos reportes comparan diferentes niveles de factores aislados, estos no muestran como un factor afecta a otro, tal es el caso de métodos de transformación reportados en plantas modelo como el tabaco donde Sunjung (2006), comparó diferentes niveles de factores que pueden afectar la transformación, pero sin realizar la correlación entre los factores que pueden llevar a una sinergia entre estos factores.

Por este motivo, es necesario el desarrollo de metodologías para la transformación genética de cada variedad vegetal y dilucidar el comportamiento de los factores principales que afectan la transformación genética mediada por *A. tumefaciens* en función de los demás factores, esto permitirá reducir costos y obtener mejores eficiencias de transformación (Shinoyama *et al.*, 2012). Por otro lado un protocolo de transformación eficiente permitirá generar de manera rápida y económica nuevas variedades con características novedosas, por ejemplo variedades resistentes a plagas y enfermedades (Valizadeh *et al.*, 2013), o utilizar dicha variedad como modelo de estudio en estudios dirigidos a esclarecer la función de un gen (Shchennikova *et al.*, 2004), finalmente contar con un protocolo eficiente de transformación genética de una especie es importante porque permite el diseño de estrategias tendientes a determinar con precisión el papel de uno o más genes en diferentes vías o rutas de interés, así como en estudios de interacción planta-patógeno (Wordragen *et al.*, 1991; Shchennikova *et al.*, 2004).

II. ANTECEDENTES

II.I Características taxonómicas, e importancia económica del crisantemo

El crisantemo pertenece a la familia Asteraceae dentro del género *Dendranthema* (Boodley y Newman, 2009). El género *Dendranthema* cuenta con 30 especies entre las que se puede mencionar a *D. grandiflorum* como la principal especie representativa en la industria florícola de este género (Otaola-Gómez *et al.*, 2001). Anteriormente estuvo clasificado como *Chrysanthemum morifolium* Ramat, clasificación que aún es aceptada como sinónimo (Boodley y Newman, 2009).

El crisantemo posee una flor compuesta (capítulo) y su cariotipo típico es $2n=6x=54$ debido a que los cultivares modernos son híbridos que incluyen a varios ancestros hexaploides (por ejemplo: *Dendranthema erubescens*, *D. indicum*, *D. japonense*, *D. makinoi*, *D. ornatum*, *D. sinense*, *D. sawadskii*, *D. koreanum*, *D. articum*, *D. nipponicum*, *D. rubellum* y *D. sibiricum*) de los que en conjunto se han registrado más de 20,000 variedades (Anderson, 2007). El color de la flor puede variar entre las diferentes variedades incluyendo el blanco, amarillo, anaranjado, rojo, rosa, lila, etc (Noda *et al.*, 2013). En México las variedades más cultivadas son: polaris (White polaris) y margara (micromargara) en una superficie aproximada de 2100 hectáreas de las 2400 destinadas al cultivo de crisantemos (SIAP, 2012).

Debido a la importancia económica a nivel mundial, del crisantemo se han implementado programas de mejoramiento genético vía transformación mediada por *Agrobacterium sp.*, para desarrollar variedades con nuevas características, como: resistencia a virus (Sherman *et al.*, 1998; Mitiouchkina *et al.*, 2006), enanismo para la generación de plantas en maceta (Mitiouchkina y Dolgov, 2000), nuevos y variaciones en el color del capítulo, o defensa contra insectos, entre otros (Dolgov *et al.*, 1997; Valizadeh *et al.*, 2013). Los protocolos de transformación genética se han enfocado principalmente en resolver problemas durante y después de la transformación genética de crisantemo (Kudo *et al.*, 2002), mejorar la eficiencia de transformación (Toguri *et al.*, 2003), regenerar explantes transformados (Sherman *et al.*, 1998) y profundizar el conocimiento en la interacción entre *Agrobacterium* y las diferentes variedades de crisantemo (Puopolo *et al.*, 2007). Pero en todos los casos, se han evaluado por separado algunos de los factores de importancia que afectan la eficiencia de transformación. Así mismo estos protocolos de transformación han buscado mejorar las variedades locales en el lugar donde se comercializan, por lo que durante la revisión bibliográfica, no se encontró un protocolo de transformación genética mediado por *A. tumefaciens* para la variedad micromargara.

II:II El cultivo in vitro de crisantemo

Las células vegetales tienen la capacidad de la totipotencialidad, este término se define como la capacidad de una célula vegetal, para poder generar una planta nueva, esto es posible gracias a la acción de diferentes reguladores de crecimiento, en función de su concentración, como las auxinas o citocininas, las cuales van a estimular el mantenimiento de la célula en un estado indiferenciado (callo), o la proliferación de tejidos y órganos (Thorpe, 2007), esta capacidad de las células vegetales puede aprovecharse para obtener un gran número de plantas a en poco tiempo (Birch, 1997).

Uno de los requisitos para lograr la obtención de plantas genéticamente modificadas es contar con un protocolo de regeneración y micro propagación de los explantes transformados, para lograr este requisito se emplean diferentes tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento, así como varios medios de cultivo. También se seleccionan entre diferentes explantes la que mejor responde a la inducción (Birch, 1997).

Uno de los principales problemas que existen para establecer un cultivo *in vitro* es la ocurrencia de oscurecimientos letales en los explantes y el cual se asocia al estrés oxidativo provocado por daños mecánicos de corte en el explante, composición del medio de cultivo, factores endógenos y acumulación de fenoles, quinonas y taninos que son oxidados por fenol-oxidasas y peroxidasas en procesos de polimerización de los compuestos fenólicos para formar ligninas e iniciar el cierre de la pared celular (Azofeifa, 2009; Novo, 2008). El estrés oxidativo trae como consecuencia la pérdida de la clorofila y la eventual muerte del material vegetal y se presenta comúnmente en especies leñosas (Laukkanen *et al.*, 1999).

En crisantemo existen reportes favorables para su propagación *in vitro* y para la regeneración a partir de diferentes tejidos (Jaramillo *et al.*, 2008, Song *et al.*, 2012, Valle-Sandoval *et al.*, 2008, Sherman *et al.*, 1998). Jaramillo y colaboradores (2008), experimentaron con segmentos nodales de las variedades, “Escapade”, “White albatros” y “Yellow Albatros” de crisantemo para lograr la organogénesis somática utilizando 16 combinaciones de Ácido naftalenacético (ANA) con 6-benzylaminopurina (BAP) y lograr inducir la formación de brotes adventicios, y cinco concentraciones de ácido 2-4-dichlorophenoxyacetico (2-4D) para inducir la embriogénesis somática en un medio base que consiste en sales MS suplementado con 2mg/l de ácido 3-indol acético y 0.23 mg/l de BAP, obteniendo como resultado que cantidades arriba de 4.4 μM de BAP reducen la frecuencia de regeneración de brotes, así como el efecto benéfico de ANA para obtener la mayor cantidad de brotes, siempre y cuando la relación de auxinas y citocininas sea cercana a 0:1. Un resultado importante de este trabajo es que la presencia de BAP en el medio estimuló la formación de callo en todas las variedades

II.III Mejoramiento genético

Actualmente podemos dividir al mejoramiento genético en dos clases; la primera utiliza como herramienta principal la selección a través de cruza y retro cruza para incorporar o fijar las características deseadas en el cultivar, al cual se le denomina mejoramiento genético tradicional (Shinoyama *et al.*, 2012) y está limitado por el acervo genético de la especie, ya que el cruzamiento entre diferentes especies es generalmente incompatible (Díaz *et al.*, 2010) y ciertas especies no poseen características de interés en ninguna de sus variedades, por lo que obtener un híbrido con una característica que no poseen los progenitores no será posible. Otra desventaja del mejoramiento tradicional es el número de ciclos de cruza necesarios para obtener una nueva variedad con una característica estable es grande (Whitman, 2000), por lo que el tiempo para obtener nuevos materiales es largo y costoso.

La segunda clase del mejoramiento genético vegetal se basa en el uso de diferentes métodos de la biotecnología y hacen posible la introducción de nuevas características que serían imposibles de obtener por vía del mejoramiento tradicional (Shinoyama *et al.*, 2012), e incrementan la diversidad genética (Boskovic *et al.*, 2010).

De esta clase de mejoramiento genético se deriva la producción de plantas transgénicas. Los ejemplos más comunes incluyen variedades de maíz resistente a insectos que suponen ahorros por más de 1,000.00 millones de pérdidas en el almacenamiento del grano (Kramer *et al.*, 2000), variedades de maíz que funcionan como biofábricas de péptidos de mamíferos y biovacunas (Fraley y Rogers, 2001), arroz con niveles de carotenoides mejorados que combaten la desnutrición en regiones donde la dieta es deficiente en vitamina A (Beyer *et al.*, 2002) por mencionar algunos ejemplos.

Desde que se reportó la susceptibilidad de *D. grandiflorum* a *A. tumefaciens* (Miller, 1975) se han desarrollado variedades de crisantemo con características antifúngicas que mejoran el rendimiento del cultivo (Sen *et al.*, 2013), variedades con modificación a la coloración del capítulo para el sector ornamental (Noda *et al.*, 2013, Ohmiya *et al.*, 2006).

II.IV Transformación genética en plantas

Mediante este procedimiento se pueden incorporar o silenciar genes, a estos se les conoce como transgenes y su finalidad es otorgar a la planta de interés nuevas características agronómicas que no podrían obtenerse por cruza, o mutaciones inducidas.

Los métodos de transformación genética en plantas se dividen, métodos directos y métodos indirectos (Narusaka *et al.*, 2012). Los métodos directos introducen el material deseado en la célula de forma mecánica sin intermediarios. La biobalística (Sanford, 2000) y la electroporación (Aranda, 2007) son algunos de estos ejemplos de transformación directa (Narusaka *et al.*, 2012). Los métodos indirectos usan intermediarios biológicos para transferir el ADN deseado a la célula vegetal como el uso de *Agrobacterium sp.* para transformación genética (Chung *et al.*, 2005).

El género *Agrobacterium*, incluye bacterias patógenas de las plantas que tienen la capacidad de transformar genéticamente a su hospedante, al transferir un segmento de su ADN al genoma de la planta infectada (Gelvin, 2003). A este segmento de ADN bacteriano transferido se le denomina T-DNA (Transferred DNA por sus siglas en inglés; Figura 2) y se encuentra en un plásmido al que se le denomina plásmido Ti (Tumor inducing por sus siglas en inglés; Figura 2). *Agrobacterium* transfiere genes que promueven la producción de aminoácidos especializados llamados opinas, que son utilizadas como fuente de carbón y nitrógeno por la bacteria (Mary-Dell *et al.*, 1982), y genes que codifican para enzimas que están relacionados con la ruta de síntesis de reguladores de crecimiento, principalmente auxinas y citocininas que mantienen a las células vegetales en constante división celular (Zupan y Zambrisky, 1995; Akramian *et al.*, 2008).

Existen dos especies de *Agrobacterium* que pueden llevar a cabo la transferencia del T-DNA; *A. tumefaciens* y *A. rizogenes*, la diferencia entre estas dos especies radica en los genes que conforman el plásmido Ti, ya que al infectar la planta con una u otra especie de la bacteria se observan síntomas diferentes; la presencia de agallas en la corona o tumores en el caso de *A. tumefaciens* y la inducción de formación de raíces por *A. rizogenes* (Mary-Dell *et al.*, 1982).

La transformación genética en plantas vía *A. tumefaciens* y *A. rizogenes* ha sido aplicada con éxito en numerosas especies (Bush y Pueppke, 1991). En la industria florícola la modificación genética mediada por *Agrobacterium sp.* ha sido utilizada para la generación

de variedades con novedad en el color de la flor (Tanaka *et al.*, 2009; Noda *et al.*, 2013), en el aroma (Zuker *et al.*, 2006) en la arquitectura floral y/o de la planta completa (Pellegrineschi *et al.*, 1997).

Las cepas de *Agrobacterium* en donde se ha modificado el plásmido Ti y se ha remplazado la secuencia de genes que inducen la formación de tumor en las plantas, por genes de interés, son de los métodos más eficientes para la introducción de genes foráneos en plantas (Díaz *et al.*, 2010). Sin embargo el rango de especies hospedantes para *Agrobacterium* aún es incierto y se han reportado casos de infección en numerosos cultivos ornamentales tales como *Tricyrtis hirta* (Adachi *et al.*, 2005), Gerbera (Hussein *et al.*, 2013), entre otros incluido crisantemo (Miller 1975, Bush y Pueppke 1991; Ogawa *et al.*, 2000). Las evidencias sugieren que los genes causantes de la virulencia dentro del plásmido Ti son determinantes para el rango de especies hospedantes que *Agrobacterium sp.* puede infectar, el cual varía entre especies de *Agrobacterium* y entre cepas de la misma especie (Gelvin, 2003).

II.V El proceso de Transformación de *Agrobacterium*

La maquinaria necesaria para la transferencia del T-DNA es compleja e involucra a varias proteínas codificadas en los genes *vir* presentes en el mismo plásmido Ti donde se encuentra el T-DNA (Tzfira y Citovski, 2006; Figura 1). Adicionalmente son necesarias la presencia de varias proteínas por parte del hospedante para que se pueda efectuar la transformación mediada por *Agrobacterium*, principalmente en las etapas finales de la transformación (transporte intracelular, importación al núcleo e integración del T-DNA), debido a que *Agrobacterium* “adopta” los mecanismos celulares del hospedante para transformar el ADN hospedante (Kiyokawa *et al.*, 2009).

La infección de *Agrobacterium* ocurre cuando la planta en respuesta a un daño mecánico libera compuestos fenólicos; Estos compuestos como la acetosiringona son percibidos por *Agrobacterium* como señal química que le indica a la bacteria el sitio donde puede llevar a cabo el anclaje para realizar la infección (Fig. 2. 1). El reconocimiento de la señal química ocurre por el receptor en la membrana de *Agrobacterium* “VirA” (Satchel *et al.*, 1985; Gelvin, 2003). Al reconocer la señal química (Figura 2.2), tiene un cambio estructural que le permite fosforilar a “VirG” (Figura 2.3).

VirG, es un factor de transcripción que activa la expresión del operón *vir* (Fig. 2.3) probablemente por interacción con el promotor del operón *vir* (Satchel *et al.*, 1987, Gelvin, 2003). Una vez que Vir G activa la expresión del operon *vir*, se producen varias proteínas (VirB, VirD1, VirD2, VirD4, VirE y VirF) relacionadas con el corte y transporte del T-DNA desde la bacteria hasta su integración en el genoma de la célula vegetal.

VirD1 es una enzima con actividad endonucleasa que corta el T-DNA en el extremo 5' del plásmido Ti, mientras que VirD2 es una enzima que corta en el extremo 3' del T-DNA, para formar una molécula de ADN de una hebra (ssDNA). Una vez cortada la hebra de T-DNA, VirD1 se separa de la molécula de ssDNA mientras que VirD2 permanece unido, formando el complejo-T (Figura 2.4) (Tzfira y Citovski, 2006).

Proteínas VirB forman un canal de secreción entre la membrana bacteriana y la célula vegetal, a través del cual se transporta el complejo-T (Figura 2.5). Para que esto suceda

otra proteína VirD4, funciona como enlace entre el complejo-T y el canal de secreción formado por VirB (Gelvin, 2003).

Junto con el complejo-T también son secretadas proteínas VirE2 y VirF. Una vez dentro del citoplasma de la célula vegetal, las proteínas VirE2 recubren al complejo-T (Figura 2.6), lo que le confiere al T-DNA de la resistencia necesaria para su transporte al núcleo de la célula vegetal (Figura 2.7) (Tzfira y Citovski 2006; Gelvin, 2003). Adicionalmente otras proteínas como VirF y VIP1 posiblemente funcionen como importinas (asociación de proteínas con la familia de receptores Karyopherin en los poros del núcleo que facilitan la entrada y se disocian una vez dentro del núcleo (Tzfira y Citovsky, 2004) en el núcleo siendo estas específicas de las especies hospedantes (Gelvin, 2003).

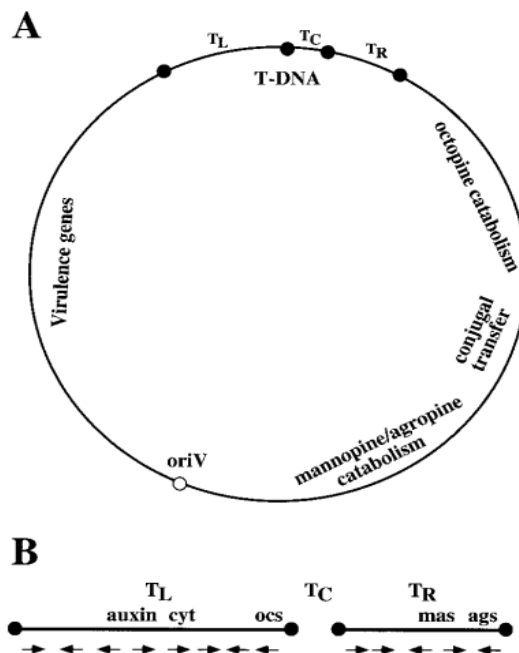


Figura 1. Plásmido Ti .mostrando las regiones: borde izquierdo (TL), la región central (TC) y el borde derecho (TR) en el T-DNA. La región de virulencia se encuentra entre el punto OriV y el borde izquierdo, en esta región se encuentran los genes vir responsables de la virulencia y transferencia del T-DNA (Tomado de Gelvin 2003).

Es durante los últimos pasos de la transformación (Fig. 2.8, 2.9 y 2.10) que *Agrobacterium* utiliza varias enzimas y proteínas del hospedante (Girasas, nucleasas, polimerasas, histonas, etc.) para completar la transformación genética (Tzfira y Citovski, 2006). Muchas de estas enzimas y proteínas son propias de la célula hospedante pero son utilizados por *Agrobacterium* para llevar a cabo las funciones necesarias para insertar el T-DNA en el genoma de la planta (Fig. 3).

La estructura del citoplasma compuesto por micro túbulos, micro fibrillas y actina entre otras restringe la difusión de macromoléculas, por lo que es probable que la liberación de

T-DNA sea similar a diversos DNA virales en las que se utiliza la asistencia de la maquinaria de transporte propia de la célula hospedante (Fig. 4). (Tzfira y Citovski, 2006).

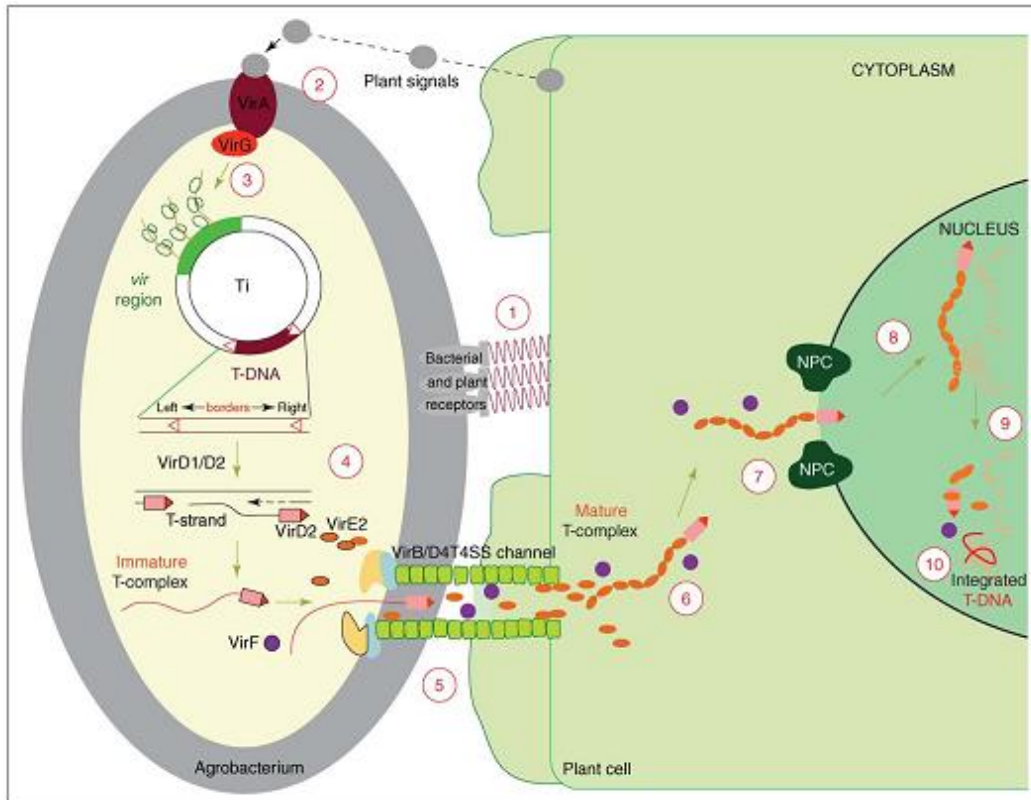


Figura 2. Diagrama del proceso de transferencia del T-DNA de *Agrobacterium* a la célula hospedante (Tomado de Tzfira y Citovski 2006). 1) Anclaje de *Agrobacterium* a la célula vegetal, 2) Señales químicas liberadas por la planta que pueden ser reconocidas por el receptor VirA, 3) Expresión del operon vir, 4) Corte de la hebra de ADN y formación del complejo-T con VirD2, 5) transferencia del complejo-T, proteínas VirE y proteínas VirF a través del canal de VirB, 6) Recubrimiento para la protección del complejo-T con proteínas VirE, 7) Importación al núcleo de la célula vegetal del complejo-T, 8) Reconocimiento de VirD2 del sitio de inserción, 9) Disociación de las proteínas VirE y VirD2 del complejo-T, 10) Integración del T-DNA en el genoma de la planta.

