

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
CARRERA DE BIOLOGIA**



**ORGANOGENESIS *in vitro* A PARTIR DE DISCOS DE HOJA DE *Passiflora mollissima* HBK Bailey (curuba) INFECTADOS CON *Agrobacterium tumefaciens***

**CAROLINA LEAL GUTIERREZ**

**TRABAJO DE GRADO  
Presentado como requisito parcial para optar el título de Bióloga.**

**BIOLOGIA**

**Bogotá, D. C.  
Julio 2003**

#### **NOTA DE ADVERTENCIA:**

"La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia".Artículo 23 de la Resolución N°13 de julio de 1946.

**ORGANOGENESIS *in vitro* A PARTIR DE DISCOS DE HOJA DE *Passiflora*  
*mollissima* HBK Bailey (curuba) INFECTADOS CON *Agrobacterium*  
*tumefaciens***

**CAROLINA LEAL GUTIERREZ**

**APROBADO**

---

GIOVANNI CANCINO E. Ph.D.  
BIOLOGO  
DIRECTOR

---

ANDREA FORERO RUIZ  
BIOLOGA  
CODIRECTOR

---

ALEJANDRO CHAPARRO Ph.D.  
AGRONOMO  
JURADO 1

---

INGRID SCHULER Ph.D.  
BIÓLOGA  
JURADO 2

**ORGANOGENESIS *in vitro* A PARTIR DE DISCOS DE HOJA DE *Passiflora*  
*mollissima* HBK Bailey (curuba) INFECTADOS CON *Agrobacterium*  
*tumefaciens***

**CAROLINA LEAL GUTIÉRREZ**

---

ANGELA UMAÑA Mphil.  
DECANO FACULTAD

---

LUZ MERCEDES SANTAMARÍA  
BIÓLOGA  
DIRECTORA DE CARRERA

## FORMATO DESCRIPCIÓN TRABAJO DE GRADO

### AUTOR O AUTORES

Apellidos	Nombres
LEAL GUTIERREZ	CAROLINA

### DIRECTOR (ES)

Apellidos	Nombres
CANCINO ESCALANTE	GIOVANNI

### ASESOR (ES) O CODIRECTOR

Apellidos	Nombres
FORERO RUIZ	ANDREA PATRICIA

TRABAJO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE: BIÓLOGO

TÍTULO COMPLETO DEL TRABAJO: **ORGANOGENESIS *in vitro* A PARTIR DE DISCOS DE HOJA DE *Passiflora mollissima* (CURUBA) INFECTADOS CON *Agrobacterium tumefaciens*,**

FACULTAD DE CIENCIAS

PROGRAMA: Carrera   x   Especialización    Maestría    Doctorado   

NOMBRE DEL PROGRAMA: BIOLOGÍA

CIUDAD: BOGOTA AÑO DE PRESENTACIÓN DEL TRABAJO: 2003

NÚMERO DE PÁGINAS 69

TIPO DE ILUSTRACIONES: Tablas, gráficos, Fotografías

MATERIAL ANEXO:

DESCRIPTORES O PALABRAS CLAVES.

Organogénesis, *Passiflora mollissima*, transformación genética.

## RESUMEN DEL CONTENIDO:

La curuba (*Passiflora mollissima*), es una fruta apreciada tanto en el mercado nacional como en el internacional, por sus cualidades alimenticias y su agradable sabor. Teniendo en cuenta que es una especie susceptible de ser transformada genéticamente con *Agrobacterium tumefaciens*, es prioritario determinar las condiciones necesarias para la regeneración *in vitro* de esta planta. En este trabajo, se realizó la evaluación de diferentes concentraciones de citoquininas (Benzil-aminopurina y Kinetina) sobre la regeneración de plantas a partir de discos de hoja de *P. mollissima* infectados con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404, con el vector binario pBI 121. Como genes marcadores se utilizaron, el gen  $\beta$ -*gus*, que codifica para la enzima  $\beta$ -glucoronidasa y el gen *npt II*, que confiere resistencia a la kanamicina en los tejidos vegetales transformados.

De tal forma, fue posible obtener plantas transformadas con los genes marcadores, utilizando medio de cultivo Nitsch suplementado con 13.32 $\mu$ M/l y empleando cefotaxime 250 mg/l como antibiótico para controlar el crecimiento bacteriano. Los brotes iniciales, presentaron elongación del tallo y desarrollo de raíces al cultivarlos en un medio Nitsch sin reguladores de crecimiento.

Por otra parte, para determinar la transformación genética de *Passiflora mollissima*, se establecieron los brotes regenerados en medio de cultivo Nitsch con 12.5 mg/l de kanamicina donde se obtuvo un porcentaje de sobrevivencia de 34.9%, lo que indicó la expresión del gen *npt II*; adicionalmente se comprobó la integración de este gen en el genoma vegetal mediante PCR y visualización por medio de electroforesis. Así mismo, se verificó la expresión del gen  $\beta$ -*gus* mediante análisis histoquímico en las plantas sobrevivientes al medio selectivo con kanamicina.

Este trabajo se realizó en la Unidad de Biotecnología Vegetal, adscrita al Departamento de Biología de Pontificia Universidad Javeriana.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia por apoyarme y ayudarme,  
A Andrea Forero y Giovanni Cancino por su inmensa colaboración, sus consejos  
y enseñanzas cada día de encuentro,  
A la Unidad de Biotecnología Vegetal de la Universidad Javeriana, porque cada  
una de las personas que trabajan allí colaboraron de alguna forma para  
*la realización de este trabajo.*

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. MARCO TEORICO Y REVISIÓN DE LITERATURA</b>	<b>4</b>
<b>2.1 FAMILIA PASSIFLORACEAE</b>	<b>4</b>
<b>2.1.1 Género <i>Passiflora</i></b>	<b>5</b>
2.1.1.1 Subgénero Tacsonia	7
<b>2.1.2 <i>Passiflora mollissima</i></b>	<b>8</b>
<b>2.1.2.1 Distribución</b>	<b>8</b>
2.1.2.2 Sinónimos	8
2.1.2.3 Taxonomía	9
2.1.2.4 Botánica	9
2.1.2.5 Importancia económica	10
2.1.2.6 Aspectos agronómicos	11
<b>2.2 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE CELULAS VEGETALES MEDIADA POR <i>Agrobacterium tumefaciens</i></b>	<b>13</b>
<b>2.2.1 Plásmido inductor de tumores:</b>	<b>15</b>
2.2.1.1 Proceso de infección	18
<b>2.2.2 Manipulación genética de células vegetales usando <i>Agrobacterium tumefaciens</i></b>	<b>19</b>
2.2.2.1 Vectores Binarios	19
2.2.2.2 Expresión de genes transferidos	20
2.2.2.3 Selección positiva de plantas transgénicas:	22
<b>2.3 ORGANOGENESIS</b>	<b>23</b>
<b>2.3.1 Factores intrínsecos de la planta</b>	<b>23</b>
<b>2.3.2 Factores extrínsecos</b>	<b>24</b>
<b>2.3.3 Reguladores de crecimiento y organogénesis</b>	<b>25</b>
<b>2.4 MEDIOS DE CULTIVO</b>	<b>26</b>
<b>2.4.1 Nutrientes Minerales</b>	<b>26</b>
<b>2.4.2 Compuestos orgánicos</b>	<b>27</b>
<b>2.4.3 Reguladores de crecimiento</b>	<b>27</b>
2.4.3.1 Auxinas	27
2.4.3.2 Citoquininas	28
<b>2.4.4 Agentes gelificantes o sistemas de soporte</b>	<b>28</b>
<b>2.5 ANTECEDENTES</b>	<b>29</b>
<b>2.5.1 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Passifloras</i></b>	<b>29</b>