El importe del complejo-T al núcleo requiere un transporte activo debido a su tamaño y ocurre por la maquinaria de transporte de la célula hospedante (Figura 3). Tanto VirD2 como VirE2 interactúan con esta maquinaria para permitir la importación del complejo-T. VirE2 interactúa con una molécula Karyopherin- α (KAP- α) el cual es un receptor para la importación al núcleo, (Fig. 3b), miembro de la familia de genes karyopherin, formando el complejo VIP1 mientras que VirD2 interactúa con VIP1 que es funcionalmente homologa a KAP- α . Ambas interacciones actúan como adaptadores entre el complejo-T y el transportador del núcleo de la célula, mientras la interacción VIP1 habilita el transporte dentro del núcleo de la célula hospedante (Tzfira y Citovski, 2006).

Dentro del núcleo, VIP1 se disocia y el complejo-T interactúa con VirF y ASK1, esta última proteína de unión a cajas-TATA (TBP). Estas interacciones guían al complejo-T hasta el sitio de integración en la cromatina, donde VirD2 corta el sitio de unión y libera el T-DNA (Fig. 3) (Tzfira y Citovski, 2006).

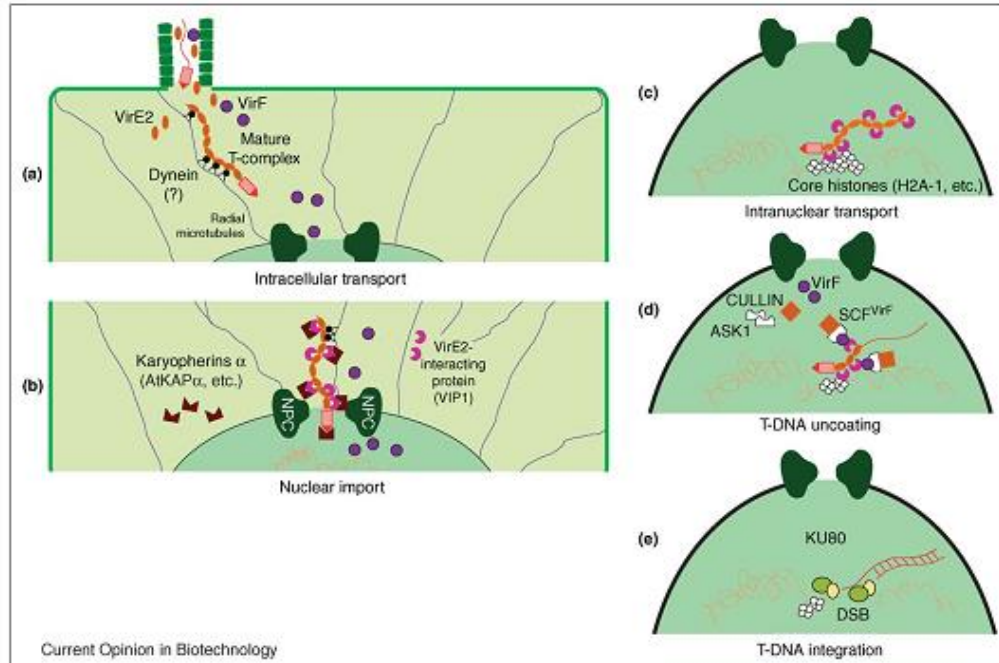


Figura 3. Importación del T-DNA al núcleo de la célula vegetal (a y b). Enzimas y proteínas que *Agrobacterium* secuestra para insertar el T-DNA en el núcleo y en el genoma de la célula hospedante. (c, d y e) (Tomado de Tzfira y Citovski 2006).

No está claro como VIP1 interactúa con las histonas y como se modifica la maquinaria proteolítica para romper el complejo-T e insertarlo en la cromatina. Posiblemente una interacción con VirF funcione como sub unidad de la enzima ubiquitina E3 ligasa y marque al complejo VirE2-VIP1 como objetivo de degradación proteolítica para la liberación del T-DNA. También se ha sugerido un papel funcional de las “DoubleStrandBreaks” (DSBs) para atraer moléculas de T-DNA y utilizar la maquinaria de reparación de ADN de la célula hospedante para convertir la hebra simple de T-DNA en cadena doble una vez que esta se ha integrado al genoma de la planta, sin embargo el mecanismo molecular exacto de la integración de la cadena simple de T-DNA aun es debatido (Tzfira y Citovsky, 2006).

II.VI Modificación de *Agrobacterium* hacia un sistema para la transformación de plantas

Hoekma y colaboradores (1983), describen un sistema para insertar ADN en plantas mediado por cepas de *Agrobacterium* que contienen un plásmido Ti modificado. En estas cepas modificadas el T-DNA se ha removido del plásmido Ti y únicamente se encuentra la región *vir* que actúa en *trans* para un plásmido autónomo que contiene el T-DNA bordeado de secuencias de reconocimiento para su duplicación, corte y transferencia, a este sistema se le denomina como sistema binario, ya que la región *vir* se encuentra en un plásmido Ti desarmado (plásmido Ti carente de T-DNA) y la región de T-DNA se encuentran en un plásmido autónomo (Lee y Gelvin, 2008).

Resultado del sistema propuesto por Hoekmaa y colaboradores (1983), se generó la cepa de *A. tumefaciens* LBA4404 portadora del plásmido pAL4404 que únicamente contiene la región Vir y el origen de replicación, este plásmido también contiene el gen *strB* que

confiere resistencia al antibiótico estreptomina, convirtiendo a la cepa LBA4404 en una cepa muy versátil a la que se le puede incorporar un plásmido foráneo, que previamente ha sido manipulado para portar genes de interés para su incorporación en las plantas.

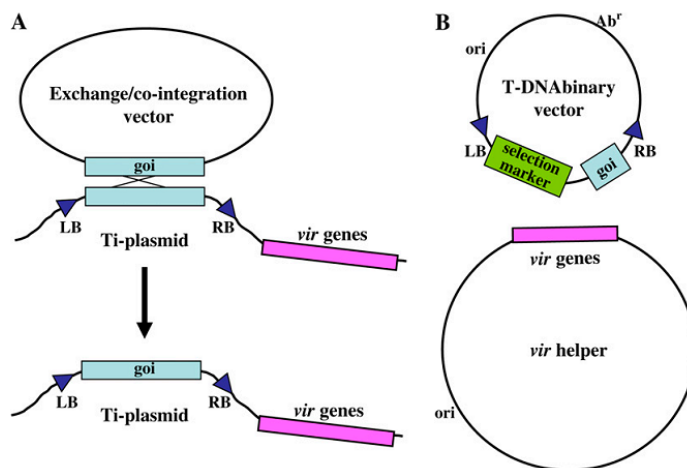


Figura 4. Principales Plásmidos utilizados en la transformación genética de plantas; A) Sistema cointegrado; El gen de interés y la región *vir* se encuentran en el mismo plásmido, para introducir el gen de interés al plásmido Ti es necesario realizar una recombinación previa con un vector de recombinación. B) Sistema binario; El gen de interés y la región *vir* se encuentran en plásmidos independientes. No se requieren recombinaciones adicionales (Tomado de Lee y Gelvin, 2008).

A diferencia de los plásmidos cointegrados que incluyen a la región *vir* y la región T-DNA en un mismo plásmido, los sistemas binarios no requieren una recombinación previa para la construcción del casete de expresión (Fig. 4), lo que facilita el trabajo de la transformación al ahorrar tiempo. Los plásmidos binarios contienen diferentes características útiles para la transformación; Los Bordes izquierdo (LB) y derecho (RB) son secuencias conservadas de 25 pb entre los diferentes plásmidos Ti que permiten ser reconocidos por VirD1 y VirD2 para cortar la cadena de T-DNA, estos bordes deben flanquear la secuencia de interés entre los que se encuentran sitios de restricción que pueden ser usados para insertar el constructo deseado (Fig. 4).

A partir de los resultados de Hoeckmaa y colaboradores (1983), se han desarrollado vectores de transformación más dinámicos que pueden aprovechar de mejor manera la integración de genes foráneos en el genoma de la planta, así como su detección en etapas tempranas del cultivo *in vitro* (Lee y Gelvin, 2008). De esta forma se han aislado promotores y genes marcadores de selección, de fácil detección en los tejidos o plantas transformados por *Agrobacterium* y con el propósito de poder discernir rápidamente y a bajo costo aquellos explantes transformados de aquellos que no han sido transformados durante la interacción con *Agrobacterium* (Birch, 1997).

II.VII Estrategias para la selección de plantas transformadas por *Agrobacterium*

Durante la transformación de numerosos explantes vegetales, identificar entre aquellos explantes transformados y aquellos no transformados, puede resultar costoso y lento, por tal

motivo se recurre a utilizar como estrategia, la incorporación de genes en el vector de transformación que al expresarse, pueden conferir resistencia a un agente químico de selección que de otra forma sería letal para el tejido vegetal (Genes marcadores de selección) o permitir una discriminación visual (Genes reporteros) mediante cambios fenotípicos bajo determinadas circunstancias o condiciones de cultivo, de los explantes transformados (Birch, 1997; Ghim *et al.*, 2010).

Shinoyama y colaboradores (2002), reportaron durante la transformación de crisantemo (*D. grandiflora*) con *A. tumefaciens* el uso del vector pBI101, con capacidad para transferir el gen *aph3'II* que al expresarse, codifica para la enzima neomicin fosfotransferasa II (NPT II), capaz de modificar covalentemente el grupo amino e hidroxilo de G418 (Gentamicina o Kanamicina). G418 es un antibiótico aminoglucósido capaz de bloquear la síntesis de péptidos inhibiendo la etapa de elongación tanto en organismos tanto procariotes como eucariotes uniéndose irreversiblemente a la sub unidad 80S del ribosoma durante la traducción, sin embargo cuando se bloquea el grupo hidroxilo, se inhibe la interacción con el ribosoma perdiendo su capacidad de bloquear la síntesis de péptidos (Davies y Jiménez, 1980).

Otros autores reportaron que durante la transformación de crisantemo (*D. grandiflorum*) con *A. tumefaciens* el uso de un vector pCAMBIA, el cual contiene como gen de selección a Hygromycin phosphotransferasa (*hph*), que codifica para la enzima Hygromycin phosphotransferasa (HPT), capaz de modificar el grupo hidroxilo del compuesto higromicín-B (Higromicina). Al igual que la kanamicina, la higromicina es un aminoglucósido, que inhibe la síntesis de péptidos en procariotes y eucariotes, interfiriendo en este caso con la sub unidad 70S u 80S del ribosoma, sin embargo al fosforilarse el grupo hidroxilo de higromicín-B este pierde su capacidad de unirse a la sub unidad del ribosoma (Pardo *et al.*, 1985; Sen *et al.*, 2013).

Comúnmente se introduce en los vectores de transformación otro tipo de genes que al expresarse, codifican para enzimas con alguna actividad que permiten verificar diversos procesos biológicos de manera rápida y convencional así como detectar eventos genéticos, que al ser introducidos al sistema biológico, proveen de una manera asequible y cuantificable una señal del evento, a estos genes se les denomina como genes reporteros (Ghim *et al.*, 2010).

Teixeira y Fukai (2002), utilizan como genes reporteros al gen *uidA* que codifica para la enzima β -glucoronidasa (GUS) y el gen *gfp* que codifica para la proteína Green Fluorescent Protein (GFP) para verificar la transformación de crisantemo en diferentes métodos de inserción de genes. La enzima GUS degrada 5-bromo-4-cloro-3-indolyl- β glucurónido (X-Gluc), produciendo un residuo indolil que al oxidarse adquiere un color azul índigo de fácil detección (Jefferson 1987). Por otro lado la proteína GFP y sus variantes (CyanFP y Yellow-FP) (Boulin *et al.*, 2006), producen una emisión fluorescente cuando son expuestas a una emisión de luz entre los rangos azul y ultravioleta, que puede detectarse en organismos vivos, tanto procariotes como eucariotes (Chalfie *et al.*, 1994).

Los resultados de Teixeira y Fukai (2002), indican que independientemente del método de transformación, la mayor expresión de *uidA* en las plantas regeneradas se da en aquellas provenientes de explantes de hoja madura y tejido vascular de la hoja después de 48 horas y

logra mantenerse indefinidamente, mientras que *gfp* a pesar de lograr la expresión a las 72 horas, empieza a disminuir gradualmente hasta desaparecer por completo en una semana. Los autores concluyen que la inserción de *uidA* es más estable en el genoma de la planta a medida que se desarrolla, a diferencia de *gfp*, cuya expresión es transitoria.

II.VIII Principales factores que afectan la transformación *in vitro*

Se han reportado múltiples factores que afectan la transformación genética del hospedante al ser infectados por *A. tumefaciens* tales como: la fuente del material vegetal (tipo de explante, edad del explante, variedad vegetal), la cepa y la cantidad de inóculo, el vector, la temperatura, periodo de inoculación de la bacteria, periodo de pre-cultivo y cocultivo, uso de surfactantes y agentes de inducción durante la infección y durante el cocultivo, (Pérez-Piñeiro *et al.*, 2012), sin embargo entre los factores más importantes se encuentran, la concentración de la bacteria, el uso de inductores para la transformación y el periodo de cocultivo (Thiruvengadam *et al.*, 2013), ya que pueden alterar significativamente el proceso de transformación en plantas, y de los cuales va depender el éxito del mejoramiento genético por esta vía.

II.IX Concentración de *Agrobacterium* y tiempo de cocultivo

Se ha reportado que la concentración de inóculo de *A. tumefaciens* y el tiempo de cocultivo de la bacteria con el explante, es un factor determinante en la eficiencia de la transformación genética y además es una variable dependiente de la especie vegetal incluso de variedades de la misma especie (Sherman *et al.*, 1998; Song *et al.*, 2012)

Song y colaboradores (2012), reportaron que concentraciones (expresada en términos de Densidad óptica D.O.) de *Agrobacterium* menor o igual a 0.5 y periodos de cocultivo menor a un día; (Tabla 1) no permiten a la bacteria llevar a cabo el proceso completo de transferencia de ADN en crisantemos de la variedad Orlando, mientras que concentraciones de la bacteria mayor o igual a 3 (Tabla 1) y periodos de cocultivo de más de 5 días (Tabla 1) con *A. tumefaciens* pueden provocar una invasión del medio y del explante por parte de la bacteria, provocando la muerte del explante (Song *et al.*, 2012; Tabla 1).

Algunos reportes mencionan que la introducción del gen (Gamma-cadinene sintasa) en dos variedades de crisantemo, usando diferentes concentraciones de *A. tumefaciens* con D.O. entre 0.8 y 1.0, con un periodo de cocultivo de 2 días, mostraron una diferencia en la frecuencia de transformación dependiente de la concentración de inóculo (Valizadeh *et al.*, (2012). Por otro lado, Sen y colaboradores (2013), realizaron la introducción del gen *chiII* (Quitinasa II) proveniente del arroz en crisantemo variedad “Snow ball”, usando una concentración de *A. tumefaciens* de D.O. = 0.5 y un periodo de cocultivo de 4 días, logrando la obtención de plantas transformadas.

Otros trabajos de transformación realizados con *A. rizógenes* en zanahoria (*Daucus carota*), utilizando como variables periodo de cocultivo (2, 4, 6 y 8 días) a una concentración constante de 1×10^8 células/ ml (D.O. = 1) de *A. tumefaciens*, reportaron una correlación entre el tiempo de cocultivo y el uso de acetosiringona, incrementándose el número de transformantes (43.75%) con 6 días de cocultivo (Blanco *et al.*, 2003).

El efecto de la concentración de *A. tumefaciens* y el periodo de cocultivo en la transformación de callo embriogénico de palma (*Elaeis quineensis*) fueron reportados por Yenchón y Te-chato (2012). Estos autores utilizaron cuatro concentraciones ($OD_{600}= 0.4$, $OD_{600}= 0.6$, $OD_{600}= 0.8$ y $OD_{600}= 1.0$) de *A. tumefaciens* a cuatro periodos de inoculación (2 hrs, 4hrs, 6hrs y 12 hrs), mientras que el periodo de cocultivo varió de 2 a 5 días. Los mejores resultados fueron obtenidos una $DO_{600}= 0.8$, por 6 horas de inóculo y 3 días de cocultivo. Los autores mencionan que concentraciones altas de *A. tumefaciens* ($DO_{600}= 1.0$ para esta especie), pueden dañar la células del explante y afectar su futura regeneración.

Ninguno de los trabajos reportados en este documento, analiza la interacción entre los factores durante la transformación, sin dejar claro como un factor se ve afectado en función de otro factor.

II.X Aplicación de Acetosiringona como potenciador de la transformación

Algunos experimentos con el objeto de incrementar la eficiencia de transformación han manipulado la percepción de señales por parte de VirA o VirG adicionando los compuestos fenólicos que son reconocidos (Blanco *et al.*, 2003), de estos, la acetosiringona es el que mejores resultados ha mostrado, ya que el pH para ser reconocido por VirA converge en 5.8, con el pH utilizado en medios de cultivo *in vitro* de plantas (Wise *et al.*, 2006). La adición de acetosiringona durante la inoculación y cocultivo de los explantes con *A. tumefaciens* fue reportado como un potenciador de la eficiencia de transformación. Ya que la acetosiringona estimula la transcripción de los genes *vir* facilitando la transferencia del T-DNA (Tzfira y Citovski 2006).

Rashid y colaboradores (2012), al evaluar diferentes concentraciones de acetosiringona durante el cocultivo, en dos cultivares de trigo y su efecto en la eficiencia de transformación determinaron que la eficiencia de transformación en forma dosis-respuesta hasta 400 μM disminuía en dosis altas de acetosiringona.

Otros trabajos con *Rosa hybrida*, confirman la importancia de la acetosiringona durante la transformación. Los autores, evaluaron concentraciones de 0, 50, 100, 150 y 200 μM de acetosiringona, durante el cocultivo. El resultado fue un mayor porcentaje de explantes transformados a una concentración de 50 μM , sin embargo también reportan que las concentraciones de 100 μM , 150 μM y 200 μM reducen en forma lineal el número de explantes transformados (Ming *et al.*, 2007).

Por su parte Sunjung (2012), evaluó el efecto de concentraciones de 0 μM , 100 μM , 200 μM y 400 μM de acetosiringona durante el cocultivo en explantes de hoja de tabaco, sus resultados muestran que no hubo una diferencia significativa entre las concentraciones de 200 μM y 400 μM , y entre las concentraciones de 0 μM y 100 μM comportándose como grupos diferentes.

Teixeira y Fukai (2002), utilizaron 0 y 100 μM de acetosiringona, tanto en el medio de infección, como durante el cocultivo del explante, obteniendo una diferencia significativa en el porcentaje de explantes transformados a los que se les aplicó 100 μM de acetosiringona.

II.XI Métodos de desinfección

Para la recuperación de los explantes transformados con *A. tumefaciens* es necesario eliminar la bacteria, por tal motivo se lleva a cabo un proceso de desinfección del explante con antibióticos que inhiben el crecimiento de *Agrobacterium*. Dichos antibióticos en dosis elevadas pueden tener efectos fitotóxicos sobre el explante debido a la inhibición de procesos metabólicos como el de la kanamicina o higromicina (Davies y Jiménez, 1980, Chalief, 1994), ocasionando necrosis y baja respuesta a la regeneración (Magdum, 2013) mientras que una dosis baja puede no inhibir por completo el crecimiento de la bacteria (Cheng, 1998).

Vieira y Carneiro (2000), mencionan que la desinfección de *A. tumefaciens* en explantes de *Stylosanthes guianensis* mediante el uso de cefotaxina a una concentración de 250 µg/ml o 100 µg/ml resultó en una disminución en la capacidad de regeneración del callo en comparación con el uso de tetraciclina a una concentración de 50 µg/ml, en el que resulto de tres a nueve veces mayor en la capacidad de regeneración. Esto sugiere que puede existir una predisposición de los explantes a ser más o menos sensibles frente a ciertos tipos de antibiótico.

Teixeira y colaboradores (2003), evaluaron la fitotoxicidad de los antibióticos ampicilina, penicilina, cloranfenicol, bialaphos (herbicida), rifampicina, minomycina y estreptomycina en explantes transformados de tabaco y crisantemo, mostrando que sin excepción la adición de cualquier antibiótico al medio de cultivo *in vitro* afecta negativamente la morfogénesis del callo de crisantemo, así como su sobrevivencia. Además este efecto se incrementa exponencialmente al incrementar linealmente la concentración de antibióticos. Sin embargo, también reportaron la dependencia del genotipo del crisantemo y la variedad sobre la susceptibilidad a los efectos negativos de la adición de antibióticos.

En crisantemo los principales antibióticos utilizados para la desinfección de los explantes transformados son cefotaxina, carbenicilina y vancomicina. Teixeira y Fukai (2001), evaluaron el efecto de estos antibióticos y su capacidad de desinfección a diferentes concentraciones, sobre diferentes cepas de *A. tumefaciens* incluyendo la cepa LBA4404, mostrando el efecto sinérgico de la combinación de dos o más antibióticos a bajas concentraciones, en especial utilizando cefotaxina en combinación con cualquier otro antibiótico evaluado. También reportaron el efecto fitotóxico para la morfogénesis al utilizar cualquiera de los tres antibióticos en concentraciones altas y bajas.

El efecto fitotóxico de los antibióticos en los cultivos de tejidos vegetales de crisantemo también se ha reportado en otras especies como el jitomate (*Solanum lycopersicum esculentum*) según nueva clasificación (*Lycopersicum esculentum*), por lo que se ha propuesto la utilización de antibiótico menos agresivos en combinación con bajas concentraciones de otro antibióticos. Costa y colaboradores (2000), proponen el uso de timentín (este antibiótico es una mezcla de ticarcilín que pertenece al grupo de las β -lactamasas y clavulanato de potasio en una proporción de 10:1) para la desinfección y regeneración de jitomate, el ticarcilín junto con la carbenicilina tienen una estructura similar a las auxinas, provocando un efecto de regulador de crecimiento cuando son degradados, facilitando la regeneración de los brotes en el jitomate.

Tang y colaboradores (2000), compararon el efecto de cuatro antibióticos (ampicilina, carbenicilina, cefotaxina y timentín), sobre la eliminación de *A. tumefaciens* y sus repercusiones en la proliferación de embriones somáticos. El timentín eliminó a la bacteria, en todos los tiempo evaluados (15 días, 30 días, 45 días y 60 días) al evitar la contaminación de los explantes, en comparación con la ampicilina, en la cual el 87% de los explantes mostró contaminación por *A. tumefaciens* a los 15 días. Los explantes tratados con cefotaxina presentaron una contaminación del 58% a los 45 días del tratamiento, mientras que la carbenicilina no funcionó para la eliminación de la bacteria a los 0 días. Para la generación de embriones somáticos la tendencia fue similar en todos los antibióticos y a otros estudios, en los que a medida que se aumenta la concentración de antibiótico se reduce la capacidad de generación de embriones somáticos.

II.XII Variedad y tipo de explante empleado para la transformación

El tipo de explante utilizado en la transformación afecta la eficiencia de transformación. Al respecto Birch (1997), recomienda considerar parámetros como el método de transferencia del gen foráneo, el tipo de explante, el protocolo de regeneración, la selección del explante transformado y tratamiento hormonal para mejorar la eficiencia de transformación.

Shinoyama y colaboradores (2002), evaluaron la transformación de la variedad de crisantemo “Shuho-no-chikara” usando como constantes la concentración de *Agrobacterium tumefaciens* (D.O. = 0.1) y el periodo de cocultivo (3días) en dos sistemas (inducción de brotes, e inducción de callo), obteniendo una eficiencia de transformación de 28.7% en el sistema de inducción de brotes y de 13.6% en el sistema de inducción de callo, sin embargo solamente el 1.3% de los explantes en el sistema de inducción de brotes logro regenerar hasta plantas completas, comparado con el 4.4% del sistema de inducción de callo.

Por otro lado, Sherman y colaboradores (1998), usaron una concentración constante de *A. tumefaciens* (D.O. igual a 2.2) y un periodo de cocultivo con la bacteria durante 5 días, estableciendo las condiciones de transformación para las variedades de crisantemo “White Polaris”, “Iridion” y “Heckla”, logrando obtener transformantes de las tres variedades con estas condiciones, sin embargo, afirman que las diferencias en la frecuencia de transformación son evidentes en los diferentes genotipos, siendo “White Polaris” la variedad con mejores resultados (96% de explantes positivos), seguida de “Heckla” (75% de explantes positivos) y finalmente “Iridion” (50% de explantes positivos).

Wordragen y colaboradores (1991), evaluaron la especificidad de 14 cultivares de crisantemo frente a tres cepas de *A. tumefaciens* (LBA4404, Ach5 y C58) y la susceptibilidad de la variedad de crisantemo “Parliament” a 14 cepas de *A. tumefaciens* (LBA1, LBA8250, LBA8370, LBA8150, LBA201, LBA8180, LBA8120, LBA8490, LBA9220, LBA9402, LBA9365, LBA9000, LBA9070 y CHR3). Los autores concluyeron que existe una alta dependencia entre el genotipo de la variedad de crisantemo y la cepa de *A. tumefaciens* utilizada, ya que 4 de los genotipos (Parliament, Cottonball, D.P. Pompon y Daymark) fueron susceptibles a la infección. Con respecto a la cepa de *A. tumefaciens* encontraron que aquellas cepas con metabolismo tipo opina como LBA4404 son más eficientes para llevar a cabo la transferencia del T-DNA.

Ledger y colaboradores (1991), reportaron que el cultivar debe ser susceptible a la infección por *A. tumefaciens* y debe tener capacidad de regeneración de los explantes o del callo transformado. Los mismos autores evaluaron seis genotipos de crisantemo *Dendrathera morifolium* y uno de crisantemo *Dendrathera indicum*, encontrando que este último produjo la mejor respuesta para regeneración en comparación con los demás genotipos evaluados.

II.XIII Eficiencias de transformación

La eficiencia de la transformación varía de acuerdo al método utilizado (Tabla 1) y de la susceptibilidad de la especie a ser transformada por ese método, un ejemplo de esto es el caso de las monocotiledóneas y algunas especies de árboles maderables, las cuales han mostrado ser recalcitrantes a la transformación mediada por *A. tumefaciens*. Sin embargo, la utilización de *A. rizhogenes* ha mostrado mejores resultados en estas últimas (Díaz *et al.*, 2010).

A pesar de la capacidad de *A. tumefaciens* para transferir genes al genoma de la planta, la frecuencia y eficiencia de transformación permanece baja en un gran número de especies y variedades, debido posiblemente, a que, al ser un patógeno, la bacteria estimula las respuestas defensivas de la planta (Chung *et al.*, 2005). Algunas especies responden a la infección de *A. tumefaciens* liberando fenoles y compuestos oxidativos desde la vacuola, lo que provoca el oscurecimiento del tejido, explante o callo con la muerte consecuente de este, antes de que se pueda concluir la transferencia del T-DNA (Azofeifa, 2009). Pherl y colaboradores (1996), resolvieron el oscurecimiento del callo en *Vitis vinifera*, una especie recalcitrante a la infección, mediante la utilización de antioxidantes (PVP, PVPP, DTT, L-Cisteína, Ácido ascórbico, Ácido cítrico) en medio bicapa, logrando recuperar 63 % de los callos con capacidad embriogénica después de un cocultivo de 48 horas del callo con *Agrobacterium tumefaciens*.

Diversos trabajos han reportado múltiples factores que afectan el proceso de transformación (Tabla 1) los cuales modifican de manera sustancial la eficiencia de transformación, dentro de los que destacan el tiempo de cocultivo (Zheng y Yang, 2001), la concentración de inóculo de *A. tumefaciens* (Takatsu *et al.*, 2000), el uso de acetosiringona (Takatsu *et al.*, 2000), la evaluación de la capacidad de regeneración (Teixeira *et al.*, 2003; Blanco *et al.*, 2003, Vieira y Carneiro 2000) o el uso de diferentes tipos de explante como hoja, pétalo, tallo o callo (Birch, 1997).

Teixeira y Fukai (2003), reportaron el efecto de dos métodos de introducción de genes en crisantemo (Biobalística y *A. tumefaciens*) sobre la capacidad de este para generar brotes en cultivo *in vitro* y para regenerar plantas completas, de los cuales la biobalística tuvo una mayor sobrevivencia de explantes, sin embargo, *Agrobacterium* tuvo una mayor expresión del gen *uidA* en el callo transformado, esto posiblemente se debió a que durante la transformación con biobalística la inserción de múltiples copias de *uidA* provoca su silenciamiento, evitando la actividad de GUS.

Tabla 1.- Comparación entre diferentes protocolos de transformación en ornamentales.

Factores evaluados					
Autor	Tiempo de cocultivo	Concentración de A. tumefaciens	Concentración de acetosiringona	Tipo de Antibiótico y su concentración	Eficiencia de transformación
Vieira y Carneiro. 2000	48 hr	1x10 ⁹	40 µM	Cefotaxina 250 µg/ml ó 100 µg/ml y tetraciclina 50mg/l	Cefotaxina reduce la SRC Tetraciclina no afecta la regeneración
Zheng y Yang. 2001	3 días	Células en suspensión con DO ₆₀₀ = ±2.0	N/E	Carbenicilina 500 mg/l	N/E
Teixeira y Fukai 2001	N/E	OD ₅₄₀ = 0.4-0.5	N/E	Vancomicina Cefotaxina Carbenicilina	250 VA 400 CE 400 CA
Kudo <i>et al.</i> 2002	1, 2 y 4 días	N/E	N/E	Kanamicina 10 mg/l, 50mg/l y 100 mg/l	1 y 2 días insuficientes para la transformación
Teixeira 2003	0, 1, 2, 3, 4 y 5 días	DO ₅₄₀ = 0.4 a 0.5	0 y 100 mM	Cefotaxina 250 mg/l Kanamicina 10 mg/l	Otros tratamientos tuvieron menos de 10%
Toguri <i>et al.</i> 2003	3 días	N/E	20 µM	Cefotaxina 250 mg/l Kanamicina 12.5 mg/l	0.4%
Sunjung 2006	4 días	OD ₆₀₀ = 0.003, 0.03 y 0.3	0, 100, 200 y 400 µM	Kanamicina 500, 2000 y 4000 mg/l	0.3, 200 y 500 = 30 % 0 µM no hay formación de pili
Ming <i>et al.</i> 2007	3 días	N/E	0, 50, 100, 150 y 200 µM	N/E	50 = 57%
Teixeira <i>et al.</i> , 2005.	2 días		100 mM	Kanamicina 30mg/l	21%
Song <i>et al.</i> 2012	1, 2 ó 3 Días	25ml de A. tumefaciens OD = 0.8	N/E	Desinfección: Kanamicina 7.5 mg/l Cefotaxina 250 mg/l Experimento 2: Kanamicina 0.0, 2.5, 5.0, 7.0 ó 10.0 mg/l	Efecto del periodo de cocultivo: 2 días = 13.3% Experimento 2: Disminución drástica de brotes a 7.0 mg/l

*N/E: No especificado.

En toda la revisión realizada se observó que los numerosos protocolos de transformación que pretenden optimizar la eficiencia de transformación (Tabla1), no fueron planteados bajo ningún esquema formal de optimización. Ya que la optimización debe ocurrir dentro del diseño de experimentos que permia evaluar el efecto de cada factor involucrado, así como la interacción entre los mismos, mientras que los protocolos propuestos, solo plantean un conjunto de variables modificadas para obtener el tratamiento con mejores resultados (Tabla 1). En el crisantemo las eficiencias de transformación se han reportado con una ocurrencia desde 0.4% (Toguri *et al.*, 2003) hasta 13.2% (Song *et al.*, 2012) de explantes transformados (ver tabla 1). Aunque la eficiencia de transformación depende de varios factores los parámetros evaluados para mejorar la eficiencia de transformación se proponen la concentración de la bacteria en el inóculo, el periodo de cocultivo y la

concentración de acetosiringona (Song, 2012), sin que se pueda proponer un protocolo estándar de transformación genética para esta especie. Así durante la revisión se encontraron evaluaciones de diferentes vectores de transformación, diferentes cepas de *Agrobacterium*, diferentes tipos de explante, condiciones variables de cultivo *in vitro*, y procesos de transformación no estandarizados, lo que da como resultado un pobre conocimiento sobre las causas probables de variación entre uno y otro protocolo.

De los parámetros a considerar para la transformación genética aquellos que se han reportado como más influyentes para lograr la transformación (Concentración de *A. tumefaciens*, Concentración de acetosiringona y periodo de Cocultivo), están asociados directamente a la interacción de la célula vegetal con la bacteria, por lo que en este trabajo se pretende implementar un protocolo de transformación genética para crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) Var. Micromargara, seleccionando la mejor interacción entre estos factores para obtener el mayor número de transformantes.

III. HIPÓTESIS

Si los factores: periodo de cocultivo con la bacteria, concentración de *A. tumefaciens* y concentración de acetosiringona, tienen un efecto significativo sobre la transformación y el tipo y concentración de antibiótico afectan la obtención de plantas transformadas genéticamente a través de *A. tumefaciens*, entonces es posible mejorar la eficiencia de la transformación y desinfección de explantes de crisantemo var. micromargara, transformados genéticamente, seleccionando la mejor interacción entre las variables mencionadas.

IV. OBJETIVOS

IV.I Objetivo General

Evaluar el efecto de la interacción entre los factores que afectan la transformación genética de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) por medio de *Agrobacterium tumefaciens* a partir de callo obtenido de la variedad micro margara.

IV.II Objetivos Particulares

- 1.- Evaluar el efecto de diferentes antibióticos sobre la inhibición de *A. tumefaciens*. y su efecto sobre la desinfección de los callos de crisantemo var. micromargara..
- 2.- Evaluar el efecto de PVPP sobre el oscurecimiento de los callos durante la propagación *in vitro* de crisantemo.
- 3.- Evaluar el efecto de la concentración de *Agrobacterium*, el periodo de cocultivo y la concentración de acetosiringona, sobre la eficiencia de transformación del callo de crisantemo var. micromargara, así como la interacción entre estos factores.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.I Vector de transformación utilizado

Para la transformación genética de los callos de Crisantemo var. micromargara mediante *A. tumefaciens*, se utilizó el plásmido binario pBI121 (Figura 7), que contiene dentro de la región de T-DNA un cassette de expresión en plantas formado por el gen de selección *aph3'II* que codifica para la enzima neomicin fosfotransferasa II (NPTII) y el gen reportero *uidA* que codifica para la enzima β -Glucuronidasa (GUS) (Chen *et al.*, 2003). Este cassette de expresión contiene tres sitios de restricción entre el promotor 35S y el gen *uidA*. El plásmido pBI121 adicionalmente contiene un cassette de expresión para bacterias, formado por el gen de selección *aph3'II*, un sitio de replicación para *E.coli* (*pUCori*) y un origen de replicación para *A.tumefaciens* cepa LBA4404 (*OriA*) (Wu, 1989).

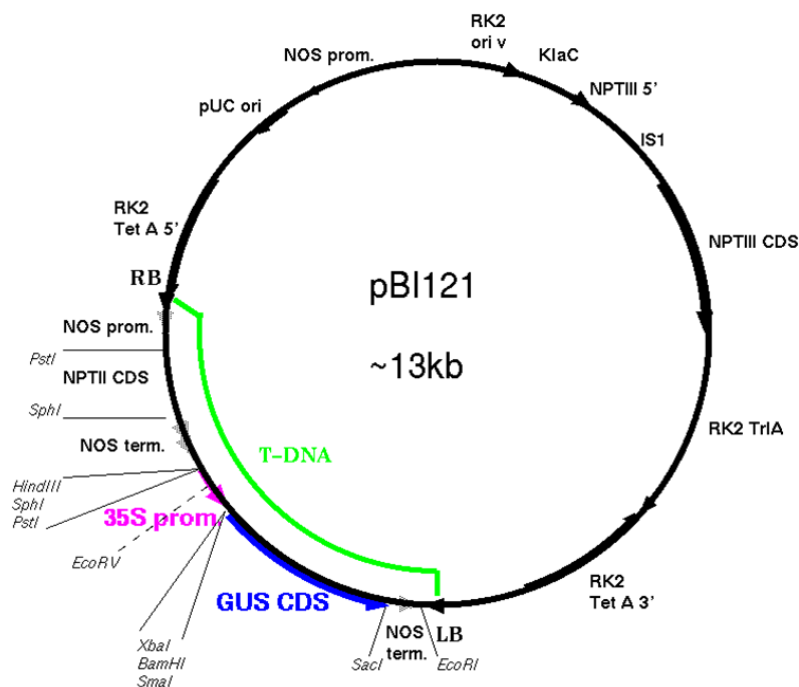


Figura 5. Mapa completo del plásmido pBI121 (tomado de Wu 1988), en el cual se observan las diferentes regiones que forman parte del T-DNA.: Bordes izquierdo (LB) y derecho (RB), NOS prom.: Promotor de la nopalina sintasa, NPTII CDS: gen que codifica para la enzima Neomicin fosfotransferasa II, NOS term: Terminador de la nopalina sintasa, 35S prom: promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, GUS CDS: Gen de la enzima β -glucuronidasa, Sitios de restricción dentro de la región de T-DNA: PstI, SphI, HindIII, EcoRV, XbaI, BamHI, SmaI, SacI y EcoRI.

V.II Transformación de *E. coli* con el vector de transformación

Se utilizó la cepa comercial de *E. coli* TOP10 (Invitrogen®) en la cual se introdujo el vector pBI121 por choque térmico (Singh *et al.*, 2010), descongelando las células de *E. coli* en hielo por 30 minutos, a las cuales posteriormente se les adicionó por pipeteo directo 1 μ l del vector pBI121 que contenía una cantidad de 10 pg de ADN y mezclado por inversión 3

veces, posteriormente se incubo en hielo por 30 minutos para enseguida aplicar el choque térmico a 37°C por 2 minutos seguido de una incubación en hielo por 5 minutos. Posterior al choque térmico se adicionó 300 µl de medio SOC y se incubo por 1 hora a temperatura ambiente en agitación constante a 225 rpm y se realizó un plaqueo en medio de selección para *E. coli* (Medio Luria-bertani (LB) adicionado con 50mg/l de kanamicina), el cual fue incubado a 37°C durante una noche. Al día siguiente se seleccionó una colonia y se incubo durante 24 hrs en medio de selección líquido LB adicionado con 50 mg/l de kanamicina, con agitación constante a 250 rpm y 37°C, las demás colonias se mantuvieron en refrigeración a 4°C.

V.III Purificación del vector de transformación

Las células transformadas de *E. coli* e incubadas por 24 hrs fueron concentradas y sometidas a un tratamiento de extracción de ADN plasmídico, utilizando el kit comercial de invitrogen “PureLink® Quick Plasmid Miniprep Kit”, el cual consiste en una extracción por columna con membrana de silica que permite obtener cantidades de ADN plasmídico arriba de 30 µg

Una vez obtenido el ADN plasmídico se realizó una digestión con enzimas de restricción, tomando una alícuota de 1 µl que contenía 10pg de ADN y se diluyó en 9 µl de agua destilada estéril, a la cual, se realizaron dos pruebas de digestión con enzimas de restricción (PstI y HindIII + EcoRI), para corroborar la identidad del plásmido. De acuerdo a los reportes de Chen y colaboradores (2003), se espera obtener tres fragmentos, uno de aproximadamente 7.1 kb, un fragmento de 4.5kb aproximadamente y un fragmento de 2 kb aproximadamente con la digestión de PstI, mientras que con la combinación de HindIII y EcoRI se espera obtener dos fragmentos, uno de 3.5kb y un fragmento de 8.5 kb.

V.IV Transformación de la cepa *A. tumefaciens* LBA4404 con el vector pBI121

Se utilizó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA4404 de Invitrogen® que contiene el plásmido pAL4404 (Hoekmaa 1983); este plásmido contiene la región *vir*, el origen de replicación y genes que proveen de resistencia a los antibióticos estreptomycinina y espectinomycinina.

Para la introducción del vector en *A. tumefaciens*, se reactivó la competencia de las células de *A. tumefaciens* cepa LBA4404 comerciales (Invitrogen®) siguiendo el protocolo de McCormac et al (1998), que consistió en un cultivar la bacteria durante 24 hrs a 30 °C en medio LB, para posteriormente concentrar las células en frio y diluir en alícuotas de 40µl en una solución al 10% de glicerol para posteriormente congelar instantáneamente en nitrógeno líquido.

Se utilizó un vial de 40µl de células de *A. tumefaciens* LBA4404 reactivadas competentemente para ser transformadas por electroporación siguiendo las condiciones propuestas por Wise et al (2006), el cual consistió brevemente en colocar una alícuota en una cubeta de electroporación con 10 µg del vector de transformación, y aplicar un choque eléctrico a 2000 volts. Posteriormente se adicionó medio SOC (600µl) y se incubó por 3 horas en agitación constante y a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación se plaqueó una muestra de 20µl en medio de selección para *A. tumefaciens* (Medio LB adicionado con 50µg/ml de kanamicina y 100 µg/ml de estreptomycinina) y se incubaron a

30°C por 24 horas. Una alícuota de *A. tumefaciens* cepa LBA4404 sin ser sometida a electroporación se utilizó para ser plaqueada en medio de selección para *A. tumefaciens*

Las colonias transformada fueron conservadas en refrigeración a 4°C, de las cuales se seleccionó una al azar para realizar extracción de plásmidos y digestión de estos por el método descrito anteriormente en este trabajo para *E. coli*.