2.5.2 Transformación genética en <i>Passifloras</i>	31
<b>3. METODOLOGIA</b>	<b>32</b>
<b>3.1 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN</b>	<b>32</b>
3.1.1 Población y muestra	32
3.1.2 Variables de estudio	32
3.1.3 Tratamientos	33
<b>3.2 METODOS</b>	<b>33</b>
3.2.1 Material vegetal:	33
3.2.2 Evaluación de diferentes concentraciones de kanamicina sobre discos de hoja de <i>P. mollissima</i> no infectados con <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	34
3.2.3 Mantenimiento de cepas	34
3.2.4 Transformación bacteriana	35
3.2.4.1 Establecimiento de células competentes	37
3.2.4.2 Conjugación triparental	37
3.2.4.3 Evaluación de la Transformación Bacteriana	38
3.2.5 Proceso de infección	38
3.2.5.1 Obtención y Desinfección de Explantes	38
3.2.5.2 Crecimiento y dilución bacteriana	39
3.2.5.3 Cocultivo	41
3.2.5.4 Establecimiento de los explantes	41
3.2.6 Evaluación de la transformación genética de <i>P. mollissima</i>	41
3.2.6.1 Determinación de la expresión del gen <i>npt II</i> en <i>P. mollissima</i>	41
3.2.6.2 Determinación de la integración del gen <i>npt II</i> en <i>P. mollissima</i>	42
3.2.6.3 Detección de la integración del gen $\beta$ - <i>gus</i>	42
<b>3.3 RECOLECCION DE LA INFORMACIÓN</b>	<b>43</b>
3.3.1 Regeneración de explantes	43
3.3.2 Transformación vegetal	43
<b>3.4 ANALISIS DE DATOS</b>	<b>43</b>
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>43</b>
<b>4.1 TRANSFORMACION BACTERIANA</b>	<b>43</b>
<b>4.2 EVALUACION DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE KANAMICINA SOBRE DISCOS DE HOJA DE <i>P. mollissima</i> no infectados con <i>Agrobacterium tumefaciens</i></b>	<b>44</b>
<b>4.3 EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS HORMONALES SOBRE LA ORGANOGÉNESIS DE DISCOS DE HOJA DE <i>Passiflora mollissima</i>.</b>	<b>46</b>
<b>4.4 EVALUACION DE LA TRANSFORMACIÓN GENETICA DE <i>P. mollissima</i></b>	<b>55</b>
4.4.1 Evaluación de la expresión del gen <i>npt II</i> en brotes de <i>P. mollissima</i>	55
4.4.2 Evaluación de la integración del gen <i>npt II</i> en plantas de <i>P. mollissima</i>	57

4.4.3 Evaluación de la expresión del gen $\beta$ -gus en plantas de <i>P. mollissima</i>	57
<b>5. DISCUSION</b>	<b>60</b>
<b>5.1 EVALUACION DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE KANAMICINA SOBRE LA REGENERACIÓN DE LOS DISCOS DE HOJA DE <i>P. mollissima</i> NO INFECTADOS CON <i>Agrobacterium tumefaciens</i></b>	<b>60</b>
<b>5.2 EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS HORMONALES EN LOS PROCESOS DE REGENERACIÓN VIA ORGANOGÉNESIS DE DISCOS DE HOJA DE <i>Passiflora mollissima</i></b>	<b>61</b>
<b>5.3 EVALUACION DE LA TRANSFORMACIÓN GENETICA DE <i>P. mollissima</i></b>	<b>65</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>68</b>
<b>7. RECOMENDACIONES</b>	<b>69</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>70</b>

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Proceso celular involucrado en la interacción <i>Agrobacterium</i> -planta.	17
Tabla 2. Promotores de transcripción mas usados.	22
Tabla 3. Tratamientos en los que se combinan diferentes concentraciones de kanamicina con reguladores de crecimiento	33

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Etapas implicadas en el proceso de transformación bacteriana.	36
Figura 2. Estructura del T-DNA del pBI 121.	36
Figura 3. Proceso de infección de discos de hoja para la transformación vía <b><i>A. tumefaciens</i></b>	40
Figura 4. Electroforesis de DNA plasmídico.	43
Figura 5. Efecto de la concentración de kanamicina en la regeneración de explantes de <b><i>P. mollissima</i></b> .	45
Figura 6. Cuantificación del número promedio de brotes por explante según el tratamiento.	48
Figura 7. Obtención de brotes de <b><i>P. mollissima</i></b> regenerados vía organogénesis	49
Figura 8. Cuantificación del número promedio de callos por explante según el tratamiento.	51
Figura 9. Obtención de callos de <b><i>P. mollissima</i></b> .	52
Figura 10. Número promedio de oxidación por explante según el tratamiento	54
Figura 11. Plantas transformadas en medio selectivo con 12.5 mg/l de kanamicina	56
Figura 12. Detección de la integración la integración del gen <i>npt II</i> en plantas de <b><i>P.mollissima</i></b>	59
Figura 13. Hojas de <b><i>P.mollissima</i></b> , con expresión del gen $\beta$ - <i>gus</i> , mediante tinción histoquímica.	59

## LISTA DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
ANEXO 1. TRATAMIENTOS	83
ANEXO 2. MEDIOS DE CULTIVO	84
ANEXO 3. PROTOCOLOS	85
ANEXO 4. FORMATO PARA LA TOMA DE DATOS	89
ANEXO 5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	90
ANEXO 6. PROMEDIOS DE REGENERACIÓN	97

## RESUMEN

La curuba (*Passiflora mollissima*), es una fruta apreciada tanto en el mercado nacional como en el internacional, por sus cualidades alimenticias y su agradable sabor. Teniendo en cuenta que es una especie susceptible de ser transformada genéticamente con *Agrobacterium tumefaciens*, es prioritario determinar las condiciones necesarias para la regeneración *in vitro* de esta planta. En este trabajo, se realizó la evaluación de diferentes concentraciones de citoquininas (Benzil-aminopurina y Kinetina) sobre la regeneración de plantas a partir de discos de hoja de *P. mollissima* infectados con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404, con el vector binario pBI 121. Como genes marcadores se utilizaron, el gen  $\beta$ -*gus*, que codifica para la enzima  $\beta$ -glucoronidasa y el gen *npt II*, que confiere resistencia a la kanamicina en los tejidos vegetales transformados.

De tal forma, fue posible obtener plantas transformadas con los genes marcadores, utilizando medio de cultivo Nitsch suplementado con 13.32 $\mu$ M/I y empleando cefotaxime 250 mg/l como antibiótico para controlar el crecimiento bacteriano. Los brotes iniciales, presentaron elongación del tallo y desarrollo de raíces al cultivarlos en un medio Nitsch sin reguladores de crecimiento.

Por otra parte, para determinar la transformación genética de *Passiflora mollissima*, se establecieron los brotes regenerados en medio de cultivo Nitsch con 12.5 mg/l de kanamicina donde se obtuvo un porcentaje de sobrevivencia de 34.9%, lo que indicó la expresión del gen *npt II*; adicionalmente se comprobó la integración de este gen en el genoma vegetal mediante PCR y visualización por medio de electroforesis. Así mismo, se verificó la expresión del gen  $\beta$ -*gus* mediante análisis histoquímico en las plantas sobrevivientes al medio selectivo con kanamicina.

Este trabajo se realizó en la Unidad de Biotecnología Vegetal, adscrita al Departamento de Biología de Pontificia Universidad Javeriana.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las **Passifloras** son conocidas a nivel mundial por sus propiedades medicinales, ornamentales y alimenticias (Andean Community, 1998). En Colombia, se cultivan a nivel comercial el maracuyá y la granadilla; y de manera artesanal principalmente, la badea y la curuba (Jaramillo,1993).

Sin embargo, dada la gran demanda sostenida de estos productos a nivel internacional (Andean Community, 1998), se han ido extendiendo las áreas de cultivo, se ha mejorado el manejo técnico gracias a investigaciones sobre la fisiología y control de plagas y enfermedades; de igual forma, se han realizado trabajos de mejoramiento y manipulación genética (Jaramillo, 1993).

Existen un gran número de especies silvestres, que son importantes desde el punto de vista ecológico y genético ya que pueden ser utilizadas para mejoramiento de otras **Passifloras** con explotación económica (Escobar,1991; APS, 1998).

La curuba **Passiflora mollissima** H.B.K (Bailey), es apreciada en los mercados nacionales e internacionales, por su agradable sabor y por sus cualidades alimenticias fuente de Vitamina A y C; se consume en varias formas como refresco, pulpa, compota, Yogurt (Hansen, 1987;Arbeláez, 1957 en Caicedo y Gonzáles, 1997).

Desde 1990, Colombia abrió mercados internacionales para esta fruta que se exporta como materia prima en las industrias alimenticias de Europa y Estados Unidos. En los países tropicales del sudeste de Asia y América es ampliamente conocida, por lo que se consideran estos mercados como importantes objetivos para la exportación (Ibarra, 2002).