V.V Evaluación del efecto de los antibióticos sobre el crecimiento de *A. tumefaciens* transformada con pBI121

Las cepa de *A. tumefaciens* transformada con pBI121 se incubó durante 24 hrs en medio líquido de selección (LB adicionado con 100µg/ml de Estreptomycin y 50µg/ml de Kanamicina) para *A. tumefaciens* a agitación constante de 250 rpm y temperatura de 30°C. Se realizó un plaqueo por triplicado en placas con medio LB adicionado con diferentes antibióticos (carbenicilina o Timentín) a diferentes concentraciones (0, 50, 100 y 250 µg/ml) a partir de la cual se determinó el antibiótico y su concentración a la cual se inhibe el crecimiento de la bacteria.

V.VI Obtención del callo de *D. grandiflorum* Var. Micromargara

El callo utilizado en este trabajo fue obtenido a partir de plantas *in vitro* de crisantemo var. micromargara, con capítulos color lila. El callo inicial fue donado amablemente por la Dra. Guadalupe López. Los callos fueron obtenidos a partir de hojas, los explantes fueron inducidos para la formación de callo en un medio reportado por Vences-Contreras y colaboradores (2009), modificado por Lopez-Puc (2012 datos no publicados) y finalmente adecuado mediante la adición de Polivinil polipirrolidona (PVPP).

Las plantas *in vitro* de crisantemo se propagaron en medio de cultivo TC4 (Sales MS 4.4 gr/l, Sacarosa 3%, Benzyl aminopurina 4.4 mM, Ac. Naftalenacético 0.89%, pH 5.8) colocando segmentos de tallo de 2 cms en el medio, durante 30 días en cultivo *in vitro*, con fotoperiodo de 16 hrs luz, humedad relativa del 80% y temperatura de 25°C ± 2°C. Posteriormente se cosecharon hojas nuevas por debajo del meristemo apical de las plantas *in vitro* y se aplicaron cortes superficiales en la parte adaxial en forma de cuadrícula, finalmente se colocaron las hojas en medio de inducción de callo con la parte abaxial en contacto con el medio.

Se evaluó la viabilidad de los callos en dos medios de inducción de callo. Medio CC3 compuesto por sales MS 4.4 gr/l, Sacarosa 3%, Benzyl aminopurina 2.6 mM, Ac. Naftalenacético 0.89% y pH de 5.8 y medio CC con la misma composición que el medio CC3, adicionado con 0.1% de Polivinil polipirrolidona (PVPP). Se colocaron 130 explantes en medio CC3 y 130 en medio CC por un periodo de 15 días bajo condiciones de fotoperiodo de 16 hrs luz, humedad relativa 80% y temperatura de 25°C ± 2°, al término del cual se determinó el porcentaje de callos fenolizados y se seleccionó el medio con mejores resultados en callos no fenolizados.

Los callos fueron divididos por la mitad y cambiados a medio fresco CC (Tabla 3) cada 15 días. Las condiciones de cultivo *in vitro* fueron con fotoperiodo de 16 hrs luz y 8 hrs oscuridad, humedad relativa del ambiente del 80% y temperatura de 25°C ± 2°C.

V.VII Efecto del antibiótico sobre la viabilidad del callo

Con el objeto de determinar la concentración máxima en la cual el antibiótico resulta tóxicos a los callos, se planteó un ensayo de curva letal media en el que se evaluó el efecto de Timentín (Ticarcilín en conjunto con clavulanato de potasio a una relación 10:1) en 5 concentraciones diferentes 0 µg/ml, 50µg/ml, 100µg/ml, 250µg/ml y 350 µg/ml.

En cada tratamiento se utilizaron 5 callos con un peso promedio de 0.8 gr y se hicieron 4 réplicas de cada tratamiento. La variable de respuesta evaluada para toxicidad fue el porcentaje de callos fenolizados a los 0 días, 1 días, 5 días y 10 días, con un cambio intermedio de medio a medio fresco con la misma concentración de antibiótico al sexto día de cultivo.

V.VIII Procedimiento para la transformación del callo de crisantemo

Se empleó un diseño factorial 2^3 (Tabla 2), en el que se evaluaron dos concentraciones del inóculo de *A. tumefaciens*, medida por densidad óptica a 600 nanómetros (D.O.600), dos concentraciones de acetosiringona, aplicada durante la infección y durante el cocultivo y dos periodos de cocultivo. Se emplearon 8 callos por tratamiento con 3 repeticiones, para totalizar 24 callos.

Tabla 2.- Diseño experimental codificado para la evaluación de los principales factores involucrados en la transformación genética del crisantemo: Factor A = Periodo de cocultivo + = 3 días - = 1 día; Factor B = Concentración de *A. tumefaciens* + = DO₆₀₀: 2, - = DO₆₀₀: 1.; Factor C = Concentración de acetosiringona + = 100 µM (0.02g/l), - = 50 µM (0.01g/l).

Experimento	Factor A (Periodo de cocultivo)	Factor B (Concentración de <i>A.</i> <i>tumefaciens</i>)	Factor C (Concentración de Acetosiringona)
1	+	+	+
2	+	+	-
3	+	-	+
4	+	-	-
5	-	+	+
6	-	+	-
7	-	-	+
8	-	-	-

El proceso general para la transformación de los callos de crisantemo, por *A. tumefaciens*, (Shinoyama *et al.*, 2002), se realizó por medio de inmersión durante 20 minutos, en una solución de transformación, compuesto por Glucosa 10mM y acetosiringona (Teixeira y Fukai, 2003), donde la concentración de *A. tumefaciens* varió entre una D.O.₆₀₀ de 1 o 2 y la concentración de acetosiringona varió entre 50 o 100 µM, posteriormente se retiró el exceso solución con papel absorbente estéril y se colocó el callo en un medio de cocultivo (Medio CC adicionado con la misma concentración de acetosiringona utilizada en la solución de transformación), por un periodo de 1 o 3 días.

Al finalizar el cocultivo se retiró el callo del medio de cocultivo y se realizaron 2 lavados con 250mg/l de timentín y un lavado con agua estéril, el exceso de agua se retiró con papel absorbente y se cultivó el callo en medio de desinfección (Medio CC, adicionado con 250 mg/l) por 5 días, seguido de 2 lavados con 250mg/l de timentín y un lavado con agua estéril y cultivado 5 días en medio de desinfección nuevamente (Shinoyama *et al.*, 2002)

Al finalizar el periodo de desinfección se analizó la eficiencia de transformación como porcentaje de callos transformados.

V.IX Tratamiento histoquímico para detectar la actividad de GUS

El ensayo histoquímico se realizó utilizando el kit comercial “ β -Glucuronidase Reporter Gene Staining Kit” de Sigma Aldrich®, que brevemente consistió preparar una solución de tinción compuesta por 5-bromo-4cloro-3indolil glucoronido (X-Gluc) diluido en DMSO a una concentración de 350 mg/ml, Fosfato de sodio pH7 200mM con EDTA 4mM al 25%, Ferricyanida de potasio 100mM y Ferrocyanida de potasio 100 mM al 10% cada una y Metanol al 20% para regular el pH de la solución.

El callo transformado fue transferido a viales con la solución de tinción y posteriormente fue incubado a 37°C por 24 hrs. Al finalizar la incubación se realizaron dos lavados con etanol al 70% y un lavado con acetona al 50% siguiendo las recomendaciones de Jefferson (1989). Finalmente se registró mediante observación en estereoscopio el número de explantes que presentaron coloración azul y su porcentaje por tratamiento.

V.X Extracción de, ARN y síntesis de cDNA

Posterior al tratamiento histoquímico, se pulverizó 600-800 mg de los callos empleando nitrógeno líquido, y el polvo se transfirió a la solución de lisis y separación de componentes celulares reportada por Chomczynski y Sacchi (2006) modificado con la adición de tiocinato de amonio, donde se incubaron por 30 minutos en hielo, con inversiones recurrentes. La solución de lisis tiene una composición de Fenol-Cloroformo 38%, Tiocinato de Guanidina 0.8M, Tiocinato de Amonio 0.4M, Acetato de Sodio pH5 0.1M, Glicerol 5%. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugó a 12000 rpm por 12 min. a temperatura de 3°C. El sobrenadante se separó en un tubo nuevo y se adicionó 300 μ l de cloroformo-alcohol isoamílico, mezclando por inmersión e incubando la mezcla por 5 min. en hielo. Posteriormente se centrifugo a 12000 rpm por 12 min. a temperatura de 3°C y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, al que se le adicionó 600 μ l de 2-propanol y se incubo a -20°C por una noche. Al finalizar la incubación, se centrifugo nuevamente a 12000 rpm por 12 min. a temperatura de 3°C y se descartó el sobrenadante. Se agregó 600 μ de alcohol absoluto y se centrifugo nuevamente. Al finalizar la centrifugación se descartó el sobrenadante y se agregó alcohol al 70%, para ser centrifugado nuevamente. Al finalizar los lavados con etanol se adicionó 40 μ l de agua ultrapura libre de RNasa y DNAsas.

El ARN se utilizó para obtener cDNA mediante un ensayo de RT. Primero se sometió una muestra de 10 μ g de ARN a un tratamiento con Turbo-DNasa (Ambion®) para eliminar rastros de ADN. A la muestra de ARN se le agrego búfer 1x para TurboDNasa Ambion® y 5U de enzima Turbo DNasa Ambion®. Se incubó a 37°C por 25 minutos y posteriormente se inactivo la DNasa adicionando EDTA 2.5mM volumen final a la muestra e incubando

por 10 minutos a 65°C con inversiones cada 3 minutos. Para eliminar los restos de EDTA y búfer 1x de TurboDnasa, se realizaron lavados agregando 2 volúmenes de isopropanol para precipitar durante 3 horas y dos lavados con etanol al 70%.

Una vez libre de ADN, la muestra de ARN se mezcló con 10pM de oligodttt y se completó el volumen a 10 µl, se incubó a 65°C por 2 min. y se enfrió en hielo 1 min. para centrifugar y agregar la mezcla de reacción para RT en un volumen final de 20 µl, compuesta por búfer 1x para enzima MMLV HTRT, 5 mM dithiothreitol (DTT), RNasaOut 5U, dNTP 2mM c/u y Enzima MMLV HP RT 5U.

V.XI Amplificación de uidA, aphA3'II y act-cr

Se utilizó cDNA para la amplificación de uidA, aph3'II y act-cr. Los Oligos de los genes uidA y aphA3'II utilizados se obtuvieron a partir de las secuencias reportadas para dichos genes y el T-DNA del plásmido pBI121 en la base de datos BLAST de NCBI (Tabla 3). De la misma forma se obtuvieron oligos del gen de la actina act-cr de "*Chrysanthemum morifolium*" para usarse como control positivo durante la evaluación de la transformación en crisantemo. Como control positivo para la PCR se utilizó ADN plasmídico para uidA y aph3'II y ADN genómico para act-cr

Para los genes uidA y aph3'II se alineo la secuencia de estos con la secuencia del vector (Tabla 3) y determinar un tamaño de fragmento para la amplificación entre 400 y 700 pares de bases.

Tabla 3.- Accesiones de la base de datos de NCBI utilizadas para el diseño de oligos usados en la PCR

Accesión	Vector	Gen
A03908.1	pBI121-GUS	GUS
S81599	aphA-5c=aminoglycoside-O-phosphoryl-transferase Type Vc	NPTII
AY781296.1	pBI121_pro T-DNA región	T-DNA
AF485783.1	pBI121-completo	Vector completa
AB205087.1	Actina de <i>D. morifolium</i>	mRNA parcial

A partir de la alineación entre las secuencias de las accesiones A03908.1 y AY781296.1 se generaron los oligos para uidA: FIGUS: CTGTAGAAACCCCAACCCGTG y R1GUS: AAAGTCCCGCTAGTGCCTTGTCCAGTTGC (Teixeira y Fukai 2003, Le *et al.*, 2001) con los que se obtuvo un fragmento de 690 pb. La alineación entre las accesiones S81599 y AY781296.1 hizo posible diseñar los oligos FNPTII: GAGAGGCTATTCGGCTATGA y RNPTII: GATGCTCTTCGTCCAGATCA para obtener un fragmento de 490. Finalmente se diseñaron los oligos para actina FACT1: TGGAGAAAATCTGGCATCACAC y RACT1: GGAACCTAGTTGTACCACCAC, derivado del análisis de la secuencia reportada en la accesión AB205087.1 para obtener un producto de 670 pb.

Las condiciones del PCR se establecieron con una mezcla de reacción de 25 µl, compuesta por Buffer 1x, dNTP 2.5 µM c/u, MgCl2 10 µM, Polimerasa Taq Platinum 5U, Oligo Forward 10 µM, Oligo Reverse 10 µM y DMSO 10 µM.

Se evaluaron ocho condiciones térmicas para obtener la amplificación de *uidA* con un fragmento esperado de 690 pb, ocho condiciones térmicas para la amplificación de *aph3'II* con un fragmento esperado de 490 pb y un programa térmico para la amplificación de *act-cr* con un fragmento esperado de 670 pb. Todas las condiciones térmicas comenzaron por una primera etapa de un ciclo para desnaturalización del ADN durante 3 minutos a 95°C, seguido de una segunda etapa de 40 ciclos para *uidA* y *aph3'II* y 25 ciclos para *act-cr*, donde se determinó la mejor condición de amplificación del producto deseado.

En el caso de *uidA*. La segunda etapa comenzó con la desnaturalización del ADN a 94°C durante 1 minuto, posteriormente pasó a fase de alineamiento con los oligos durante 2 minutos, donde se evaluaron las temperaturas de 65°C, 62°C, 59°C, 56°C, 53°C, 50°C y 47°C y finalmente el ciclo termina con la elongación de la cadena a 72°C durante 2 minutos. La última condición térmica para la amplificación consistió en una técnica de touch-down, en la que se comenzó un ciclo a 94°C durante un minuto para la desnaturalización, seguido de 65°C durante dos minutos para el alineamiento de los oligos y finalmente dos minutos a 72°C durante la elongación, los ciclos posteriores descendieron 1°C durante el alineamiento de los oligos, hasta los 58°C, posteriormente paso a etapa de amplificación del producto alineados durante el touch dow, donde se realizaron 35 ciclos que comenzaron a 94°C durante la desnaturalización por un minuto, seguidos de la etapa de alineamiento a 58°C durante 2 minutos y finalmente pasaron a 72°C durante la elongación por 2 minutos.

Para la amplificación de *aph3'II*. La segunda etapa comenzó con la desnaturalización del ADN a 94°C durante 1 minuto, posteriormente pasó a fase de alineamiento con los oligos durante 2 minutos, donde se evaluaron las temperaturas de 58°C, 56°C, 54°C, 52°C, 51°C, 50°C y 48°C y finalmente el ciclo terminó con la elongación de la cadena a 72°C durante 2 minutos. La última condición térmica para la amplificación consistió en una técnica de touch-down, en la que se comenzó un ciclo a 94°C durante un minuto para la desnaturalización, seguido de 58°C durante dos minutos para el alineamiento de los oligos y finalmente dos minutos a 72°C durante la elongación, los ciclos posteriores descendieron 1°C durante el alineamiento de los oligos, hasta los 50°C, posteriormente paso a etapa de amplificación del producto alineados durante el touch dow, donde se realizaron 35 ciclos que comenzaron a 94°C durante la desnaturalización por un minuto, seguidos de la etapa de alineamiento a 54°C durante 2 minutos y finalmente pasaron a 72°C durante la elongación por 2 minutos.

Para la amplificación de *act-cr*, se comenzó la primera etapa de un ciclo de desnaturalización del ADN a 95°C durante 3 minutos, posteriormente la segunda etapa conformada por 25 ciclos, comenzó con la desnaturalización del ADN a 94°C durante un minuto, seguido de una fase de alineamiento a 60°C durante dos minutos y finalmente la elongación a 72°C durante 2 minutos.

Para la terminación de la reacción de PCR, todas las condiciones térmicas evaluadas en *uidA*, *aph3'II* y *act-cr*, tuvieron una tercer etapa de elongación a 72°C durante 10 minutos.

V.XII Análisis estadístico de la transformación de los callos de crisantemo

El diseño factorial 2^3 para la transformación de crisantemo fue analizado con la finalidad de determinar el factor o factores más influyente sobre la transformación, así como la mejor interacción entre los factores evaluados que puede favorecer la transformación. Por lo que se realizó un análisis de Pareto con un máximo de 3 interacciones, que muestra la significancia de cada factor, así como la significancia de la combinación de estos por pares y en tercias, en sus niveles altos y bajos.

También se realizó el análisis de efectos principales para visualizar la influencia de cada factor de manera individual y un análisis de interacción entre los factores AB, AC y BC para determinar cómo los factores individuales en sus diferentes niveles, afectan a los otros factores.

El diseño experimental 2^3 fue sometido a un análisis de varianza multifactorial con ayuda del software estadístico STATGRAPHICS CENTURION XVI.0 el cual considera un porcentaje de significancia del 95% a un valor de “ p ” menor a 0.05

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VII Obtención de *A. tumefaciens*.

La transformación de *A. tumefaciens* cepa LBA4404, con el plásmido pBI121 fue realizado por electroporación y fue efectivo bajo las condiciones de 2.0kV e incubando en medio SOC por 3 horas después de la electroporación, plaquenado una muestra en medio solido LB adicionado con estreptomycin 100 µg/ml y Kanamicina 50 µg/ml. Las colonias transformadas crecieron después de 24hrs de cultivo a 30°C (Figura 6A), a diferencia del control no transformado (Figura 6B).

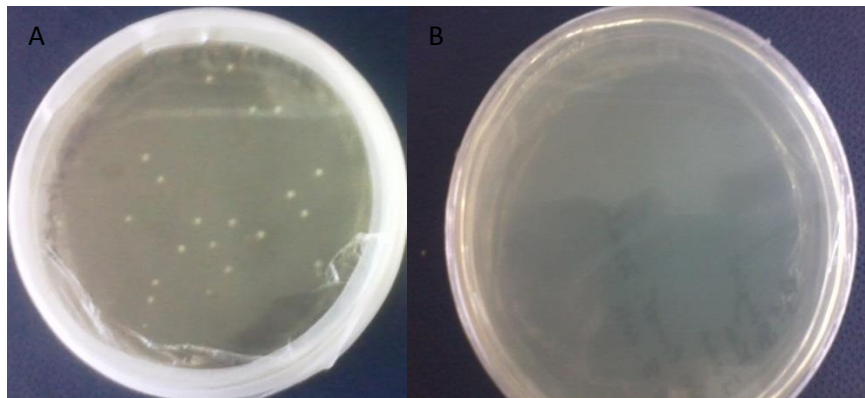


Figura 6. Crecimiento de *A. tumefaciens* tras inocular 20µl de bacterias en medio solido LB solido adicionado con 100 µg/ml de Estreptomycin y 50 µg/ml de Kanamicina, durante 24 hrs a 30°C. A) Cepa transformada con pBI121. B) Cepa testigo.

Para corroborar la transformación de las colonias de *A. tumefaciens* que crecieron en medio de selección y por los mismo, portadoras de pBI121, se realizó una extracción de ADN plasmídico utilizando el protocolo de extracción descrito en materiales y métodos, a partir de un cultivo bacteriano en medio LB líquido y posteriormente se realizaron dos ensayos de digestión con enzimas de restricción, uno con PstI y otro con HindIII en combinación con EcoRI. El resultado (Figura 7) fue consistente con los reportes de Chen y colaboradores (2003) quienes reportaron tres tamaños de fragmento obtenidos con pstI iguales a los obtenidos y 2 tamaños de fragmento con EcoRI en conjunto con HindIII, iguales a los obtenidos (Figura 7).

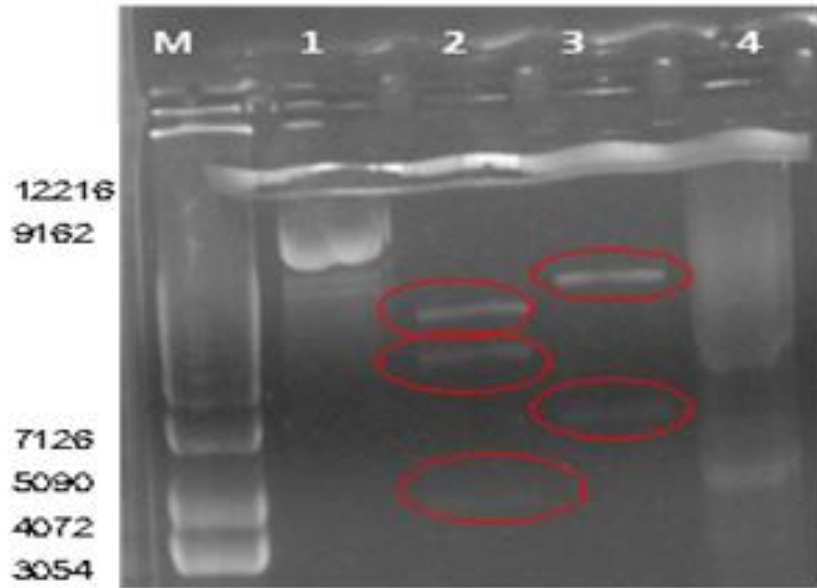


Figura 7. Digestión de pBI121 con diferentes enzimas de restricción. En círculos, la ubicación de los fragmentos obtenidos. M) Marcador de peso molecular 1000kb ladder, 1) Plásmido pBI121 purificado de *A. tumefaciens* transformada, 2) Digestión con PstI, 3), Digestión con EcoRI en conjunto con HindIII, 4) plásmido pAL4404 purificado de *A. tumefaciens* no transformada.

VI.II Determinación de la concentración de antibiótico para la inhibición de *A. tumefaciens* transformada con pBI121.

Los resultados de este trabajo muestran que el Timentín fue capaz de inhibir el crecimiento de *A. tumefaciens* en comparación con el antibiótico carbenicilina (Figura 8), en el cual, a la misma concentración, el número de colonias bacterianas contabilizadas que creció en el medio fue similar a los medios con antibióticos de selección (estreptomomicina y kanamicina), utilizados como testigo negativo en este ensayo (Tabla 4).

Por otro lado se observó que la concentración de 250 $\mu\text{g/ml}$ de Timentín resulto ser la concentración en la cual se inhibió por completo el crecimiento bacteriano (Tabla 4 y Figura 8), en comparación con las concentraciones menores del mismo antibiótico, en las cuales se inhibió el crecimiento bacteriano, pero no completamente.

Tabla 4. Crecimiento de *Agrobacterium* bajo diferentes concentraciones de antibióticos

Antibiótico	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Crecimiento	No. De colonias
Carbenicilina	50	Si	Mas de 100
Carbenicilina	100	Si	Mas de 100
Carbenicilina	250	Si	Mas de 100
Timentín	50	Si	26
Timentín	100	Si	12
Timentín	250	No	0

* Como control se utilizó medio solido de selección para *A. tumefaciens*

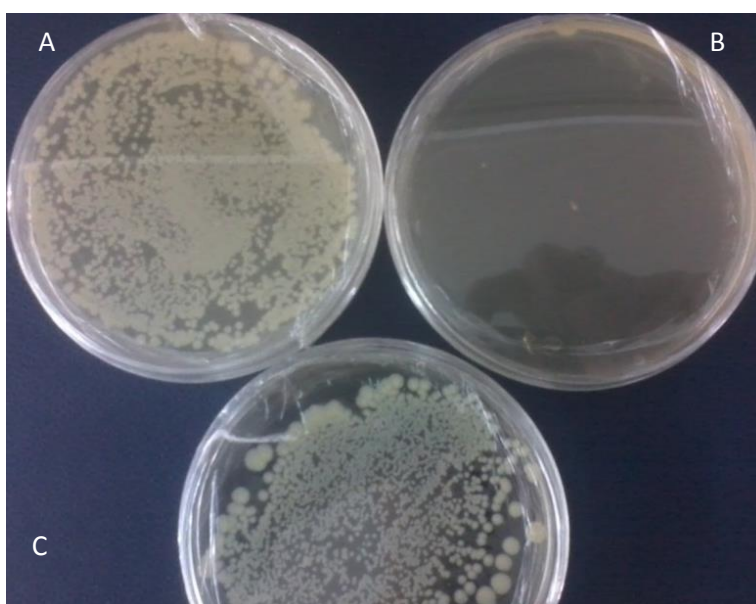


Figura 8. Evaluación del efecto de antibióticos sobre el crecimiento de *A. tumefaciens*. Crecimiento de *Agrobacterium* en medio LB solido adicionado con A) 100 $\mu\text{g/ml}$ de Estreptomomicina y 50 $\mu\text{g/ml}$ de Kanamicina, B) 250 $\mu\text{g/ml}$ de Timentín, C) 250 $\mu\text{g/ml}$ de carbenicilina.

VI.III Obtención del callo de *D. grandiflorum*, Var. Micromargara.

Los segmentos de brote cultivados en medio TC4 (MS 4.4 gr/l, Sacarosa 3%, Benzyl aminopurina 4.4 mM, Ac. Naftalenacético 0.89%, pH 5.8), desarrollaron de 1 a 4 brotes (Figura 9 B), cada uno de los cuales se separó y cultivo en medio independiente hasta alcanzar una altura de 7 cm (Figura 9 A).

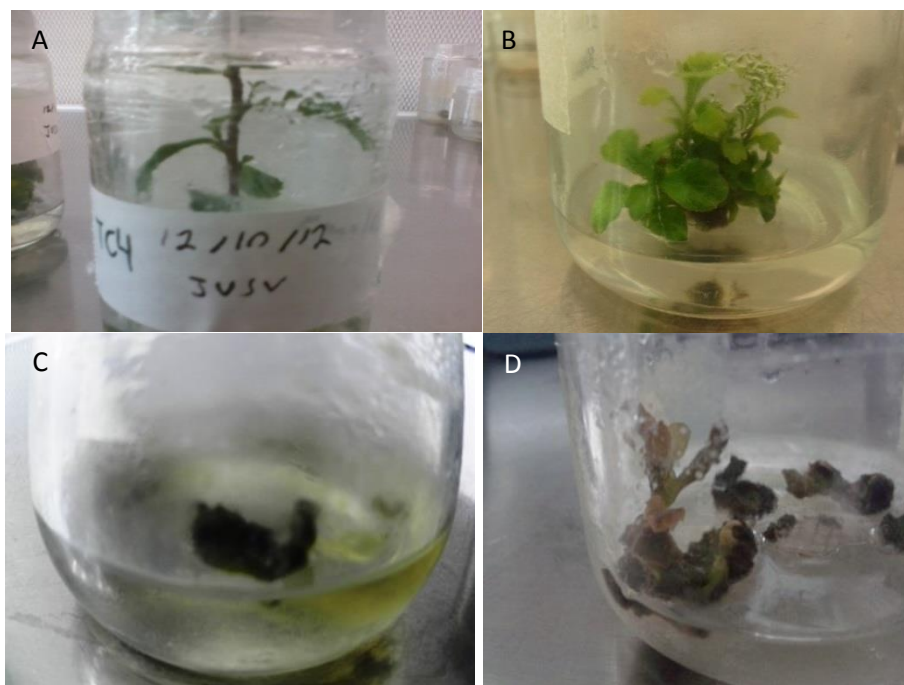


Figura 9. Cultivo *in vitro* de *D. grandiflorum*. Var Micromargara. A) Brote de *D. grandiflorum* Var. Micromargara, propagado *in vitro* en medio de cultivo TC4. B) Brotes en segmentos de tallo, propagados en medio CT4, C) Callo fenolizado en medio CC3, D) Obtención de brotes a partir de callo.

Cuando las plantas tuvieron una altura de 7 cms, se cosecharon las hojas más cercanas al meristemo apical de cada brote para la inducción de callo. De todos los callos inducidos durante este trabajo, únicamente un callo regeneró sin haber recibido un tratamiento especial (Figura 9 D), produciendo un único brote en medio CC.

Luego de establecer el cultivo de callos, se comenzó a tener problemas de fenolización en estos en el medio CC3 (Figura 9 C). La fenolización puede tener varios puntos de origen, el medio de cultivo y el manejo del explante, pueden desatar la respuesta de fenolización antes de la transformación durante el cultivo *in vitro*, durante la interacción con *A. tumefaciens*, o durante la desinfección, ya que la fenolización es una respuesta primordialmente defensiva en la que grupos de compuestos fenolicos son liberados para iniciar procesos de lignificación en la pared celular y evitar la entrada de patógenos, sustancias toxicas o sellar roturas en la pared y membrana celular (Magdum, 2013; Sharma *et al.*, 2012; Azofeifa, 2009) Sin embargo la acumulación de algunos de estos compuestos también pueden ser fitotoxicos (Magdum, 2013).

Esto trae como consecuencia un estrés fitotóxico constante para el explante, que lo hace inviable. Para solucionarlo, se evaluó el efecto de la adición de polivinil polipirrolidona (PVPP) al medio de cultivo sobre el porcentaje de callos fenolizados. Para ello el medio de cultivo CC3 fue suplementado con 0.1% de PVPP (Medio CC) y se cuantificó el número de callos que presentaron oscurecimiento después de 15 días.

Tabla 5. Análisis de rangos múltiples para la comparación de los medios CC3 y CC en la que se muestra el comportamiento de los callos con respuesta a la fenolización.

	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
% Verdes CC3	15	62.5947	X
% Verdes CC	15	83.6873	X

<i>Contrast</i>	<i>Sig</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
% Verdes CC3 - % Verdes CC	*	21.0927	20.2383

* Denota una diferencia estadísticamente significativa

Tabla 6. Análisis de varianza entre los tratamientos

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Between groups	3336.75	1	3336.75	4.56	0.0417
Within groups	20499.0	28	732.108		
Total (Corr.)	23835.8	29			

* Un valor de $p \leq 0.05$ indica una diferencia estadísticamente significativa

El análisis de rangos múltiples (Tabla 5), nos muestra que los tratamientos se comportan como grupos diferentes. El análisis de varianza (Tabla 6) nos muestra la diferencia significativa entre los dos medios empleados, por lo que se descartó el medio CC3 como medio de mantenimiento y propagación de callo, para ser sustituido por el medio CC el cual tiene un mejor desempeño al tener un menor índice de fenolización en los callos de crisantemo.

El mejor desempeño del medio CC se debe a que el PVPP actúa como un secuestrador de los compuestos fenólicos, tanto oxidados como no oxidados, en el medio, reduciendo el estrés fitotóxico al que está sujeto el callo, por el contrario el PVPP también puede secuestrar los reguladores de crecimiento del medio, haciéndolos inaccesibles para el desarrollo del callo, el efecto de la concentración de PVPP en el medio para reducir la fenolización dependerá de la especie y tamaño del explante, tal como lo reporta Azofeifa (2009). El porcentaje utilizado para la modificación del medio es comparable con tratamientos empleados en uva por Perl y colaboradores (1996), donde el PVPP ayudó a incrementar el porcentaje de embriones somáticos, producto de una reducción en la tasa de fenolización, sin embargo mencionan que por sí solo el PVPP no inhibe por completo la fenolización, esto mismo se observó en callos de crisantemo, donde después de 15 días el PVPP se oscurecía posiblemente debido a la saturación de fenoles en el medio, para posteriormente oscurecerse el callo mismo.

El resultado nos indica que fue necesario el subcultivo del callo a medio fresco cada 15 días para reducir la fenolización. Perl y colaboradores (1996) y Abdelwahd y colaboradores (2008), recomiendan usar el PVPP o polivinilpirrolidona (PVP) a una concentración de 0.1% en conjunción con otro agente antioxidante para incrementar los efectos benéficos,

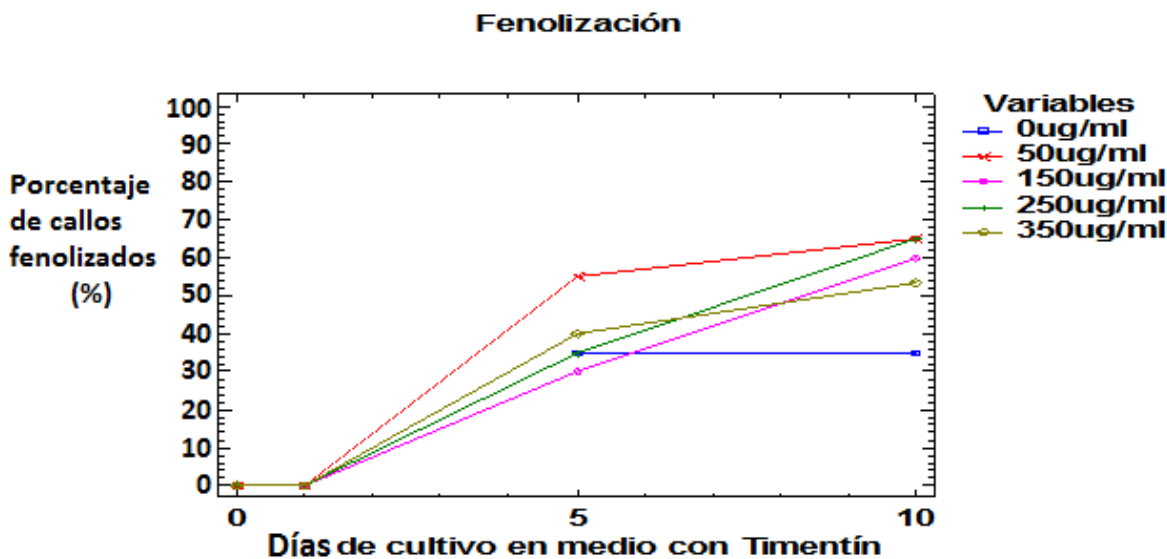
VI.IV Efecto del antibiótico de desinfección sobre la fenolización del callo.

Para poder desinfectar los callos después de la interacción con *A. tumefaciens*, fue necesario verificar que los antibióticos tienen nulos o bajos efectos negativos sobre el explante, ya que se han reportado antibióticos que pueden reducir la capacidad de regeneración (Teixeira *et al.*, 2003), embriogénesis o iniciar la respuesta de fenolización, al mismo tiempo es necesario verificar la sensibilidad de los callos a la kanamicina, antibiótico usado como agente de selección para los explantes transformados.

La evaluación de diferentes concentraciones (0µg/ml, 50µg/ml, 150µg/ml, 250µg/ml y 350µg/ml) de Timentín (Ticarcilín más clavulanato de potasio con una relación 10:1), para determinar que concentración máxima de antibiótico puede ser utilizada con los menores efectos dió como resultado valores muy cercanos entre sí (Gráficas 1), mostrando un efecto sobre la viabilidad del callo que no fue estadísticamente significativa.

El análisis estadístico de las diferentes concentraciones de Timentín utilizadas para evaluar el efecto del antibiótico sobre la fenolización, nos muestra como no existe una diferencia estadísticamente significativa entre los diferentes tratamientos (Tabla 7), con respecto a los callos que crecieron en medio sin antibiótico y entre los tratamientos (Gráfica 2).

En crisantemo típicamente, se han utilizado los antibióticos: ampicilina, bialafos, cloranfenicol, minomicina, penicilina, rifampicina, streptomina (Teixeira y colaboradores, 2003), carbenicilina, cefotaxina y vancomicina (Teixeira y Fukai, 2001; Zheng *et al.*, 2001), como agentes desinfectantes de *A. tumefaciens*, sin embargo estos antibióticos tienen efectos negativos sobre la viabilidad del explante desinfectado y su capacidad de regeneración. La carbenicilina necesita dosis muy elevadas de antibiótico para poder contener el crecimiento de *Agrobacterium*, lo que puede tener un efecto colateral en el desarrollo del explante, ya que este antibiótico al degradarse actúa como auxina, alterando el desarrollo normal del explante después de la desinfección. La vancomicina y tetraciclina pueden contener el crecimiento de *Agrobacterium*, pero se ha reportado que tiene efectos negativos en la capacidad de regeneración de los explantes, disminuyendo drásticamente esta capacidad a concentraciones por arriba de 150 µg/ml El timentín se ha utilizado con éxito en otras especies durante la desinfección de *Agrobacterium* (Costa y colaboradores, 2000, Cheng y colaboradores, 2008), como jitomate y trigo, a diferencia de otros antibióticos como carbenicilina, vancomicina y tetraciclina, no se han reportado efectos negativos sobre el explante en cuanto a su capacidad de regeneración, al mismo tiempo que el tiempo de degradación del antibiótico es mayor, por lo que puede contener el crecimiento de *Agrobacterium* por más tiempo, antes de hacer un subcultivo del explante transformado.



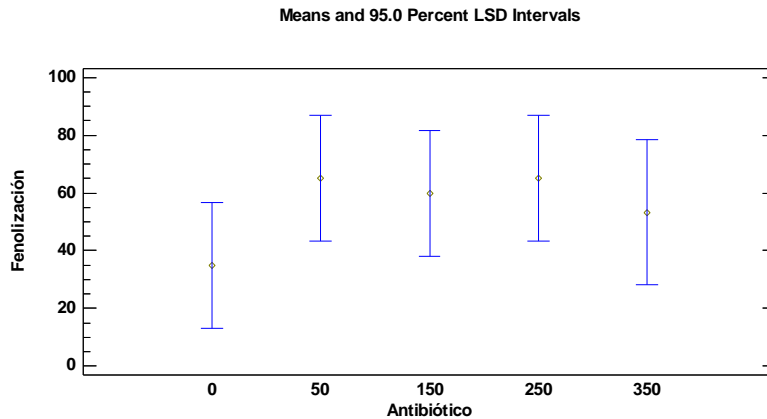
Grafica 1. Incremento en el porcentaje de callos fenolizados, del día 0 al día 10 de cultivo en medio CC, con diferentes concentraciones de Timentín. Los callos se cambiaron a medio fresco con la misma concentración de Timentín al día 6.

Tabla 7. Análisis de varianza y comparativo entre los diferentes tratamientos para evaluar la respuesta a la sensibilidad del callo frente al antibiótico Timentín.

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
MAIN EFFECTS					
A:Antibiótico	2496.49	4	624.123	0.76	0.5710
RESIDUAL	11566.7	14	826.19		
TOTAL (CORRECTED)	14063.2	18			

*Un valor de $p \leq 0.05$ indica un efecto estadísticamente significativo

Aunque no existe una diferencia estadísticamente significativa con respecto a la concentración de 0 µg/ml, el Timentín puede tener un efecto fitotóxico en el medio de cultivo, induciendo necrosis. Magdum (2013), observó el oscurecimiento de callos tras realizar lavados con Timentín a una concentración de 300 µg/ml, y reduciendo al mínimo la tasa de crecimiento del callo al tercer lavado. Es posible que el uso de PVPP en el medio retrase este efecto fitotóxico, por lo que no se observó una diferencia estadísticamente significativa (Grafica 2).



Gráfica 2. Gráfica de medias que muestra la fenolización de los callos en medio CC adicionado con diferentes concentraciones de antibiótico Timentín. En el eje de las x la concentración de Timentín en µg/ml, en el eje de las y, el porcentaje de fenolización de los callos por tratamiento.

VI.V Establecimiento del diseño experimental.

Se evaluaron 192 callos en un diseño experimental 2^3 , durante la transformación mediante *A. tumefaciens*, esto nos permitió conocer el efecto principal de cada uno de los factores por separado, así como su interacción. Los callos contaban con un peso promedio de 0.8 gr y completamente verdes sin rastros de fenolización (Figura 10B) al ser transformados, fueron repartidos en ocho tratamientos con tres repeticiones cada uno (Tabla 8), a los que se les realizó el análisis histoquímico de GUS (Figura 11) una vez concluida la transformación y desinfección. Durante el proceso de transformación y tinción los callos manifestaron oscurecimiento (Figura 10c, 10d y figura 11) por lo que se recurrió a ensayos de RT-PCR para la detección de *uidA* y *aph3'II* en los callos teñidos.

V.VI Detección de la transformación genética mediante la actividad de GUS

Magdum (2013), estudia el efecto de *A. tumefaciens* y la fitotoxicidad de antibióticos, sobre las respuestas de oscurecimiento, necrosis y el crecimiento del explante transformado en plantas de *Pennisetum glaucum* (mijo), teniendo como resultado un oscurecimiento tenue de los callos tras dos días de cocultivo y necrosis en la mayoría de los explantes (sobrevivencia de solo el 5% de los callos) después de la desinfección, debido a la secreción de ROS y compuestos fenólicos.

En este trabajo con crisantemo el oscurecimiento del callo fue independiente del tiempo de cocultivo, comenzando con un oscurecimiento tenue (Figura 10C) desde el primer día en algunos casos y hasta el tercer día en otros, pero sin presentar necrosis, pasando a un oscurecimiento más acentuado al término de la desinfección (Figura 10D), únicamente el 30% de los callos distribuidos en todos los tratamientos de manera heterogénea no presentaron oscurecimiento durante el proceso de transformación y al término de la desinfección, sin embargo oscurecieron durante el ensayo histoquímico para la detección de GUS (Figura 11).

La fenolización de los callos durante el tratamiento histoquímico puede deberse a la composición misma de la solución de tinción, al contener agentes oxidantes (Ferrocianida

de potasio y ferricyanida de potasio) que facilitan la oxidación del producto indolyl a un grupo indoxil, que posteriormente dimeriza formando un derivado insoluble de color azul, facilitando su visualización (Figura 11B). Estos agentes oxidantes generan un estrés oxidativo abiótico en el medio al callo, el cual responde liberando fenoles, taninos y quinonas para capturar los radicales libres, provocando una apariencia oscura (Azofeifa 2009, Sharma *et al.*, 2012) y dificultando la visualización de la coloración azul.