Sin embargo, hoy en día existen muchos problemas fitosanitarios en especial la antracnosis, que reducen la productividad de los cultivos de la curuba en Colombia (Falconi- Borja, 2001), por lo cual es prioritario desarrollar tecnologías que garanticen una producción rentable y permanente de esta fruta, dadas las posibilidades de mercadeo que existen.

La biología molecular, el cultivo de tejidos vegetales y la manipulación genética, constituyen un complemento a las técnicas convencionales de selección y mejoramiento con las que se ha logrado obtener variedades de interés en la agricultura, que exhiben características deseables en cuanto a producción y calidad de frutos (Ovalle, 1995).

El cultivo de tejidos vegetales y la transformación genética, brindan grandes posibilidades para la propagación y mejoramiento de individuos, ya que se pueden introducir genes para la resistencia a virus, como por ejemplo en *Passiflora edulis* (Hodson, 1999) y en cítricos (Gutiérrez-E, 1997). Igualmente, se han logrado mejorar características de producción y sabor, como por ejemplo en melones (Shetty *et al*, 1997) y manzanas (James *et al*, 1993) entre otros.

La transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, es considerada como una herramienta natural y eficiente para insertar DNA foráneo en plantas (Zupan y Zambryski, 1995; Galum y Breiman, 1998) Sin embargo, su éxito no solo depende de la incorporación del DNA en el genoma y su expresión, sino de la posibilidad de que se logren regenerar plantas completas a partir del tejido transformado que puedan ser propagadas fácilmente (Ovalle, 1995; Han, *et al*, 2000). Por lo tanto, el desarrollo de protocolos de regeneración *in vitro* es una condición necesaria para propagar plantas transformadas.

En el caso particular de la curuba, el protocolo desarrollado por Ovalle (1995) para la regeneración de brotes organogénicos a partir de discos de hoja, no resultó ser eficiente cuando se aplicó para explantes transformados con *Agrobacterium tumefaciens*, ya que no se obtiene un alto porcentaje de plantas regeneradas, hecho que refleja la necesidad de desarrollar una metodología, que disminuya el efecto negativo sobre la respuesta organogénica de los tejidos infectado de *P. mollissima*.

En respuesta a lo anterior, el objetivo general de este trabajo fue establecer un sistema de regeneración *in vitro* a partir de discos de hoja de *P. mollissima* infectados con *Agrobacterium tumefaciens*.

Con tal propósito, se plantearon como objetivos específicos: a) determinar la concentración de kanamicina apropiada para el proceso de selección del tejido vegetal transformado; b) evaluar 25 combinaciones de citoquininas (Benzil-



aminopurina y Kinetina) a diferentes concentraciones, junto con cefotaxime (250 mg/l) en medio Nitsch (1968), sobre la organogénesis a partir de discos de hoja de *P. mollissima*; c) determinar y verificar la expresión de los genes marcadores (gen *npt II* y gen  *$\beta$ -gus*), en las plantas regeneradas.

Los resultados, llevaron al establecimiento de una metodología eficiente que permite la obtención de plantas transformadas de *Passiflora mollissima* H.B.K (Bailey), con miras a obtener líneas mejoradas por manipulación genética como ya se ha logrado en otras *Passifloras*.

## 2. MARCO TEORICO Y REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 FAMILIA PASSIFLORACEAE

La familia Passifloraceae y su principal género, *Passiflora*, recibieron su nombre cuando los misioneros españoles en América, encontraron semejanzas en algunas estructuras de la flores de estas plantas (designadas flores de la pasión) con elementos de la crucifixión de Cristo. ( Vanderplank, 1996; Escobar, 1988).

Las plantas de esta familia son fanerógamas, dicotiledóneas, de hábitos de crecimiento trepador, bejucos o arbustos; sus hojas son alternas, sencillas o lobuladas; estípulas en ocasiones caedizas, que varían en su forma y tamaño, lo que constituye un carácter diagnóstico importante distintivo entre grupos de especies, junto con la presencia de nectarios en las hojas, peciolo o brácteas (Vanderplank, 1996). Tienen zarcillos caulino-foliales, flores axilares, actinomorfas, hermafroditas o unisexuales, receptáculos desarrollados en escudilla cóncava; sépalos de 3 a 5 libres, frecuentemente con apéndices dorsales; pétalos en igual número, libres en general y alternos con aquellos.

Entre la corola y el androceo se encuentra la “ corona”, localizada al borde superior del receptáculo floral al pie del perianto; el androceo se compone generalmente de cinco estambres alternipétalos que brotan de la base de la flor o se insertan en un androginóforo; ovario libre, 3-locular; frutos en baya, pocas veces capsulares, con numerosas semillas. (Barriga, 1992).

La familia Passifloraceae se ubica dentro del orden Violales (Cronquist,1981), y está cerca evolutivamente de las familias Flacourtiaceae, Malesherbiaceae, Turenaceae y Violaceae (Kolbe *et al* , 1979 en Escobar, 1988). También esta relacionada con las familias Cucurbitaceae y Loasaceae (Heywood, 1985). Se divide en dos tribus: Paropsieae, restringida a Europa y Passifloriae perteneciente a América Latina. (Wilde, 1971,1974 en Escobar, 1988).

Comprende entre 16 y 22 géneros y de 500 a 650 especies, 360 nativas de América y 40 de África (Cronquist, 1981; Escobar, 1991).

La distribución es casi exclusivamente tropical y subtropical. Se reportan dos géneros monotípicos en Nueva Guinea y Nueva Zelanda (Vanderplank, 1996) y la mayoría de sus especies habitan en África y Madagascar (Escobar, 1991; ICA, 1976); otras son nativas de América y Australia. Sin embargo, hay otras pocas en la zona templada, en el sureste de Inglaterra y en la región del Mediterráneo. (Cronquist, 1981). En América la familia cuenta con cinco géneros, dos de los cuales se encuentran en Colombia: El género *Tetrastylis*, con una especie en la región del Chocó y el género *Passiflora* del que se describen 10 subgéneros en el territorio nacional (Escobar, 1988).

Las *Passifloras* colombianas, habitan preferentemente en regiones templadas o moderadamente cálidas, y su mejor desarrollo se obtiene entre los 800 y 3.200 m.s.n.m. Entre las especies de clima cálido se destacan *P. edulis* var *flavicarpa* (maracuyá), *P. ligularis* (granadilla), *P. quadrangularis* (badea) y en clima frío *P. mollissima* (curuba) (ICA, 1976).

### 2.1.1 Género *Passiflora*

Es el género más grande de la familia, está constituido por cerca de 400-500 especies, la mayoría endémicas del continente americano. En Colombia dadas las características geográficas y climáticas, se encuentra el mayor número de especies de este género, distribuidas desde el nivel del mar hasta los subpáramos, y desde el bosque pluvial hasta las zonas semi-áridas de la Guajira (Escobar, 1988).

El hábito de crecimiento es tipo lianas, enredaderas herbáceas con zarcillos axilares, o árboles. Algunas pocas especies son arbustos bajos o rastreros. Presentan hojas alternas, simples o compuestas, pecioladas (con particular variación en sus formas, incluso dentro de un mismo individuo), generalmente con nectarios extraflorales sobre la lámina o superficie adaxial del pecíolo. Inflorescencias axilares simples u ocasionalmente compuestas; 3 brácteas grandes y foliáceas en la base del hipanto o pequeñas y esparcidas sobre el pedúnculo. Los pedúnculos sostienen una sola flor, los sépalos y los

pétalos pueden estar fusionados en algunas especies formando un receptáculo tubular, que en casi todas las especies termina con una o dos filas de filamento formando una corona, semillas reticuladas o con estriaciones transversales. Sus frutos son una baya o cápsula translúcida (Escobar, 1988; Heywood, 1985; Cronquist, 1981).

Aproximadamente, 60 especies son comestibles, entre ellas se destacan *P. edulis* Sims (maracuyá), *P. edulis* var. *flavicarpa* Degener, *P. ligularis* Guss (granadilla), *P. mollissima* H.B.K. Bailey (curuba), *P. cuadrangularis* L (badea), *P. laurifolia*, y aunque otras no son muy conocidas son de gran importancia, ya que exhiben una gran variabilidad genética y características útiles para el mejoramiento de especies domesticadas, tales como la resistencia a determinados patógenos. (Ferreira, 1991).