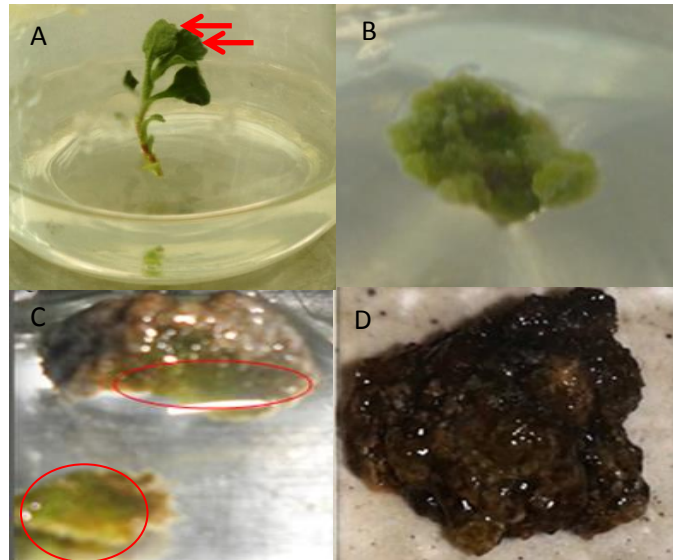


Figura 10. Seguimiento de la transformación de callos de crisantemo Var. Micromargara durante la transformación y análisis histoquímico. A) Planta de *D. grandiflorum* Var. Micromargara, las flechas indican las hojas usadas para inducir formación de callo. B) callo obtenido a partir de explantes de hoja al momento de la infección con *A. tumefaciens*. C) Callo comenzando con el oscurecimiento después de 3 días de cocultivo con *A. tumefaciens*. Los círculos muestran la apariencia interna del callo, con coloración verde. D) callo transformado, totalmente fenolizado tras la desinfección de *A. tumefaciens* con 250 $\mu\text{g/ml}$ de Timentín.

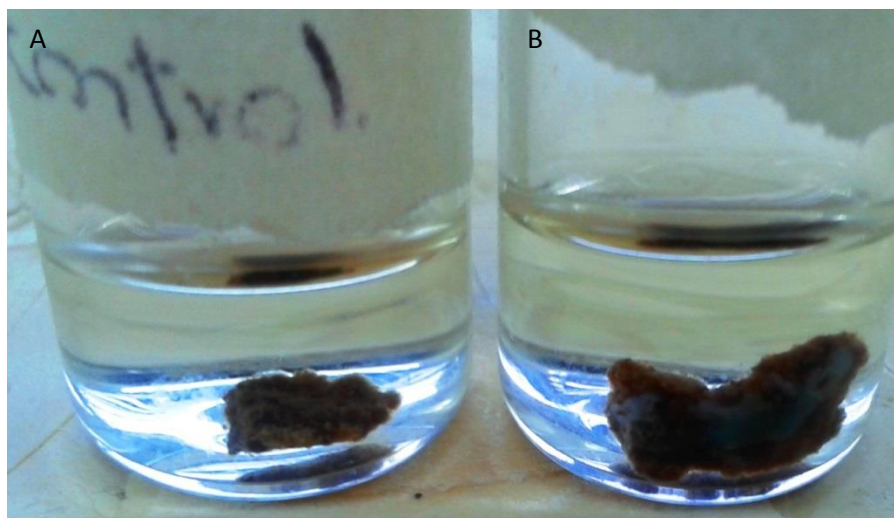


Figura 11. Evaluación de la transformación de los callos de crisantemo por ensayo histoquímico para la detección de GUS. A) Callo de crisantemo var. Micromargara sin transformar, sometido a ensayo histoquímico y conservado en etanol al 70%, ninguna coloración azul es visible. B) Callo de crisantemo var. Micromargara transformado bajo las condiciones del tratamiento 5 y conservado en etanol al 70%, la zona transformada del callo se aprecia de color azul en una línea horizontal por la mitad del callo.

V.VII Confirmación de la transformación por RT-PCR

Hussein y colaboradores, (2013), obtuvieron callos claros y oscuros tras la transformación de *Gerbera jamesonii*, con *A. tumefaciens*, siendo capaces de detectar la actividad de GUS 3 días después de la infección por *A. tumefaciens* hasta 10 días después, periodo tras el cual comenzó a disminuir la actividad de GUS y haciendo más difícil su detección. Siendo que en el presente trabajo se realizó una desinfección de *A. tumefaciens* de 10 días, es posible que un efecto similar haya ocurrido dificultando aún más la detección visual de GUS por ensayo histoquímico. La dificultad para observar la tinción en los callos tras el periodo de desinfección, nos condujo a una evaluación por el método de RT-PCR para poder amplificar fragmentos de *uidA* y *aph3'II* de los callos transformados (Figuras 12, 13 y 14).

Los oligos diseñados para detectar la expresión de los transgenes mediante la amplificación de *uidA* (Figura 12) y *aph3'II* (Figura 13) amplificaron los fragmentos esperados de 690 pb y 490 pb respectivamente, estos fragmentos fueron secuenciados por la empresa Macrogen inc. En la que se obtuvo mediante un alineamiento con la secuencia completa de los genes, una similitud del 99%, en tanto que los oligos diseñados para detectar la expresión por amplificación de *act-cr*, dieron como resultado un fragmento de 670 pb con una similitud del 81%

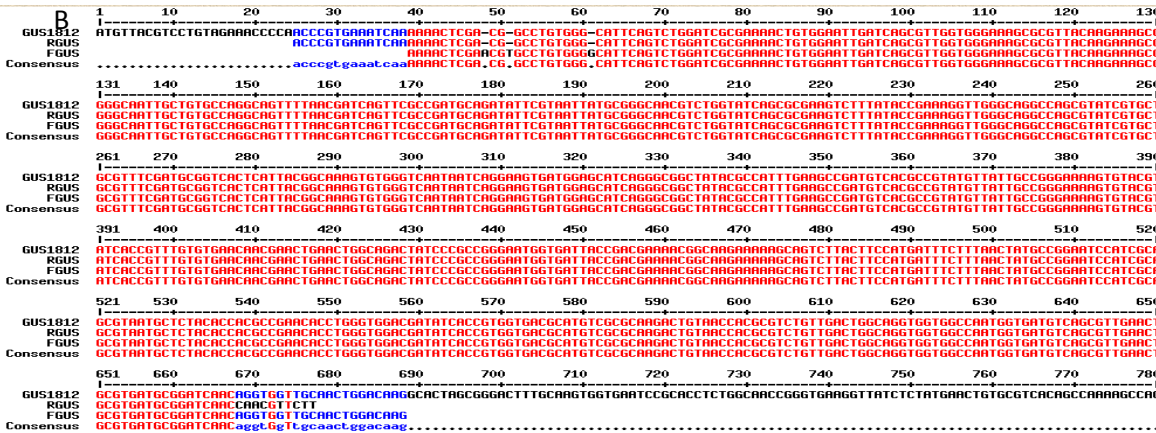
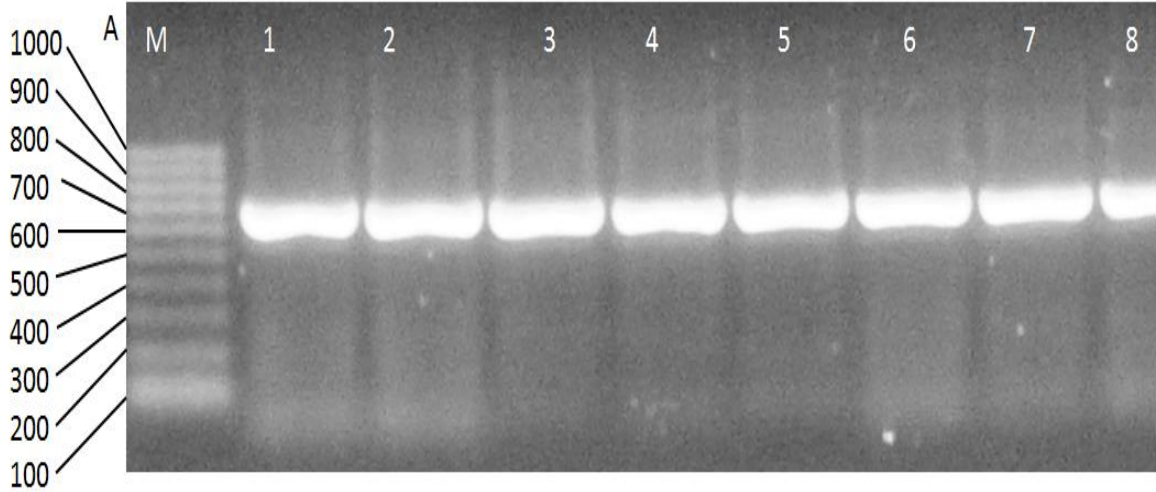


Figura 12. Comprobación de la transformación. A) Amplificación de fragmentos de GUS en todos los tratamientos con al menos un callo transformado. M) Marcador molecular 100 bp low ladder de Sigma Aldrich, 1) Control positivo, amplificación a partir de ADN plasmídico, 2) tratamiento 1, 3) tratamiento 2, 4) tratamiento 3, 5) Tratamiento 4, 6) tratamiento 5, 7) tratamiento 6, 8) tratamiento 7, 8) tratamiento 7. B) Secuenciación de un fragmento amplificado del tratamiento 5 y su alineación; Alineación de la región amplificada de *uidA* con la secuencia del gen. En azul los oligos Forward al inicio y Reverse al final. En rojo la similitud entre la secuencia amplificada y la secuencia del gen. Similitud del 99%.

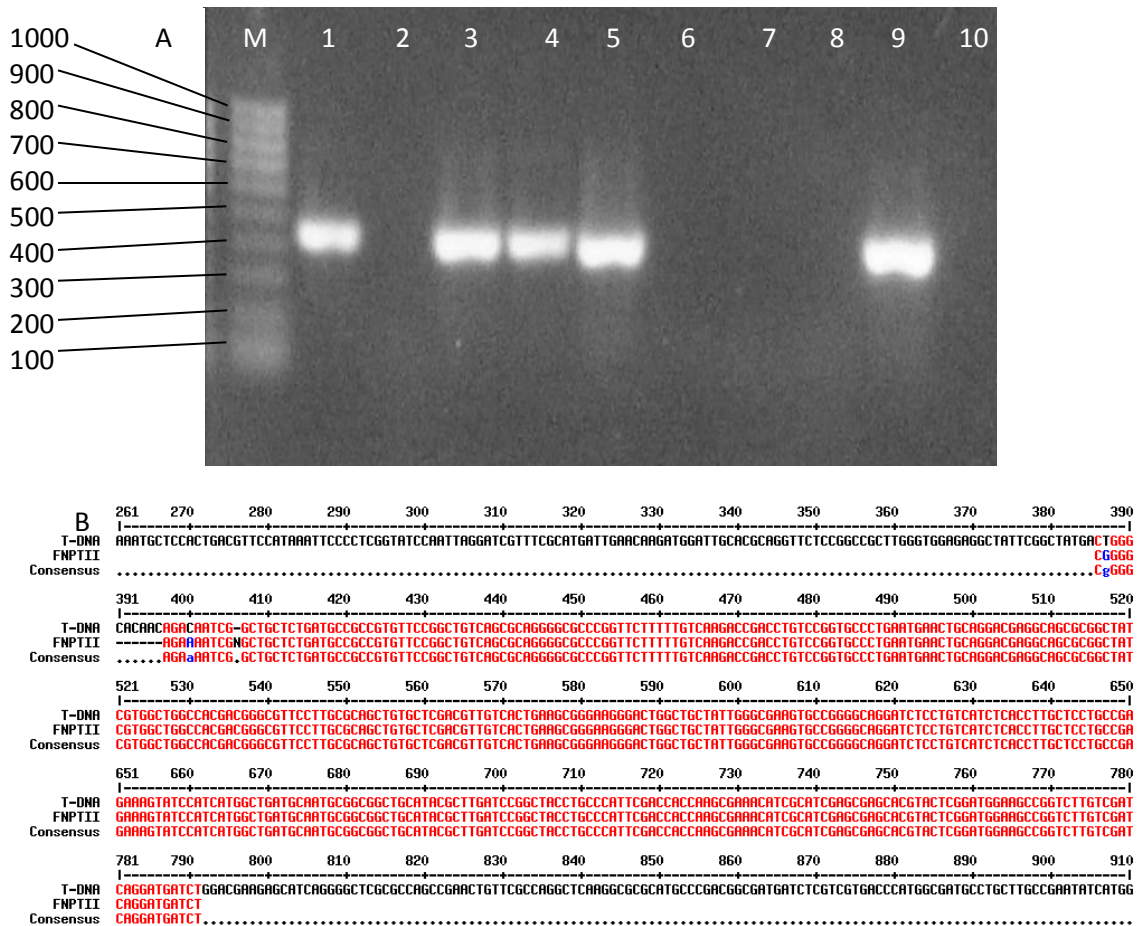


Figura 13. Comprobación de la transformación por amplificación de fragmentos de NPTII en los callos transformados del tratamiento 5, bloque 3. A) M) Marcador molecular 100 bp low ladder de Sigma Aldrich, 1) Control positivo, 2) Control negativo, 3) callo 1, 4) callo 2, 5) callo 3, 6) callo 4, 7) callo 5, 8) callo 6, 9) callo 7, 10) callo 8. Todos los callos fueron amplificados con *act-cr* B) Alineación de la secuencia de NPTII con la secuencia del T-DNA del vector obtenida del fragmento amplificado del callo 4. En rojo la similitud entre la secuencia amplificada y la secuencia del T-DNA. Similitud del 99%.

El tratamiento con mayor porcentaje de callos positivos a la transformación fue el número 5 (Tabla 8). El gráfico de Pareto (Grafica 3), muestra que el factor concentración de *Agrobacterium* tiene un efecto significativo sobre la transformación, cuando está en su nivel más alto, mientras que los demás factores (Concentración de acetosiringona y días de cocultivo no llegan a tener un efecto significativo sobre la transformación.

El análisis de varianza del conjunto de experimentos (Tabla 9) nos confirma el efecto de la concentración de *Agrobacterium*, pero también nos muestra un efecto de los bloques sobre la transformación.

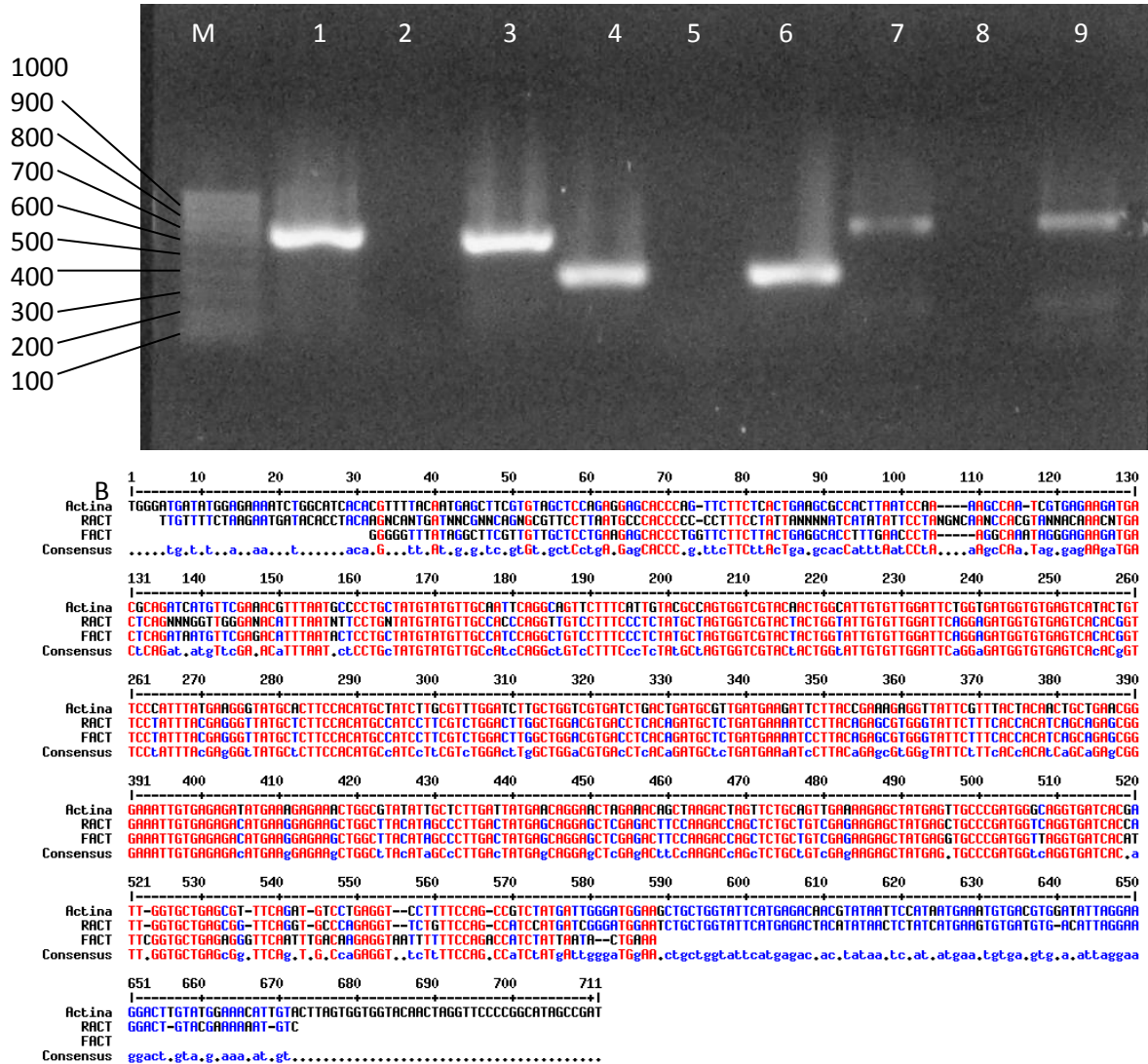


Figura 14. Amplificación de GUS, NPTII y Actina a partir de cDNA de un callo del tratamiento 5. A) M) Marcador molecular, 1) control positivo de GUS a partir de ADN plasmídico, 2) Control negativo de GUS, 3) Fragmento amplificado de GUS a partir de cDNA, 4) Control positivo de NPTII a partir de ADN plasmídico, 5) Control negativo de NPTII, 6) Fragmento amplificado de NPTII a partir de cDNA, 7) Control positivo de Actina, amplificado a partir de ADN genómico, 8) Control negativo de Actina, 9) Fragmento amplificado de Actina a partir de cDNA. B) Alineación de la región amplificada del gen Act-cr con el mismo gen. En rojo la similitud entre la secuencia amplificada y la secuencia del gen. La secuencia amplificada tiene 81% de similitud.

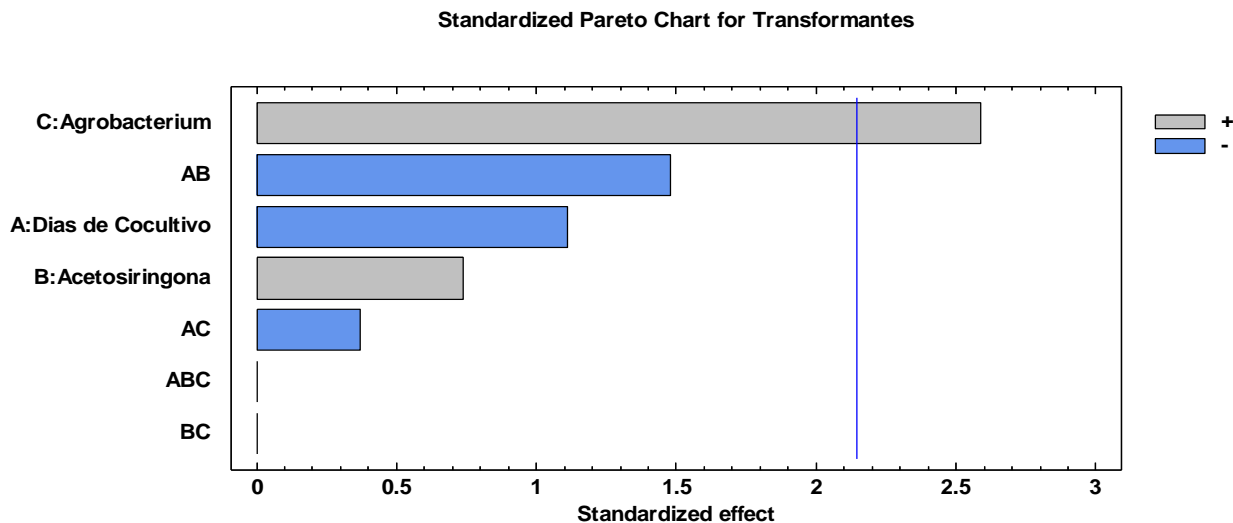
V.VIII Resolución del diseño experimental para la evaluación de los factores concentración de *A. tumefaciens*, periodo de cocultivo y concentración de acetosiringona

Durante la realización de los tratamientos se consideró como parámetro estándar el peso de los callos y su aspecto (Figura 10b). Sin embargo no se previó el número de divisiones del callo y subcultivos. El efecto de los bloques se debe posiblemente a que después de realizar numerosas divisiones de callos para realizar los tratamientos del bloque tres, estos dejaron de crecer y por tanto fueron descartados para la transformación. Para suplir los callos perdidos, se generaron nuevos callos a partir de hoja, de la misma forma, con el mismo tiempo de cultivo en el medio CC y de la misma planta que los callos anteriores. Sin embargo al tener un menor número de divisiones, es posible que la tolerancia al estrés provocado por *A. tumefaciens* y el medio de desinfección, sea más amplia y permita que un mayor número de células permanezcan viables sin iniciar la respuesta de fenolización al término del proceso de transformación.

En otros reportes con arroz se ha evaluado el efecto de la edad del callo sobre la eficiencia de transformación (Tripathi *et al.*, 2010), mostrando un efecto de competencia por parte de las células del callo para ser transformadas en una edad específica, antes y después de la cual, la eficiencia disminuye de manera drástica. Tripathi y colaboradores (2010), concluyen que en un periodo intermedio de edad del callo de 35 días de cultivo se obtienen los mejores resultados de transformación.

Tabla 8. Número de callos positivos a la transformación en cada una de las repeticiones. Se emplearon 8 callos por tratamiento, para totalizar 24 callos distribuidos en los tres bloques.

Experi mento	Tiempo de cocultivo (Días)	Concentra ción de <i>A.</i> <i>tumefacie</i> <i>ns</i> (DO)	Concentraci ón de acetosiringo na (μ M)	Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3
1	3	2	100	0	0	3
2	3	2	50	2	0	0
3	3	1	100	0	0	2
4	3	1	50	0	0	1
5	1	2	100	0	3	4
6	1	2	50	0	0	3
7	1	1	100	0	0	4
8	1	1	50	0	0	0



Gráfica 3. La línea de corte en la gráfica de Pareto muestra la distancia a la cual los factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la transformación. El color azul de las barras indica el nivel bajo del factor, mientras el color gris indica el nivel alto del factor.

Arcos-Ortega y colaboradores (2010), mencionan que tuvo un efecto similar en explantes de hoja de diferente edad al ser transformados por *A. tumefaciens*, en donde la eficiencia de transformación disminuía notablemente en los explantes de mayor edad. Los autores determinan que mientras el explante tenga más edad, estos se vuelven más tolerantes frente a los patógenos, por lo que la infectividad de *Agrobacterium* disminuye notablemente, después de las 4 semanas de cultivo *in vitro* y empiezan a presentarse serios problemas de necrosis en el explante.

Tabla 9. Análisis de varianza de los factores evaluados durante la transformación de crisantemo.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Dias de Cocultivo	1.5	1	1.5	1.23	0.2862
B:Acetosiringona	0.666667	1	0.666667	0.55	0.4720
C:Agrobacterium	8.16667	1	8.16667	6.69	0.0215
AB	2.66667	1	2.66667	2.19	0.1615
AC	0.166667	1	0.166667	0.14	0.7172
BC	0.0	1	0.0	0.00	1.0000
ABC	0.0	1	0.0	0.00	1.0000
blocks	17.5833	2	8.79167	7.20	0.0071
Total error	17.0833	14	1.22024		
Total (corr.)	47.8333	23			

* Un valor de $p \leq 0.05$ indica un efecto significativo sobre la respuesta.

En crisantemo, Vantu (2006) hace una evaluación sobre la organogénesis a partir de callo, ya que argumenta, uno de los mayores problemas para la propagación vegetativa en cultivos de callo en esta especie, es la variación genética somaclonal que se origina por la pérdida de organización de los tejidos durante la formación de callos, incrementando la probabilidad de mutaciones. Para esto el autor probó explantes de hoja y tallo para generar callo, bajo diferentes condiciones de reguladores de crecimiento y llegando a la conclusión de que en la práctica es mejor la propagación clonal para conservar material genéticamente idéntico, así como el uso de explantes de tallo, ya que estos preservan mejor la identidad genética y conservan la capacidad morfogénica. Así mismo describe el envejecimiento del callo, como el resultado del agotamiento de nutrientes, inhibición de la difusión de nutrientes a través de las células del callo, incremento en la concentración de algunos componentes del medio como resultado de la evaporación y acumulación de metabolitos, de los cuales algunos pueden ser fitotóxicos.

VI.IX Efecto de la concentración de *A. tumefaciens*, el periodo de cocultivo y la concentración de acetosiringona, sobre el porcentaje de callos transformados.

De los tres factores evaluados, el único que mostró tener un efecto estadísticamente significativo fue la concentración de *A. tumefaciens* a un nivel de $D.O_{.600} = 2$ (Gráfica 4), en los tratamientos 1, 5 y 6, y eficiencias de 12.5%, 29.16% y 12.5% respectivamente. Los resultados del tratamiento 1 y 6, concuerdan con los obtenidos por Shinoyama (2002) de 13.6% en eficiencia, utilizando una concentración de *Agrobacterium* de $D.O_{.600} = 0.1$ y explantes de callo de crisantemo var. Shuho-no chikara, sin embargo el tratamiento 5 concuerda con el resultado de Shinoyama (2002) utilizando la misma concentración de *Agrobacterium*, pero con explantes de tallo (28.7%). Ambos tratamientos de Shinoyama (2002) fueron cocultivados durante 3 días y $50\mu\text{M}$ de acetosiringona, correspondientes en este trabajo al tratamiento 2, en el cual se obtuvo una eficiencia de 8.3%.

Song y colaboradores (2012), evaluó 1, 2 y 3 días de cocultivo en explantes de pétalo de crisantemo var. Orlando, usando una concentración constante de *Agrobacterium* de $D.O_{.600} = 0.8$, obteniendo como máxima eficiencia 10.6% y 13.3%, dependiendo de la posición del explante, a los 2 días de cocultivo y 4.8% y 3.5% a 1 día y 3 días respectivamente. El resultado obtenido por Song y colaboradores (2012) a los dos días es similar al resultado obtenido en este trabajo en los tratamientos 1 y 6 (12.5% en ambos casos), sin embargo en estos tratamientos se emplearon 3 días y 1 día de cocultivo respectivamente, sin que este factor tenga un efecto significativo sobre la transformación (Gráfica 4).

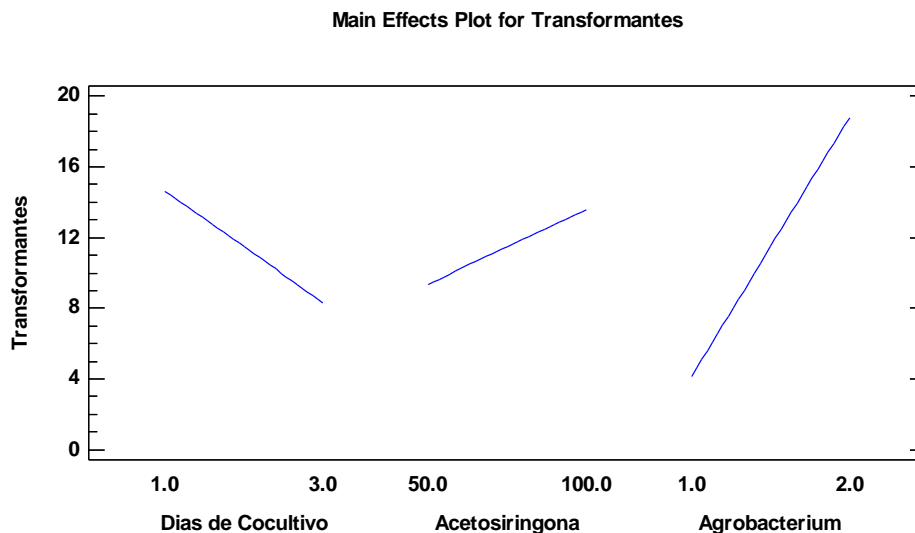
Valizadeh y colaboradores (2012) obtuvo 6.25% y 5% de eficiencia de transformación, en las variedades 1581 y 4043 respectivamente, bajo condiciones de 2 días de cocultivo, Concentración de *Agrobacterium* de $D.O_{.600} = 0.8-1$ y $100\mu\text{M}$ de acetosiringona. Los tratamientos empelados en este trabajo que utilizan una concentración de *Agrobacterium* de $D.O_{.600} = 1$ y $100\mu\text{M}$ de acetosiringona fueron los numero: 3 y 7, con 3 días de cocultivo para el tratamiento 3 y 1 día para el tratamiento 7, en los que se obtuvo 8.3% y 16.6% de eficiencia de transformación respectivamente. Aunque el objetivo principal de Valizadeh y colaboradores (2012), no fue obtener una mayor eficiencia de explantes transformados, los resultados que obtuvo, son comparativamente más bajos que los obtenidos por Song y colaboradores (2012), usando 2 días de cocultivo y los obtenidos en los tratamientos 3 y 7

En otras variedades de crisantemo (Kudo et al., 2002, Teixeira y Fukai 2002) y en otras especies como lechuga (Khan *et al.*, 2009), se ha reportado un efecto del periodo de cocultivo y la concentración de Agrobacterium.

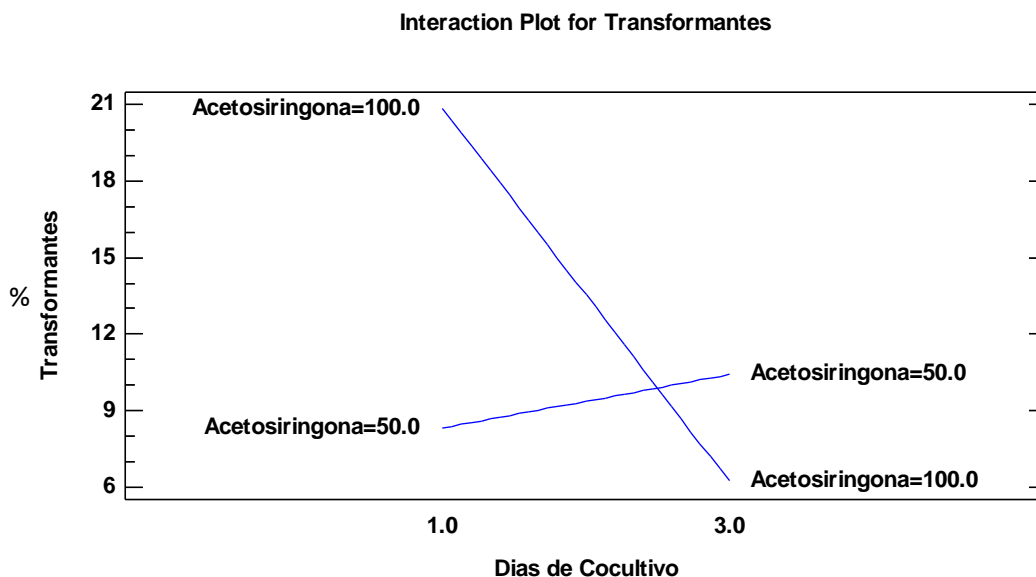
Kudo y colaboradores (2002), reportaron en cuatro variedades de crisantemo (Seiun, Shuho-no tikara, Tenju y Houkou), como resultados que los periodos de 1 día a 2 días de cocultivo son insuficientes para la transformación de crisantemo, mientras que periodos más largos de 4 días resultan en un decremento en la actividad de GUS, posiblemente por un crecimiento excesivo de Agrobacterium.

Por su parte las evaluaciones de Teixeira y Fukai (2002), se centraron en el efecto del periodo de cocultivo y el efecto de la acetosiringona en la transformación de dos variedades de crisantemo (Lineker y Shuhou-no chikara), obteniendo una diferencia estadísticamente significativa en el periodo de 4 y 5 días para la variedad Lineker y en el periodo de 5 días para la variedad Shuhou-no chikara. Los autores también reportaron que el uso de acetosiringona durante el cocultivo a una concentración de 100 μM tiene un efecto estadísticamente significativo en comparación con tratamientos que no utilizan el compuesto, al incrementar 104% el número de puntos donde se podía detectar GUS en un explante.

Khan y colaboradores (2009) evalúa en dos variedades de lechuga, de 1 a 3 días de cocultivo, resaltando en sus resultados, el efecto de los genotipos con una diferencia de hasta 15% en promedio en la eficiencia de transformación de los diferentes tratamientos, siendo a los 3 días el de máxima eficiencia para ambas variedades.



Grafica 4. Efectos principales sobre la transformación de callos de crisantemo var. Micromargara. El grado de inclinación en las barras azules indica el impacto sobre la transformación, siendo Agrobacterium el único que muestra una inclinación suficiente para lograr un efecto estadísticamente significativo.



Gráfica 5. Interacción no significativa entre la concentración de acetosiringona (μM) y los días de cocultivo, en la que la transformación se favorece a una concentración de acetosiringona de $100\mu\text{M}$ durante 1 día de cocultivo.

En este trabajo se muestra que la interacción entre el factor días de cocultivo y concentración de acetosiringona (Gráfica 5) no es estadísticamente significativa (Gráfica 3), siendo la interacción más destacada sin ser significativa la que se muestra en la gráfica 5, en donde se favorece la transformación en un periodo de 1 día de cocultivo y usando $100\mu\text{M}$ de acetosiringona, los cuales corresponden a los tratamientos 5 y 7 con 29.16% y 16.6% respectivamente. Estas condiciones en el periodo de cocultivo difieren de las reportadas por Kudo y colaboradores (2002) y Teixeira y Fukai (2002), sin embargo es posible que se presente un efecto por el genotipo en la variedad Micromargara, tal como Sherman y colaboradores (1998), reporta para las variedades Polaris, Heckla e Iridon.

VII. CONCLUSIONES

- 1.- La concentración de 250 µg/ml de Timentín resultó ser adecuada, para la desinfección de *Agrobacterium* en los callos de crisantemo transformados. , ya que puede inhibir por completo el crecimiento de *Agrobacterium* sin tener un efecto negativo, estadísticamente significativo sobre el callo.
- 2.- La adición de PVPP al 0.1% en el medio de cultivo *in vitro* puede tener una mejoría estadísticamente significativa sobre el mantenimiento y propagación del callo al reducir el oscurecimiento.
- 3.- Se determinó que la concentración, medida en términos de densidad óptica, de *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA44044, con mejores resultados sobre la eficiencia de transformación de callos de crisantemo fue la de $D.O._{600} = 2$
- 4.- El diseño estadístico empleado permitió evaluar la interacción de los diferentes factores, y su influencia sobre la eficiencia de transformación de los callos de crisantemo determinando que no hay una influencia estadísticamente significativa de los factores “periodo de cocultivo” y “concentración de acetosiringona”, sin embargo bajo las condiciones del tratamiento 5 (1 día de cocultivo y 100 µM de acetosiringona) se favorece la eficiencia de transformación con un 29.16%, la cual fue la eficiencia más alta de todos los tratamientos evaluados.

VIII. RECOMENDACIONES

Se sugiere emplear un pre-acondicionamiento de los explantes antes de someterlos a transformación, que implique eliminar los reguladores de crecimiento y reducir la concentración de sales en el medio de cultivo, ya que algunos autores sugieren un efecto de este tratamiento en la eficiencia de transformación.

Se recomienda ampliar los rangos de evaluación de los factores: Periodo de cocultivo y concentración de acetosiringona, ya que se observó que utilizar el periodo de cocultivo de un día, más la concentración de 100 μ M de acetosiringona, incrementó de 16 a 29% la eficiencia de transformación siempre que se utilice una concentración de D.O 600 =2.0 de *A. tumefaciens* y aunque este tratamiento no resultó estadísticamente significativo, los valores de P fueron cercanos a la significancia.

Se recomienda utilizar callos recién formados a partir del explante de hoja, ya que se observó un aparente efecto de la edad de los callos utilizados durante la transformación, entre los bloques 1 y 2 y el bloque 3, manifestado en el efecto de los bloques sobre el análisis estadístico.

IX. LITERATURA CITADA

Adachi, Y., Mori, S. y Nakano M. 2005. Agrobacterium-mediated production of transgenic plants in *Trycirtis hirta* (Liliaceae). *Acta Horticulturae* 673: 415-419.

Aida, R., Nagaya, S., Yoshida, K., Kishimoto, S., Shibata, M., Ohmiya, A. 2005. Efficient transgene expression in *Chrysanthemum*, *Chrysanthemum morifolium* Ramat., with the promoter of a gene for tobacco elongation factor 1 α protein. *Japan Agricultural Research Quarterly* 39: 269-274.

Aida, R., Ohira, K., Tanaka, Y., Yoshida, K., Kishimoto, S., Shibata, M. y Ohmiya A. 2004. Efficient transgene expression in *Chrysanthemum grandiflorum* (Ramat.) Kitamura, by using the promoter of a gene for *Chrysanthemum chlorophyllIII-a/b*-binding protein. *Breeding Science* 54: 51-58.

Akramian, M., Fakr. T., S., M. y Mirmasoumi, M. 2008. Virulence of diferent strains of *Agrobacterium rizhogenes* on genetic transformation of four *Hyoscyamus* species. *American-Eurasian Journal of Agronomics and Enviroments* 3: 759-763.

Alves, A., Quesini, V.Carneiro, M. 1999. Plant transformation, advances and perspective. *Scientia Agrícola* 56: 1-8.

Anderson, N. O. 2007. Flower Breeding and Genetics; Issues, challenges and opportunities for the 21st century. Capítulo 14 Crisantemo. Editorial Springer. Países Bajos. pp 389-395.

Aranda, L. 2007. Desarrollo de métodos para la transformación genética de frijol común a través de electroporación. Tesis sometida para obtener grado de Maestría. Universidad de Puerto Rico.

Azofeifa, A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. *Agronomía Mesoamericana* 20: 153-175

Barakat, M., Fattah, R., Badr, M. y El-Torky, M. 2010. *In vitro* culture and plant regeneration derived from ray florets of *Chrysanthemum morifolium*. *African Journal of Biotechnology* 9: 1151-1158.

- Beyer, P., Al-Babili, S., Ye, X., Lucca, P., Schaub, P., Welsch, R. y Potrykus I. 2002. Golden Rice: Introducing the β -carotene biosynthesis pathway into rice endosperm by genetic engineering to defeat vitamin A deficiency. *American Journal of Nutritional Science* 506s-510s.
- Birch, R. 1997. Plant transformation: Problems and strategies for practical application. *Plant Physiology Annual Review. Plant Molecular Biology* 48: 297-326.
- Blanco, M., Valverde, R., Gomez, L. 2003. Optimización de la transformación genética con *Agrobacterium rhizogenes*. *Agronomía Costarricense* 27: 19-28.
- Boodley, W. J., Newman, E. S. 2009. The commercial Green house. Editorial Delmar Cengage learning. Canadá. pp. 643-646.
- Boscovik, J., Isajev, V., Prijic, Z., Zecevic V., Hojka, Z., Dozet, G. 2010. Assessing ecological risks and benefits of genetically modified crops. *Journal of Agricultural Sciences* 55: 89-101.
- Boulin, T., Etchberger, J., F., Hobert, O. y Hughes, H. 2006. Reporter gene fusions. *Worm book*, ed. The C. elegans Research Community. wormbook.org pp 5-6
- Bush, A. I. Y Puepke, G. S. 1991. Characterization of an unusual new *Agrobacterium tumefaciens* strain from *Chrysanthemum morifolium* Ramt. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 2468-2472.
- Cassanova, E., Trillas, M., Moysset, L., Vainstein, A. 2005. Influence of rol genes in floriculture. *Biotechnology Advances* 23: 3-39.
- Cermeño, S. P. 2007. Influencia de la radiación solar, densidad de plantación y técnica de pinzado, en la calidad y coste de producción del cultivo de crisantemo. *Horticultura internacional* 57: 12-15.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W., W. y Douglas, C. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263: 1-10.
- Chen, P., Y., Wang, C., K., Soong, S., C., To, K., Y. 2003. Complete sequence of binary vector pBI121 nd its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants. *Molecular Breedings* 11: 287-293.
- Cheng, Z., Schurr. J., Kapaun. J. 1998. Timentin as an alternative antibiotic for suppression of *Agrobacterium tumefaciens* in genetic transformation. *Plant Cell Reports* 17: 646-649.
- Christou, P. 1992. Genetic transformation of crop plants using microprojectile bombardment. *The Plant Journal* 2: 275- 281.
- Chomczynski, P. y Sacchi, N. 2006. The single-step method of RNA isolation by acid buanidinium thiocynate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols* 1: 581-585.

- Chung, S., M., Vaidya, M. y Tzfira, T. 2005. Agrobacterium is not alone: gene transfer to plants by viruses and other bacteria. *Trends in Plant Science* 20: 1-4.
- Costa, M., Nogueira, F., Figueira, M., Otoni, W., Brommonschenkel, S., Cecon, P. 2000. Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars. *Plant Cell Reports* 19: 327-332.
- Davies, J. y Jimenez, A. 1980. A new selective agent for eukaryotic cloning vectors. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 29: 1089-1092.
- Davis, M., Lineberger, D. y Miller, R. 1991. Effects of tomato cultivar, leaf age, and bacterial strain on transformation by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 24: 115-121.
- Díaz, M., Zappacosta, D., Franzone, P., Ríos, R. 2010. Biotecnología y Mejoramiento vegetal II; II. Capítulo 6: Aplicación de la transformación genética al mejoramiento vegetal. Editores: Levitus G., Echenique V., Rubinstein C., Hopp E., Mrojinsky L. Editorial: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina. pp: 243-257.
- Dolgov, S., Mitiouchkina, T., Skryabin, K. 1997. Agrobacterial transformation of chrysanthemum. *Acta horticultrae* 447: III International symposium on in vitro culture and horticultural breeding.
- Fraley, R., Horseh, R., Rogers, S. 1995. Chimeric genes for transforming plant cells using viral promoters. *Biotechnology Advances* 13 (2): 267
- Gantait, S. y Pal, P. 2010. Anthocyanin content of spray chrysanthemum cultivars under polyhouse and open field conditions. *Indian Journal of Natural Products and Resources* 1: 236-242.
- Gaspar, TH., Kevers, C., Faivre-Rampant, O., Crevecoeur, M., Pennel, CI., Greppin, H., Dommes, J. 2003. Changing concepts in plant hormone action. *Plant Hormone Action In vitro cell development biology* 39: 85-106.
- Gelvin, S. 2003 Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the gene-jockeying tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67: 16.
- Ghim, C., M., Lee, S., K., Takayama, S. y Mitchell, R., J. 2010. The art of reporter proteins in science: past, present and future applications. *Biochemistry and Molecular Biology Reports* 451-460.
- Herreros, L. 1995. Cultivo de crisantemo 2º Edición. Instituto Canario de Investigaciones Agrarias. Editorial: Consejería de Agricultura, Pesca y Alimentación. Canarias. pp. 5-8.
- Hoekma, A., Hirsh, P., Hooykaas, J., Schilperoort, R. 1983. A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303: 179-180.