En Colombia, las especies que se cultivan a nivel comercial son el maracuyá, que se desarrolla bien desde los 400 hasta los 1.100 msnm , a temperaturas entre los 20 y 30°C (ICA, 1976), es considerado como la especie de mayor importancia económica, por su agradable sabor, la alta productividad y la resistencia a ciertos patógenos como el *Fusarium* (Ferreira, 1991). En segundo lugar se encuentra la granadilla, que es cultivada entre los 1.500–2.500 m.s.n.m; una fruta destacada por su fácil manipulación en procesos de post-cosecha (ICA, 1976), y caracterizada por la difícil hibridación para su mejoramiento genético (Escobar, 1991).

La curuba por su parte, cultivada en altitudes superiores a 1.500 m.s.n.m. en adelante, es una fruta de gran demanda en el mercado nacional y en el internacional . La badea se cultiva desde el nivel del mar, hasta los 1.400 m.s.n.m., y los mejores rendimientos se obtienen en regiones cálidas 90% de humedad atmosférica, requiere un terreno fértil y es bastante exigente en materia orgánica, además es la especie de *Passiflora* que produce el fruto comestible más grande (ICA, 1976).

En los países europeos principalmente, las *Passifloras* son utilizadas como plantas ornamentales, tal es el caso de *P.raddiana* D.C, *P.pieturata* Ker, *P.caeurulea* (Ferreira, 1991).

También son reconocidas por sus propiedades medicinales, entre las que se cuentan la acción antiespasmódica de las raíces de ***P.foetida*** y la acción diurética de ***P.pulchella*** (Ferreira, 1991). Actúan como antiescorbútico, antihelmíntico, antipirético, control del asma y la disentería (Heywood, 1985; Vanderplank, 1996). Contienen pasiflorina que es un alcaloide que posee funciones letárgicas (Vanderplank, 1996).

A nivel taxonómico, actualmente se reconocen los subgéneros ***Tacsonia***, ***Murucuja***, ***Astrophea***, ***Decaloba***, ***Cieca***, ***Psilanthus***, ***Granadilla*** y ***Dysosmia*** (Vanderplank, 1996).

#### **2.1.1.1 Subgénero *Tacsonia***

Comprende entre 37 y 47 especies, originarias de los Andes. Se caracterizan por tener flores grandes hasta 17 cm de largo, sin fragancia (Escobar, 1991). De estas 21 se encuentran en Colombia y 15 nativas (Hodson y Cancino, 1992).

Son lianas, de hojas simples o compuestas (simples en las especies colombianas), enteras o trilobuladas, glabras o pubescentes; peciolo glandulares en la base adaxial; estípulas a veces deciduas, generalmente glandulares en los márgenes. Flores solitarias en axilas foliares, pedunculadas con 3 brácteas foliáceas en la base del hipanto, pedúnculos generalmente delgados llevando flores péndulas, hipantos cilíndricos en las especies colombianas, más largos que los sépalos (Escobar, 1988). Tubo floral largo, 3, 5 u 8 pétalos y sépalos libres, ovario unilocular formando 3 carpelos, 3 estigmas y 5 estambres sobre un androginóforo (Escobar, 1991). Los frutos son bayas con pericarpio blando, coriáceo o de consistencia frágil, generalmente de color amarillo al madurar, presenta semillas numerosas de forma ovada, comprimidas lateralmente, de color café oscuro al madurar, con arilos blancos o anaranjados (Escobar, 1998).

El subgénero ***Tacsonia*** incluye, ***P. mollissima*** (**Curuba de castilla**), ***P. tripartita*** (**Curuba quiteña**, también conocida como **Curuba india**) de valor comercial, pero con frutos de menor sabor y aroma. ***P. cumbalensis*** Karst que difiere de ***P. mollissima*** en la forma de la hoja, las flores azules o púrpuras y el

fruto de color rojo. *P. antioquiensis*, nativa de Colombia, crece a alturas mayores que *P. mollissima*, el color del fruto va de amarillo a rojo. *P. mixta* (**Curubito indio**) con indumento gris fruto de color verde aún al madurar (Hodson y Cancino, 1992). Finalmente, *P. pinnatitispula*, un bejuco ornamental de grandes flores rosado-violáceas y una fruta comestible (Uribe, 1940).

### **2.1.2 *Passiflora mollissima***

#### **2.1.2.1 Distribución**

La curuba, es cultivada en los Andes desde Venezuela hasta Bolivia, entre los 2.000 y 3.600 m.s.n.m.; y desde México hasta el norte de Argentina (Escobar, 1991; Jaramillo, 1993; Hansen, 1987), también ha sido introducida a Francia, Nueva Zelandia, Nueva Guinea, India, Sri Lanka y Kenia (Caicedo y Gonzalez, 1997). En Colombia se encuentra principalmente en la cordillera oriental. Su cultivo se encuentra ampliamente extendido en los departamentos de Boyacá (Santa Sofía, Duitama, Zetaquirá y Nuevo Colón), Cundinamarca, Valle, Nariño, Cauca, Tolima, Antioquia, Caldas y Santander. (Hansen, 1987). Cundinamarca y Boyacá tienen el 82% del total del cultivo (1.929 Hectáreas) y el 18% restante (423 Hectáreas) se encuentra repartido en los departamentos anteriormente nombrados (Mejía, 1988 Citado por Hodson y Cancino, 1992)

#### **2.1.2.2 Sinónimos**

Se conoce vulgarmente como: **Tacso**, **Tumbo** en Perú y Bolivia, Curuba en Colombia y **Parcha** en otros países. (Escobar, 1988). En inglés se denomina **Banana Passion Fruit** (Hansen, 1987; Vanderplank, 1996).

Según Romero (1991), los sinónimos de *P. mollissima* son:

***Murucuja mollissima*** Spreng.

***Passiflora tomentosa*** Lam.

***Passiflora tomentosa*** var. ***mollissima*** Tr.& Pl.

***Tacsonia mixta* sp. *tomentosa* Mast.**

***Tacsonia mollissima* var. *glabrescens* Mast.**

***Tacsonia mollissima* H.B.K.**

### **2.1.2.3 Taxonomía**

Según Mazzani, *et al.*, 1999:

Clase: Dicotyledoneae

Subclase: Archiclamydeae

Orden: Violales

Suborden: Flacourteiineae

Familia: Passifloreace

Género: ***Passiflora***

Subgénero: ***Tacsonia***

Especie: ***Passiflora mollissima* H.B.K. Bailey.**

### **2.1.2.4 Botánica**

Es una planta enredadera que se caracteriza por ser pubescente, con tricomas rectos u ondulados, transparentes, amarillos-verdosos o incoloros, con una longitud promedio de promedio de 0,4 - 1 mm de largo; los tallos son cilíndricos, estriados, con hojas agudas en las puntas, partidas en tres lóbulos ovoides, acorazonadas en la base, aserradas en las márgenes, coriáceas, con tricomas en ambas superficies; estipulas reniformes; con zarcillos que se originan en la base del pecíolo de la hoja, pedúnculos largos, brácteas ovadas, agudas en el ápice, redondeadas en la base formando un tubo sobre el hipanto (Escobar, 1988).

Las flores son péndulas, con hipantos cilíndricos, sin vellosidades, de color verde pasando a color rosado hacia el ápice en la superficie abaxial, blancas en la superficie adaxial. En la superficie interior, tiene una corona reducida a un anillo morado con crestecillas blancas. Los pétalos son rojos, oblongos, el ápice obtuso. 5 estambres soldados en casi toda su longitud; anteras

oblongas, dorsimedifijas, cremas, polen amarillo, ovario verde, oblongo, tomentoso. 3 estilos, amarillo-crema y 3 estigmas verdes y frutos oblongos u ovoides, de 6-11 cm de largo, 3-4,5 cm de ancho, con pericarpio coriáceo o blando, amarillo al madurar y muy suave al tacto con aroma atractivo. Semillas ovadas, de 6 mm de largo y 4,5 mm de ancho, con arilo anaranjado, ácido y jugoso (Escobar, 1988; Romero, 1991; Uribe, 1940).

**Caracteres diagnósticos:** Frutos oblongos, con pericarpio blando, de color amarillo al madurar, características que distinguen a *P.mollissima* de todas las especies menos de *P.tripartita* (Escobar, 1988).

### 2.1.2.5 Importancia económica

Los países productores son Colombia, Brasil, Ecuador, Venezuela, Bolivia, Perú, Nueva Zelanda, Sudáfrica Kenya; entre otros. Actualmente se considera a la planta como maleza de difícil control en el sur de Nueva Zelanda y Hawaii, donde alcanza un tamaño que supera a las plantas nativas (G. Morales. Ministerio de Agricultura. Com. Pers.).