- Hussein, G., M., Abu-El-Heba, G., A., Abdou, S., M. y Abdallah, N., A. 2013. Optimization of transient gene expresión system in *Gerbera jemosonii* petals. *Biotechnology in Agriculture and the food chain* 4: 50-57.
- Jaramillo, H., E., Forero, A., Cancino, G., Moreno, A., Monsalve, L., E. y Acero, W. 2008. In vitro regeneration of three chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora*) varieties “via” organogenesis and somatic embryogenesis. *Universitas Scientiarum* 13: 118-127.
- Jefferson, R., A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Molecular Reporter* 5: 387-405.
- Katsumoto, Y., Fukuchi-Mizutani, M., Fukui, Y., Brugliera, F., Holton, T., Karán, M., Nakamura, N., Yonekura-Sakakibara, K., Togami, J., Pigeaire, A., Tao, G., Nehra, N., Lu, C., Dyson, B., Tsuda, S., Ashikari, T., Kusumi, T., Mason, J., Tanaka, Y. 2007 Engineering of the Rose flavonoid biosynthetic pathway succesfully generated blue-hued flowers accumulating delphinidin. *Plant Cell Physiology* 48: 1589-1600.
- Khan, M., M., A., Robin, A., B., M., A., H., Nazim-Ud-Dowla, M., A., N., Talukder, S., K. y Hassan, L. 2009. Agrobacterium-mediated genetic transformation of two varieties of Brassica: Omptimization of protocol. *Bangladesh Journal of Agricultural Research* 34: 287-301.
- Kiyokawa, K., Yamamoto, S., Sakuma, K., Tanaka, K., Morigushi, K., Suzuki, K. 2009. Construction of disarmed Ti Plasmids transferable between *Escherichia coli* and Agrobacterium species. *Applied and Environmental Microbiology*. 1845-1851.
- Kramer, K., Morgan, T., Throne, J., Dowell, F., Bailley, M. y Howard, J. 2000. Transgenic avidin maize is resistant to storage insect pests. *Nature Biotechnology* 18: 670-674.
- Kudo, S., Shibata, N., Kanno, Y., Suzuki, M. 2002. Transformation of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) via *Agrobacterium tumefaciens*. *Acta Horticulturae*. 572: XX Symposium on new ornamentals II.
- Laukkanen, H., Rautiainen, L., Taulavuori, E. y Hohtola A. 1999. Changes in celular structures and enzymatic activities during browning of Scots pine callus derived from mature buds. *Tree Physiology* 20: 467-475.
- Le, V., Belles-Isles, J., Dusabenyagasani, M. y Tremblay, F. 2001. An improved procedure for production of White spruce (*Picea glauca*) transgenic plants using *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Experimental Botany* 52: 2089-2095.
- Ledger, S., Deroles, S., Given, N. 1991. Regeneration and Agrobacterium-mediated transformation of chrysanthemum. *Plant Cell Reports* 10: 195-199.
- Le, V., Q., Belles-Isles, J., Dusabenyagasani, M. y Tremblay, F., M. 2001. An improved procedure for production of White spruce (*Picea glauca*) transgenic plants using *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Experimental Botany* 52: 2089-2095.
- Lee, L., Gelvin, S. 2008. T-DNA binary vectors and systems. *Plan Physiology* 146: 325-332.

- Lewin, B. 2008. Promoters and Enhancers. En: Genes IX Chapter 24. Editorial Jones and Bartlett Publishers. Canadá. pp 609- 635.
- Magdum, S., S. 2013. Effect of Agrobacterium induced necrosis, antibiotic induced phytotoxicity and other factors in successful plant transformation. Journal of Stress Physiology and Biochemistry 9: 98-112.
- Mary-Del, I C., Tepfer, A. D., Petit, A., David, C., Casse-Delbart, F. y Tempé, J. 1982. Agrobacterium rhizogenes inserts T-DNA into the genomes of host plant root cells. Nature 295: 432-434.
- McCormac, A., C., Elliot, M., C. y Chen, D., F. 1998. A simple method for the production of highly competent cells of Agrobacterium for transformation via electroporation. Molecular Biotechnology 9: 155-159.
- Miller, H., N. 1975. Leaf, stem, crown, and root galls induced in chrysanthemum by Agrobacterium tumefaciens. Phytopathology 65: 805-811.
- Ming, O., Wen, A., Sinniah, U., Subramaniam, S. 2007. Cysteine and Acetosyringone are the two important parameters in Agrobacterium-mediated transformation of rose hybrid (Rosa hybrida L.) cv. *Nikita*. Journal of Plant Sciences 2: 387-397.
- Mitiouchkina, T., Dolgov, S. 2000. Modification of chrysanthemum plant and flower architecture by ROL C gene from *Agrobacterium rhizogenes* introduction. Acta horticultrae. 508: XIX International symposium on improvement of ornamental plants.
- Mitiouchkina, T., Dolgov, S., Zavriev, K., Karshenko, P. 2006. Molecular biology approach for improving chrysanthemum resistance to virus B. Acta Horticulturae. 722: XI International symposium on virus disease of ornamental plants.
- Narusaka, Y., Narusaka, M., Yamaski, S. y Iwabunchi, M. 2012. Methods to transfer foreign genes to plants. Transgenic plants; Advances and Limitations. Research institute for biological science. Okyama Japan. Pp 173-187.
- Noda, N., Aida, R., Kishimoto, S., Ishiguro, K., Fukushi-Mizutani, M., Tanaka, Y. 2013. Genetic Engineering of Novel Blue-Colored Chrysanthemums Produced by Accumulation of Delphinidin-Based Anthocyanins. Plant and Cell Physiology 54 (10): 1684-1695.
- Novak, F., Brunner, H. 1992. Plant breeding: Induced mutation technology for crop improvement. International Atomic Energy Agency Bulletin. 4/1992.
- Novo, U., E. 2008. Lignificación en cultivos celulares de gimnospermas basales. Universidad de Coruña. Coruña. pp 5-7, 12-14
- Ohmiya, A., Kishimoto, S., Aida, R., Yoshioka, S. y Sumitomo, K. 2006. Carotenoid cleavage dioxygenase (CmCCD4a) contributes to white color of formation in chrysanthemum petals. Plant Physiology 142: 1193-1201.
- Ogawa, Y., Ishikawa, K. y Mii, M. 2000. Highly tumorigenic *Agrobacterium tumefaciens* strain from Crown gall tumors of chrysanthemum. Archives of Microbiology 173: 311-315.

- Otahola-Gómez, V., Aray, M., Antoima, Y. 2001. Inducción de mutantes para el color de la flor en crisantemos (*Dendranthema grandiflora* (Ram.) Tzvelev) mediante radiaciones gamma. Revista de la Universidad de Oriente Agrícola 1: 56-63.
- Pardo, J., M., Malpartida, F., Rico, M. y Jimenez, A. 1985. Biochemical basis of resistance to hygromycin B in *Streptomyces hygroscopicus* – the producing organism. Journal of General Microbiology 131: 1289-1298.
- Pascual-Villalobos, M. 1999. Efectos del aceite esencial de inflorescencias de *Chrysanthemum coronarium* L. en mosca blanca y plagas de almacen. Investigación Agrícola, Producción y Protección 14: 249-258.
- Pellegrineschi, A., Damon, J.-P., Valtorta, N., Paillard, N., Tapfer, D. 1994. Improvement of Ornamental Characters and Fragrance Production in Lemon-scented Geranium Through Genetic Transformation by *Agrobacterium rhizogenes*. Nature Biotechnology. 12: 64-68.
- Perez-Piñeiro, P., Gago, J., Landin, M. y Gallego, P., P. 2012. *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat: general overview and new approaches to model and identify the key factors involved. Transgenic Plants; Advances and Limitations 2-26.
- Perl, A., Lotan, O., Abu-Abied, M. y Holland, D. 1996. Establishment of an *Agrobacterium*-mediated transformation system for grape (*Vitis vinífera* L.): The role of antioxidants during grape-*Agrobacterium* interactions. Nature Biotechnology 14: 624-628.
- Puopolo, G., Raio, A., Zoina, A. 2007. Early detection of *Agrobacterium tumefaciens* in symptomless artificially inoculated chrysanthemum and peach plants using PCR. Journal of Plant Pathology 89: 185-190.
- Rashid, H., Khan, M., Chaudhry, Z., Bano, R., Raja, N. 2012. An improved *Agrobacterium* mediated transformation system in wheat. Pakistan Journal of Botanic 44: 297-300.
- Renou, J., Brochard, P., Jalouzot, R. 1993. Recovery of transgenic chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) after hygromycin resistance selection. Plant Sciences 89: 185–97.
- Sanford, C. J. 2000. The development of the biolistic process. In Vitro Cell Development Biology Plant 36: 303-308.
- Santos, E., Remy, S., Thiry, E., Windelinckx, S., Swennen, R. y Sági, L. 2009. Characterization and isolation of a T-DNA tagged banana promoter active during *in vitro* culture and low temperature stress. Plant Biology 9: 77.
- Sassi, S., Gonzalez, E., Aydi, S., Arresger-Igor, C. y Abdelly, C. 2008. Tolerance of common bean to long-term osmotic stress is related to nodule carbon flux and antioxidant defenses: evidence from two cultivars with contrasting tolerance. Plant Soil 312: 39-48.
- Satchel, S., Messens, E., Montagu, M., Zambryski, P. 1985. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. Nature 318: 624-629.

Satchel, S., Timmerman, B. y Zambryski P. 1987. Activation of *Agrobacterium tumefaciens* vir gene expression generates multiple single stranded T-strand molecules from the pTiA6 T-region: requirement for 5' virD gene products. The EMBO Journal 6: 857-863.

Scott, M. and Pollak, L. 2005. Transgenic Maize. Starch/Starker 57:187-195.

Sen, S., Kumar, S., Ghani, M. y Thakur, M. 2013. Agrobacterium mediated genetic transformation of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) with rice chitinase gene for improved resistance against *Septoria obesa*. Plant Pathology Journal 12: 1-10.

Sharma, P., Jha, A., B., Dubey, R., S. y Passarakli, M. 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. Journal of Botany 2012: 1-26

Shchennikova, A., Shulga, O., Immink, R., Skryabin, K y Angenent, G. 2004. Identification and characterization of four chrysanthemum MADS-Box genes, belonging to the APETALA1/FRUITFULL and SEPALLATA3 subfamilies. Plant Physiology 134: 1-10.

Sherman, J., Moyer, J., Daub, M. 1998. A regeneration and Agrobacterium-mediated transformation system for genetically diverse Chrysanthemum cultivars. Journal of American Society of Horticultural Science 123: 189-194.

Shinoyama, H., Kazuma, T., Komano, M., Nomura, Y., Tsuchiya, T. 2002. An efficient transformation system in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) for stable and non-chimeric expression of foreign genes. Plant Biotechnology 19: 335-343.

Shinoyama, H., Aida, R., Ichikawa, H., Nomura, Y. y Mochizuki, A. 2012. Genetic engineering of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*): Current progress and perspectives. Plant Biotechnology 29: 323-337.

SIAP.2012. Revisado Julio del 2013.

http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=350

SIAP. 2013. Revisado Enero del 2014. <http://www.siap.gob.mx/produccion-ornamental-mexico/>

Singh, M., Yadav, A., Ma, X. y Amoah, E. 2010. Plasmid DNA transformation in *Escherichia coli*: effect of heat shock temperatura, duration and cold incubation of CaCl₂ treated cells. International Journal of Biotechnology and Biochemistry 4: 561-568.

Song, J., Sivanesan, I., Jeong, B. 2012. Use of petal explants for successful transformation of *Dendranthema grandiflorum* Kitamura "Orlando" mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. African Journal of Biotechnology 11: 9141-9148.

Sunjung, P. 2006. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaf disks: evaluation of the cocultivation conditions to increase B-glucoronidase gene activity. Thesis para obtener el grado de Maestria en Ciencias. University of Korea.

- Takatsu, Y., Hayashi, M. y Sakuma, F. 2000. Transgene inactivation in *Agrobacterium*-mediated chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) transformants. *Plant Biotechnology* 17: 241-245.
- Tanaka, Y., Brugliera, F., Chandler, S. 2009. Recent progress of flower colour modification by biotechnology. *International Journal of Molecular Sciences* 10: 5350-5369.
- Tang, H., Ren, Z., Krczal, G. 2000. An evaluation of antibiotics for the elimination of *Agrobacterium tumefaciens* from walnut somatic embryos and for the effects on the proliferation of somatic embryos and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Reports* 19: 881-887.
- Teixeira, J. y Fukai, S. 2001. The impact of carbenicillin, cefotaxime and vancomycin on chrysanthemum and tobacco TCL morphogenesis and *Agrobacterium* growth. *Journal of Applied Horticulture* 3: 3-12.
- Teixeira, J. y Fukai, S. 2002. Increasing transient and subsequent stable transgene expression in chrysanthemum following optimization of particle bombardment and agroinfection parameters. *Plant Biotechnology* 19: 229-240.
- Teixeira, J. y Fukai, S. 2003. Four gene introduction methods affect the shoots regeneration and localization of transgene expresión in greenhouse stem explants and *in vitro*-grown chrysanthemum stem thin cell layers. *African Journal of Biotechnology* 2: 114-123.
- Teixeira, J. 2005. Effective and comprehensive chrysanthemum (*Dendranthema X grandiflora*) regeneration and transformation protocols. *Biotechnology* 4: 94-107.
- Teixeira, J., Nhut, D., Tanaka, M., Fukai, S. 2003. The effect of antibiotics on their vitro growth response of chrysanthemum and tobacco stem transverse thin cell layers (tTCLs). *Scientia Horticulturae* 97: 397-410.
- Thiruvengadam, M., Jeyakumar, J., Kamaraj, M., Chung, I., M. y Kim, J., J. 2013. Optimization of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in gherkin (*Cucumis anguria* L.). *Plant Omics Journal* 6: 231-239.
- Thorpe, T. 2007. History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology* 37: 169-180.
- To K-Y y Wang C-K. 2006. Molecular Breeding of Flower Color. Floriculture, ornamental and plant biotechnology. Global Science Books 35. pp 300-310.
- Toguri, T., Ogawa, T. Kakitani, M., Tukahara, M., Yoshioka M. 2003. *Agrobacterium*-mediated transformation of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora*) plants with a disease resistance gene (*pac1*). *Plant Biotechnology* 20: 121-127.
- Tripathi, R., M., Bisht, H., S. y Singh, R., P. 2010. Effect of acetosiringona and callus age on transformation for scutellum-derived callus of rice. *International Journal of Pharma and BioScience* 1: 163-171.

- Tzfira, T., Li, J., Lacroix, B. y Citovsky, V. 2004. Agrobacterium T-DNA integration: molecules and models. *Trends in Genetics* 20: 375-383.
- Tzfira, T. y Citovsky, V. 2006. Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 17:147-154.
- Valizadeh, M., Kazemitabar, S., Jongtsma, M. 2012. Agrobacterium mediated genetic transformation of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) with an aphidical gene, gcs (Gamma-cadinene sintase). *International Journal of Plant Breeding and Genetics* 1-14.
- Valizadeh, M., Deraison, C., Kazemitabar, S., K., Rahbé, Y. y Jongtsma, M., A. 2013. Aphid resistance in florist's chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat) induced by sea anemone equistatin overexpression. *African Journal of Biotechnology* 12: 6922-6930.
- Valle-Sandoval, M., Mascorro-Gallardo, J., Gil-Vazquez, I. y Iturriaga, de la Fuente G. 2008. Regeneración directa *in vitro* del crisantemo, *Dendranthema grandiflorum* Kitam, a partir de segmentos de tallo. *Trópico Húmedo* 2: 219-227.
- Vantu, S. 2006. Organogénesis in *Chrysanthemum morifolium* Ramat (Cultivar "Romica") callus cultures. *Analele Stiintifice ale Universitat "Al. I. Cuza" Iasi* 52: 71-76
- Vieira, H., L. y Carneiro, V., M. 2000. Resposta *in vitro* e suscetibilidade ao Agrobacterium de duas cultivares de *Stylosanthes guanensis*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 35: 733-742.
- Vences-Contreras, C., Vazquez-García L., M. y Hernandez-Rodriguez O., A. 2009. Regeneración *in vitro* de once cultivares de crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) a partir de meristemas apicales. *Agronomía Mesoamericana* 20: 409-415.
- West, P., Reid, B., Campbell, T., Sandroock, R., Fry, W., Kamoun, S., Gow, N. 1999. Green fluorescent protein (GFP) as a reporter gene for the plant pathogenic oomycete *Phytophthora palmivora*. *Microbiology Letters* 178: 71-80.
- Whitman, D. 2000. Genetically modified foods: Harmful or helpful? Editorial: *Discovery guides*. pp 1.
- Wise, A., Liu, Z., Binns, A. 2006. Culture and Maintenance of Agrobacterium Strains. *Agrobacterium protocols Vol. 1*. Editor: Wang, K. *Methods in Molecular Biology* 343. pp. 3-13.
- Wise, A., Liu, Z., Binns, A. 2006. Three Methods for Introduction of Foreigns DNA into Agrobacterium. *Agrobacterium protocols Vol. 1*. Editor: Wang, K. *Methods in Molecular Biology* 343. pp. 43-53.
- Wordragen, M., Jong, J., Huitema, H., Dons, H. 1991. Genetic transformation of chrysanthemum using wild type Agrobacterium strains; strain and cultivar specificity. *Plant Cell Reports* 9: 505-508.

- Wu, R. 1989. Methods for transforming plant cells. *Plant Biotechnology* 35-51
- Yenchón, S., Te-Chato, S. 2012. Effect of bacteria density, inoculation and cocultivation period on *Agrobacterium*-mediated transformation of oil palm embryogenic callus. *Journal of Agricultural Technology* 8: 1485-1496.
- Zheng, Z. y Yang, Z. 2001. Modification of plant architecture in chrysanthemum by ectopic expression of the tobacco phytochrome *BI* gene. *Journal of American Society of Horticultural Science* 126: 19-26.
- Zuker, A., Tzfira, T., Scovel, G., Ovadis, M., Shklarman, E., Izhaki, H., Vainstein A. 2001. *RolC*-Transgenic carnation with improved horticultural traits: quantitative and qualitative analyses of greenhouse-grown plants. *Journal of American Society of Horticultural Science*. 126 (1): 13-18
- Zupan, R J. y Zambryski, P. 1995. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Phsysiology* 107: 1041-1047.

X. ANEXOS

Anexo A. Resumen de congreso: Determination of the conditions for genetic transformation in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*) var. micromargara mediated by *Agrobacterium tumefaciens*.

Anexo A

Determination of the conditions for genetic transformation in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*) var. micromargara, mediated by *Agrobacterium tumefaciens*

Juan Ubaldo Sánchez-Velázquez¹, Ana Luisa Ramos-Díaz¹, Guadalupe López-Puc¹, Ingrid M. Rodríguez-Buenfil¹; Alberto Uc-Varguez^{1,2,3}

¹ Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. Unidad Sureste. ²Present address: Calle 30 No. 151, Col. García Gineres (Interior CANACINTRA) Cp. 97070 Mérida Yucatán México. ³Corresponding author E-mail: auc@ciatej.net.mx

The efficiency of *Agrobacterium* mediated transformation in recalcitrant plants such as Chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora*) varieties is affected by some factors like bacterial concentration, co-culture period and acetosyringone concentration. It has been reported that interaction of these parameters are important to increase the efficiency of genetic transformation of Chrysanthemum explants. In this work, we applied an experimental design 2³ with three central points, to determine if the statistic interaction between bacterial concentration (OD₆₀₀ ≈2 and OD₆₀₀ ≈1), co-culture period (1 or 3 days) and acetosyringone concentration (100 μM or 50 μM) increase the efficiency of genetic transformation in *D. grandiflora* var. micromargara. We used Chrysanthemum var. micromargara calli as plant material, and LBA4404 strain of *A. tumefaciens* harboring pBI121 and PAL4404 plasmids for transformation experiments. Putative transformants were screened by GUS histochemical assay and uidA and NPTII expression through RT-PCR. PCR was conducted using specific oligonucleotides for uidA and NPT II. Preliminary results suggest that the most effective conditions for Chrysanthemum var. micromargara transformation were bacterial concentration of Optical density ≈2, three days of coculture and acetosyringone concentration of 50 μM.

Acknowledgment: Authors thanks to the National Council of Science and Technology (CONACyT-México) by grant 104606.