Para el año 2000 en el país se había establecido una superficie aproximada de 2.448 hectáreas de cultivo de curuba, cuyo rendimiento es de aproximadamente 28.206 toneladas métricas, siendo los principales departamentos productores Boyacá, Cundinamarca y el norte de Santander (G. Morales. Ministerio de Agricultura. Com. Pers.).

Los principales mercados para la pulpa colombiana son Estados Unidos y Europa, donde se utiliza para la elaboración de helados, mermeladas, jaleas, cocktails y yogurt. Estos mercados son los principales importadores a nivel mundial. Los países europeos mas representativos en la importación de esta fruta son Dinamarca, Suecia y España. El precio de importación de fruta fresca a la unión europea osciló entre 4.7 y 5 US /Kg en el 2000 (Ibarra, 2002).



### 2.1.2.6 Aspectos agronómicos

El ciclo de vida de la plantación oscila entre 4 y 10 años; florece a partir del mes trece y tiene cosecha cada tres meses. La productividad anual es de 10 a 25 T/ha/año (Hansen, 1987).

**-Clima:** Es propia de climas fríos, en Colombia se cultiva a una altura que oscila entre los 1700 y 2400 m.s.n.m., a una temperatura promedio de 12 a 18 ° C, con una humedad relativa de promedio de 70% y un régimen de lluvias de 1500 a 1800 mm/año (Hansen, 1987).

Ya que es una planta originaria de las zonas tropicales, la curuba es sensible a la luz solar. Cuando se desarrolla en zonas de páramo sobre los 3000 m.s.n.m., donde hay una alta nubosidad, la curuba vegeta pobremente produciendo frutos pequeños y de maduración tardía (ICA, 1976).

**- Suelos:** Los suelos más recomendados para el cultivo de la curuba son los de textura franco-arcillosa o franco- limosa, con buen drenaje interno, un pH ligeramente ácido 5.0 –6.5 , una profundidad efectiva mínima de un metro y una pendiente máxima del 65 %.

**-Propagación:** Para obtener plantas puede utilizarse semillas (Salazar, 2000) o propagación vegetativa o asexual (ICA, 1976).

En la actualidad se recomienda la escarificación mecánica, ya que con ácido clorhídrico al 1%, no hay cambios en la velocidad de germinación; además de la adición de sustancias promotoras, cosecha de frutos maduros cuando el mucílago esté anaranjado y el remojo (ICA, 1976).

Para la propagación vegetativa, puede utilizarse ramas de 10 o más cm de longitud, haciendo un corte recto y exponiéndolas a agua lluvia. Se desarrolla un callo y posteriormente raíces en aproximadamente treinta días (ICA, 1976).

**- Siembra:** El semillero puede hacerse directamente en el sitio definitivo de siembra, o puede trasplantarse cuando las plántulas tengan aproximadamente 30 cm de longitud, siendo este último un buen método para evitar pérdidas en el material y seleccionar plantas vigorosas y sanas. El trazado consiste en un sistema rectángulo, a cinco metros entre plantas y a dos metros entre surcos. Los

hoyos se hacen de 30x30x50 cm, cuidando de separar para uso posterior la tierra obtenida de los primeros 29 cm (Jaramillo, 1957; ICA, 1976).

**-Mantenimiento del cultivo:** Para sostener las plantas se utiliza el método de espaldaderas de alambre desarrollado por Escobar, 1957, el cual facilita las labores indispensables como la poda, la aspersion para el control de plagas y enfermedades y la recolección de los frutos.

Por otro lado, deben incluirse podas en diferentes etapas del cultivo, ya que esta es necesaria en especies frutículas, perennifolias como es caso de la curuba, para que la enredadera permanezca muchos años con alta productividad, ya que se eliminan ramas improductivas, además de disminuirse la infección por hongos ( Caicedo y Gonzáles, 1997).

- **Plagas:** Es atacada principalmente por insectos chupadores, que lesionan las hojas y los frutos, también se pueden presentar insectos masticadores, (Jaramillo, 1957), nematodos, ácaros, esqueletizadores de hojas, chinches, entre otros (Pacheco *et al.* 1988;Caicedo y Gonzáles, 1997).

Las aves también representan una plaga aunque en menor proporción que las anteriores, estos animales ocasionan daños en las plantas, cuando el fruto esta en un grado de madurez avanzado (Pacheco, *et al.*, 1988).

Los Barrenadores, son un grupo de gran importancia y están representados por varias especies de insectos. Los insectos mas importantes son: Los coleópteros ***Heterachthes sp.*** y ***Nyssodrys sp.*** y dentro del los lepidópteros ***Aegeriidae***, ambos grupos atacan las hojas y el tallo. El daño en los botones florales lo producen los lepidópetos ***Pyrausta porelegans*** y ***Syllepsis sp*** (Jaramillo, 1993).

Los Chupadores, incluyen los insectos y los ácaros. Dentro de los primeros se destaca ***Selenaspidus articulatus*** que succiona la savia en el tronco y las hojas (Caicedo y Gonzáles, 1997); el ácaro ***Tetranychus sp.*** causa amarillamiento de las hojas y decoloración de los frutos cuando los ataca directamente y las arañitas rojas ***Tetranychus telarius*** que perforan la lámina foliar y chupa la savia (ICA,1976).

Los trips también son una plaga de importancia porque causan grandes daños, se localizan en la parte interna de la prolongación del tallo, en donde raspa para luego tomar las secreciones jugosas (Pacheco, *et al.*, 1988).

Otras plagas conocidas son: ***Agralis vanillae*** que ataca las hojas de casi todas las ***passifloras***, principalmente al maracuyá, la granadilla y la curuba y el **esqueletizador del curubo *Dione juno***, que también consume la lámina foliar y sólo en ataques fuertes causa daños en hojas y frutos. Igualmente se reportan nemátodos como ***Meloidogyne sp.*** que ataca las raíces (Jaramillo, 1993).

**-Enfermedades:** La principal enfermedad que se presenta en la curuba es la antracnosis producida por un hongo ***Colletotrichum gloesporioides*** Penzin que afecta los frutos (Falconi-Borja, 2001).

Otras enfermedades fungosas son la llamada ***Mancha parda*** o ***Mancha de la hoja***, también muy común en cultivos de ***Passifloras***, el agente causal es la ***Alternaria passiflorae***; se manifiesta en las hojas inicialmente.

También se conocen la **roña del fruto** o **costras** cuyo agente causal es un hongo denominado ***Cladosporium herbarum***, que ataca el fruto. Igualmente fungosa se reporta el **moho gris**, causado por la ***Botrytis cinerea***, ataca la planta desde los frutos hasta las raíces. Igualmente, se destacan el Oidio, causado por el hongo ***Erysiphe polygoni***, que ataca las hojas y ***Phylostica spp*** que se presenta generalmente en frutos maduros (Falconi-Borja, 2001).

## **2.2 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE CELULAS VEGETALES MEDIADA POR *Agrobacterium tumefaciens***

En las plantas además de ser posible combinar una parte o la totalidad del genoma por fusión de protoplastos, es posible introducir directamente uno o pocos genes por medio de la técnica conocida como ***transferencia de genes específicos***, que puede ser de manera indirecta o directa, según si se utiliza o no un vector de transformación (Lindsey y Jones, 1989; Galum y Breiman, 1998).

Los métodos de transformación genética directa, son aquellos en los que se introducen genes con elementos *cis*- reguladores en las células de las plantas.

En este grupo de métodos directos se encuentran tratamientos químicos, electroporación de protoplastos, micro-inyección de DNA en el núcleo de las plantas, macro- inyección de DNA para meristemas empapados, bombardeo de partículas de DNA recubiertas con tungsteno (Galum y Breiman, 1998; Walter y Gingold, 1997).

Dentro de los indirectos, se utiliza un vector que porte el gen de interés que quiere ser transferido, el vector más comúnmente utilizado es *Agrobacterium tumefaciens*, una bacteria que tiene la habilidad de transferir un segmento de DNA (T-DNA) y mediante manipulación genética puede ser modificado para introducir los genes de interés en las células vegetales (Zupan y Zambryski, 1995; Chilton, 1983). Aunque es un método eficiente, no es excluyente, ya que puede usarse en combinación con otros directos, como lo describen Cordero *et al.*, (1999) quienes transformaron plantas de fresa combinando la técnica biolística y la infección con *Agrobacterium*.

A pesar de que un gran número de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas pueden ser transformadas por métodos directos que han sido bien desarrollados (Shillito, *et al.*, 1985) muchas veces son altamente genotipo-dependientes para el cultivo de tejidos; mientras que en el otro tipo de transformación (indirecta), el cultivo de células y la regeneración de plantas tienen una aplicación más general, además que se reduce el número de copias en los transgenes, llevando potencialmente a pocos problemas de cosupresión e inestabilidad. Adicionalmente, no se forman mosaicos de plantas, como es frecuente cuando se usa la transformación directa (Enríquez, *et al.*, 1998).

*Agrobacterium tumefaciens*, es un patógeno natural del suelo, que en condiciones naturales produce la llamada **agalla de corona** en un gran número de especies de plantas dicotiledóneas. Esta bacteria induce la formación de un tumor oncogénico, porque las células infectadas son transformadas y adquieren la capacidad de sintetizar auxinas y citoquininas en cantidades elevadas (Zupan y Zambryski, 1995; Chilton, 1983).

Es una bacteria Gram negativa que en el medio de cultivo produce colonias circulares, lisas y cremosas, es móvil con flagelos peritricos cuya temperatura óptima de crecimiento son los 32°C; está estrechamente relacionada

con *Agrobacterium rhizogenes*, que infecta los tejidos lesionado e induce la formación de raíces, ocasionando la **enfermedad de las raíces peludas** (Lindsey y Jones, 1989; Dessaux *et al*, 1998).

### 2.2.1 Plásmido inductor de tumores:

Tanto *A. rhizogenes*, como *A. tumefaciens*, cuentan con un megaplásmido (mayor a 200kb) llamado plásmido Ti o Ri que induce tumores en las plantas infectadas (Zupan y Zambryski, 1995). El plásmido Ti, es clasificado de acuerdo con las opinas, que son producidas y excretadas en los tumores que induce (Hooykas y Schilperoot, 1992; Grierson y Covey, 1991).

Estas opinas, son derivados de aminoácidos poco frecuentes; la síntesis de opinas es una característica única de las células tumorales; los tejidos de las plantas normales no sintetizan estos compuestos. Se reconocen dos grupos: la familia de las octopinas, cuyo plásmido es de 194 kb y la familia de las nopalinas con un plásmido de 213kb (Hooykaas *et al.*, 1994); aunque se han identificado otros compuestos relacionados, que son derivados dicarboxipropílicos de la arginina (Grierson y Covey, 1991; Dessaux *et al*, 1998).

Un segmento de este plásmido Ti se integra al DNA de las células de las plantas, y consecuentemente las transforma (Zupan y Zambryski, 1995; Chilton, 1983), este segmento es el llamado T-DNA.

El fragmento de T-DNA, está definido y delimitado por 25 bp, con repetición en cada uno de sus bordes (cuando el borde izquierdo es retirado, hay pocos efectos, pero si se retira el borde derecho no hay transferencia) (Zambryski, 1992; Galun, 1998; Zupan y Zambryski, 1995).

El uso de vectores binarios, ha demostrado que obviamente la distancia física de genes no selectivos del borde izquierdo del T-DNA, puede proteger eficientemente contra rearrreglos y duplicaciones ocurridos durante la integración del DNA en el cromosoma de la planta por recombinación ilegítima, esto puede explicar porque el tipo de secuencia del borde izquierdo no es decisiva, en contraste con la del borde derecho. En medio de este segmento de transferencia se encuentran genes que a diferencia de los demás del plásmido, poseen la caja

TATA y la caja CAT, permitiéndoles ser transcritos por la RNA *pol II* de la planta (Grierson y Covey, 1991; Porsch, **et al.**, 1998).

Además de llevar genes para la síntesis de opinas, el T-DNA es portador de genes para auxinas y citoquininas. Los tres tipos de genes tienen una secuencia de tipo regulador *cis* en la planta y no están activos en la bacteria (Galum y Breiman, 1998). De esta manera, una producción elevada de auxinas y citoquininas en las células transformadas, tiene como consecuencia una alta actividad mitótica y la formación de un tumor (Grierson y Covey, 1991; Johnson, **et al.**, 1998).

Otro fragmento del T-DNA, contiene la región de virulencia en donde se encuentran los genes *vir* (Tabla 1), esta región es de aproximadamente 30 kb y está organizada en seis operones, *vir A*, *vir B*, *Vir D* y *Vir G* esenciales para la transferencia del T-DNA y *vir C* y *vir E* que incrementan la eficiencia de la transferencia (Hooykas y Schilperoot, 1992; Zupan y Zambryski, 1995; Johnson, **et al.**, 1998).

**Tabla 1. Procesos celulares involucrados en la interacción *Agrobacterium*-planta.**

Proceso celular	Integración <i>Agrobacterium</i> -célula vegetal	Proteínas de <i>Agrobacterium</i> involucradas en el proceso
Reconocimiento célula célula	Unión de <i>Agrobacterium</i> a los receptores de superficie de la célula hospedera	ChvA, ChvB, Att
Señal de transducción	Reconocimiento de las moléculas señal vegetales y a vía de transporte del T-DNA	ChvE, vir A, vir G, (P21,P1) <sup>b</sup>
Actividad transcripcional	Expresión de genes vir después de la fosforilación del activador transcripcional	vir G
Metabolismo del DNA conjugativo	Corte de los bordes del T-DNA, y movilización de la copia de cadena sencilla transferible del T-DNA (hebra-T)	vir D1, vir D2, vir C1, (virD3)
Transporte intercelular	Formación del complejo- T proteína-DNA; formación de un canal transmembranal; salida del complejo-T hacia el citoplasma de la célula vegetal receptora	vir E2, vir E1, vir D2, vir D4, vir B4, vir B7, vir B9, vir B10, vir B11,( vir B1, otras proteínas (vir B)
Importación nuclear	Interacción con receptores SLN de la célula receptora y transporte del complejo-T a través del poro nuclear	vir D2, vir E2
Integración del T-DNA	Integración dentro del genoma de la célula vegetal; síntesis de la segunda hebra del T-DNA.	Vir D2, vir E2

Las proteínas con una función propuesta, pero no comprobada aparecen entre paréntesis. Las proteínas *vir B* están involucradas en la formación de un canal transmembranal y posiblemente en la exportación del complejo-T. Tomado de Sheng y Citovsky, 1996.

### 2.2.1.1 Proceso de infección

#### - Activación de la región *vir*:

Una fase inicial de la interacción, es la unión de *Agrobacterium* a las células vegetales heridas. Este proceso está controlado por dos loci de virulencia de *Agrobacterium*: *chvA* y *chvB*, que están localizados en el cromosoma bacteriano y no en plásmido Ti. Los genes de estos dos loci están constantemente expresados en las células de la bacteria y son constitutivos. Los productos de estos genes solo pueden promover la unión cuando *Agrobacterium* está en la proximidad de células vegetales heridas (Grierson y Covey, 1991; Dye, *et al.*, 1997).

La transferencia del T-DNA, está mediada por productos codificados por 30-40 kb de la región *vir* del plásmido Ti. *Vir A*, es un sensor dimérico transmembranal que detecta los compuestos fenólicos secretados por las plantas cuando sufren una herida, (Zupan and Zambryski, 1995; Zambryski, 1992) los signos para su activación incluyen, pH ácido, compuestos fenólicos y acetoseringona ( Winans, 1992; Baker *et al.*, 1997); estos mecanismos involucran fosforilación de proteínas, para que se active *vir G*, que activa y regula la expresión de los demás genes *vir* cuando es fosforilado por *vir A* ( Zambryski, 1992).

La activación del sistema *vir*, depende de factores externos como la temperatura y el pH. En temperaturas mayores a 32°C, los genes *vir* no se expresan porque hay un cambio conformacional en la estructura de *vir A* que induce la inactivación de sus propiedades (Jin, *et al.*, 1990; Kalogeraki, *et al.*, 1998).

#### -Complejo de transferencia del T-DNA:

Como el T-DNA se encuentra flanqueado por dos secuencias cortas de nucleótidos, al ser reconocidos por *vir D*, experimentan una ruptura en una de las hebras del DNA. Esta hebra a la que la nucleasa *vir D* queda unida, es



transferida a la célula vegetal protegida por una proteína codificada por **vir E2**, a través de un canal. La cadena se dirige al núcleo y se integra al genoma de la planta. El sistema transfiere cualquier DNA que se encuentre a la izquierda del borde derecho sustituyendo al DNA oncogénico (Zambryski P. 1992; Azcon y Talon, 2001; Lee, *et al.*, 1999).

### **-Integración del T-DNA en la planta:**

Una vez es transferido al núcleo de la planta el T-DNA, es integrado en una o varias copias (Zupan y Zambrynsky, 1995). Aunque el mecanismo de la integración no ha sido totalmente dilucidado, se cree que la integración ocurre por una recombinación ilegítima. De acuerdo con este modelo, se requieren pares de pocas bases para un *pre-annealing* entre el T-DNA que lleva **vir D2** para la ligación y el DNA de la planta. Así, ocurren una serie de rupturas dentro del DNA de la planta que dan lugar a la integración del DNA foráneo en su genoma. Los sitios de inserción en el genoma de la planta, están determinados por regiones en las que se encuentran repeticiones invertidas (Madigan, *et al.*, 1997). Finalmente, la torción que se produce, activa los mecanismos de reparación de las células vegetales, y la cadena complementaria es sintetizada usando el injerto de T-DNA que quedó en la cadena molde (Tinland, *et al.*, 1995).

## **2.2.2 Manipulación genética de células vegetales usando *Agrobacterium tumefaciens***

### **2.2.2.1 Vectores Binarios**

Para el uso de ***Agrobacterium*** como vector en los procesos de transformación genética, se utilizan plásmidos desarmados a los que se les han suprimido los oncogenes, es decir, el T-DNA se transfiere pero ya no se induce la proliferación celular (Galum y Breiman, 1998).

Es necesario para una buena manipulación de los plásmidos que estos sean pequeños, pero como ***A. tumefaciens***, contiene un megaplásmido se debe

construir un T-DNA, para lo cual se pueden construir dos tipos de vectores: co-integrativos y Binarios.

En los primeros, el T-DNA, es retenido en el plásmido Ti, pero no se pueden replicar directamente en *Agrobacterium* y sólo son posibles de mantener si ocurre recombinación entre las secuencias homólogas presentes en el vector y en el plásmido Ti aceptor, esto resulta en la formación de un co-integrado. En el sistema de vectores binarios, se cuenta con dos plásmidos, se parte de un plásmido recombinante, que pueda ser clonado en la enterobacteria *E.coli*, en el que se ha introducido un fragmento de T-DNA. El plásmido recombinante se rompe y se abre por un punto del T-DNA, utilizando una endonucleasa de restricción. En la abertura se introduce el fragmento de DNA que se quiere transferir, este es bipartito, es decir, tiene un gen foráneo que se desea introducir en la planta y unido a él, un marcador genético. El plásmido combinado se vuelve a clonar en otro mayor, que se introduce en la cepa de *E.Coli* (Chilton, 1983).

La segunda parte, es un plásmido **ayudador**, que está en el plásmido Ti de *Agrobacterium*, porta los genes de la región *vir* requeridos en trans para que pueda ocurrir el proceso de infección (Galum y Breiman, 1998). Estos derivados del plásmido Ti, desprovistos de los oncogenes se llaman plásmidos desarmados (Azcon y Talon, 2001).

En general, estos vectores son largos (usualmente más de 10 kb), lo que sigue siendo un problema para la manipulación *in vitro*; además por su tamaño ofrecen menos sitios únicos de restricción para ser clonados, por eso ahora se está probando la construcción de *mini vectores binarios*, ya que se ha demostrado que se puede eliminar por medio de endonucleasas secuencias no esenciales, e incluir sitios únicos de restricción (Xiang, 1999).

#### **2.2.2.2 Expresión de genes transferidos**

La expresión de genes foráneos en una planta transformada con *Agrobacterium*, puede estar controlada por promotores constitutivos (Graham, *et al.*, 1998) o por promotores específicos o inducibles (Barton y Dracup, 2000).

Dentro de este grupo de promotores constitutivos (tabla 2), se incluyen los **pocs** y **pnos** de los genes del T-DNA de octopina y nopalina, respectivamente, y los de tipo viral como el 19S y el 35S del virus mosaico del coliflor (CaMV) (Graham, *et al.*, 1998).

Particularmente, el promotor CaMV 35S, es muy utilizado ya que se caracteriza por un mayor y más estable nivel de expresión que los promotores de opinas, hecho que se traduce en un incremento en la eficiencia de los genes marcadores reporteros y de selección (Orozco y Narváez, 1994).

Por otro lado, los promotores específicos (tabla 2) pueden determinar la expresión del DNA foráneo en ciertos tejidos; de esta forma se restringe esta expresión a raíces, hojas u otras áreas en donde es deseada (Lai y Lai, 1993), o pueden ser inducidos durante el ciclo de vida de la planta; así, ciertos promotores responden a señales químicas, estrés hídrico, temperatura, daño mecánico y luz entre otros. Por ejemplo, un promotor inducible con la luz es del gen **cab**, que codifica para la mayoría de las proteínas de la clorofila a/b (Barton y Dracup, 2000).

Además de los promotores, se incluyen secuencias de terminación de la transcripción, que pueden ser como la del gen nopalina sintetasa del T-DNA de **Agrobacterium**.

Adicionalmente, los plásmidos portan sitios de corte para enzimas de restricción, este conjunto debe ser insertado entre secuencias borde del T-DNA (Grierson y Covey 1991; Graham, *et al.*, 1998).

**Tabla 2. Promotores de transcripción mas usados. Tomado de Lindsey y Jones, 1989.**

<b>Promotores constitutivos</b>	<b>Fuente</b>
nos	Nopalina sintetasa
Ocs	Octopina sintetasa
Man	Manopina sintetasa
19S y 35S de CaMV	Virus del mosaico del coliflor
<b>Promotores específicos de tejido</b>	<b>Tejido en el que se expresa</b>
$\alpha$ -amilasa	Aleurona
Glutenina	Endospermo
B-hordeína	Endospermo
Patatina	Tubérculo
Faseolina	Cotiledón
Conglicina	Cotiledón

### 2.2.2.3 Selección positiva de plantas transgénicas:

En contraste con la selección tradicional en la que las células transformadas adquieren la habilidad de sobrevivir en un medio selectivo y las no transformadas son eliminadas (selección negativa), en la selección positiva los genes marcadores confieren a las células transformadas la capacidad de metabolizar algunos compuestos que naturalmente no son metabolizados (Gallego *et al*, 1999).

Joersbo & Okkels (1996), describen el uso del gen de la  $\beta$ -glucoronidasa (*gus*) como gen selectivo (a la vez es marcador). En este sistema, el agente selectivo es un glucorónido derivado de la benziladenina (benziladenina N-3-glucorónido) que es inactivo como citoquinina. En hidrólisis con *gus*, la actividad de la citoquinina es liberada estimulando la regeneración de las células transformadas mientras que las células no transformadas detienen su desarrollo.

Igualmente, se ha utilizado el gen *man*, que codifica para la enzima fosfomanosa isomerasa (PMI), aislada de *E.coli*. El PMI en las células transformadas en presencia de manosa convierte la manosa-6-fosfato en fructosa-6-fosfato que puede ser inmediatamente incorporada en el metabolismo celular. Generalmente, cuando la manosa es adicionada al medio de cultivo se acumula y el crecimiento vegetal se ve disminuido en células no transformadas (Joersbo, *et al*, 2000).

Los marcadores auxotrópicos también se incluyen dentro de la selección positiva. En las plantas las mutaciones auxotróficas que requieren suplementos

nutricionales son inusuales y solo en pocos casos pueden ser fácilmente propagadas. Consecuentemente, la complementación de mutantes auxotrópicos por transformación con un gen funcional se ha reportado, aunque muy pocas veces. Por ejemplo, mutantes de *Nicotiana plumbaginifolia*, deficientes en treonina deshidratasa, requieren isoleucina para su desarrollo; estos mutantes fueron complementados por transformación con el gen *ILV1* que codifica para la enzima deficiente (treonina deshidratasa), los transformantes fueron seleccionados en medio sin isoleucina sobreviviendo sólo los que habían incorporado el gen *ILV1* (Bowen, 1993).

## 2.3 ORGANOGENESIS

La regeneración de plantas a partir de cultivo de tejidos puede realizarse por vías como la organogénesis y la embriogénesis somática. La organogénesis incluye tanto rizogénesis como caulogénesis ( Azcon y Talon, 2001).

La embriogénesis somática se define como el proceso mediante el cual se logra el desarrollo de embriones a partir de células que no son el producto de una fusión gamética. Entre los criterios que se consideran para reconocer la inducción embriogénica *in vitro* , se considera la organización de estructuras bipolares, que presentan cierta individualidad respecto al tejido original (Carman, 1990; Azcon y Talon, 2001).

La organogénesis conduce a la diferenciación de meristemos caulinares y/o radicales. La inducción de organogénesis *in vitro* depende de múltiples factores que se pueden clasificar en:

### 2.3.1 Factores intrínsecos de la planta

La versatilidad de distintas especies e incluso cultivares dentro de la misma especie, pone de manifiesto la influencia que el genotipo ejerce sobre la respuesta organogénica *in vitro*. El control genético de la organogénesis, es el resultado de la función celular y del control génico, correlacionado con el funcionamiento de la población celular. Aunque todas las células de una misma

planta presentan el mismo genotipo, la capacidad para desencadenar un tipo de respuesta difiere, esto es lo que se denomina competencia celular. La determinación puede ser modificada por factores extrínsecos que pueden afectar la competencia celular y por consiguiente la capacidad de respuesta morfogénica (Christianson y Warnick, 1988; Azcon y Talon, 2001).

El desarrollo potencial de un tejido es restringido como consecuencia de la determinación. Los explantes de hoja pueden continuar su desarrollo cuando son cultivados en un medio simple que contiene reguladores de crecimiento, el tipo de desarrollo a seguir dependerá del estado fisiológico del primordio. La restricción secuencial del potencial de desarrollo y los diferentes estados de determinación persistirán en poblaciones de células que están entrando en división (Christianson y Warnick, 1988; Azcon y Talon, 2001).

Igualmente, la aplicación exógena de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo, afecta directamente los niveles hormonales endógenos y por lo tanto procesos esenciales para el desarrollo celular (Azcon y Talon, 2001).

### **2.3.2 Factores extrínsecos**

También los factores químicos y físicos propios del cultivo *in vitro* influyen en que el proceso organogénico ocurra o no, tales factores pueden ser: composición del medio, concentración osmótica, concentración y tipo de carbohidratos, presencia de oligosacarinas, luz, temperatura, y tipo de recipiente relacionado con el grado de ventilación, que puede favorecer el crecimiento autótrofo y la composición de gases (CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, vapor de agua y etileno). No obstante, el principal factor de control de la morfogénesis *in vitro* son los reguladores de crecimiento (Azcon y Talon, 2001; Ammirato, 1986; Hartmann, *et al.*, 1997).

La organogénesis indirecta o inducida a callo produce variaciones somaclonales que pueden ser prácticos desde el punto de vista agrícola o de la investigación. Las variaciones son consecuencia de mutaciones y variaciones en el grado de ploidía de las células, debidas a las condiciones de cultivo (Ammirato, 1986; Hartmann, *et al.*, 1997).

De todos los factores implicados, los reguladores de crecimiento desempeñan un papel fundamental en el control de la morfogénesis, los balances adecuados difieren de unas especies a otras lo que hace que la regeneración de las plantas dependa tanto de los reguladores de crecimiento exógenos utilizados como de las especies en los que se ensayan (Ammirato, 1986; Chaudhury y Rongda, 2000).

Para la proliferación de brotes en angiospermas y gimnospermas, es necesario la adición de citoquininas, las más usadas son la Benzil-adenina (BA), Kinetina (KIN) y N6-isopentiladenina (2-ip). Para algunas especies la adición de BA únicamente o combinado con otras citoquininas afecta la capacidad de formación de yemas; se ha observado que la exposición prolongada a citoquininas puede suprimir el crecimiento y desarrollo de brotes (Ammirato, 1986; Hartmann, *et al.*, 1997).

### **2.3.3 Reguladores de crecimiento y organogénesis**

Hacia 1957, Skoog & Miller demostraron que la concentración relativa de auxinas y citoquininas exógenas regula la formación de órganos en cultivos de callo de médula de tabaco, como consecuencia surgió la hipótesis hasta el momento más aceptada, en la que se postula que la organogénesis está regulada por los cambios en los niveles hormonales endógenos de auxinas y citoquininas. Siguiendo este modelo, se ha determinado que una alta concentración de auxinas con respecto a la de citoquininas induce la formación de raíces, mientras que en el caso contrario se ve favorecida la formación de yemas vegetativas (Azcon y Talon, 2001).

La manipulación de las concentraciones de auxinas y citoquininas en los medios de cultivo permite controlar la organogénesis *in vitro* de muchas especies vegetales, siendo además la base de muchos protocolos de micropropagación. Aunque los balances auxina/citoquinina permiten la regeneración de órganos en una gran cantidad de plantas, existen muchos casos en los que no ha sido posible inducir respuestas organogénicas suplementando el medio con estos reguladores de crecimiento, de esta forma algunas veces la

adición de auxinas y citoquininas no tiene los efectos esperados (Ammirato, 1986; Hartmann, *et al.*, 1997).

## **2.4 MEDIOS DE CULTIVO**

El medio es la base nutritiva de los tejidos cultivados *in vitro*. Es una solución acuosa constituida por una mezcla de sales minerales que combinan los macro (N,P,S,K,Ca y Mg) y micronutrientes (Fe, B, Mn, Zn, Cu, Mo y Co) esenciales junto con la fuente de carbono. Adicionalmente, tienen vitaminas (inositol, tiamina, piridoxina, etc), reguladores de crecimiento, una fuente de N orgánico, sobre todo los L-aminoácidos, agente gelificante y otros compuestos (extracto de levadura, jugos y extractos de varias frutas, antioxidantes, adsorbentes) (López, 1990; Roca y Mroginski, 1991).

### **2.4.1 Nutrientes Minerales**

Los tejidos en cultivo requieren de una fuente continua de compuestos inorgánicos. Dentro de los macronutrientes cabe destacar el Nitrógeno, que se adiciona en grandes cantidades y se encuentra presente en el medio en forma de nitrato o iones de amonio, o la combinación de ambos, este elemento es necesario para que se produzca crecimiento en general.

El Magnesio, generalmente, en forma de sulfato de magnesio, muy importante para el funcionamiento de las enzimas, además de ser un componente de la clorofila. Bajo esta forma, puede servir como fuente de Azufre, constituyente de varios aminoácidos.

El Fósforo en forma fosfato diácido de sodio o de potasio como parte integral de los ácidos nucleicos y de otros componentes estructurales. El Potasio en forma de nitrato de potasio que sirve como el mayor ión positivo que balancea los iones negativos.

El Calcio en forma de cloruro de calcio o la forma anhidra de cualquier sal, necesario para la síntesis de paredes vegetales así como cofactor de varias enzimas (López, 1990; Gamborg, 1991 ).



De otro lado, entre los micronutrientes que se adicionan al medio de cultivo se encuentran: El boro, involucrado en la biosíntesis de lignina y el metabolismo de ácidos fenólicos, así mismo la deficiencia reprime la síntesis de citoquininas, pero aumenta los niveles de auxinas; el cobre, necesario para muchas actividades enzimáticas; el yodo, aunque no es esencial se adiciona porque mejora el crecimiento de callos y raíces; el hierro, necesario para la fotosíntesis y para diversas reacciones de oxido-reducción; el manganeso, necesario para la fotosíntesis y la respiración. El zinc, relacionado con la síntesis de triptófano, precursor del AIA (López, 1990; Gamborg, 1991).

#### **2.4.2 Compuestos orgánicos**

La sacarosa es la fuente de carbono mas empleada ya que son muy pocos los cultivos *in vitro* son autótrofos, como consecuencia no son capaces de fijar el carbono para la fotosíntesis por las limitaciones de CO<sub>2</sub> (López,1990).

#### **2.4.3 Reguladores de crecimiento**

##### **2.4.3.1 Auxinas**

Se conocen como auxinas al grupo de compuestos caracterizados por su capacidad para inducir la extensión de las células de los brotes (Weaver, 1982). Además se ha comprobado que las auxinas promueven la división celular en cultivos *in vitro*; otros efectos son la formación de raíces en ciertas especies, la iniciación de la floración y la inducción del desarrollo y llenado de frutos en algunas especies. Algunas auxinas son naturales y otras pueden producirse sintéticamente. Las auxinas naturales incluyen Acido-Indol-Acético, indol-3-acetonitrilo, etilindol-3-acetato, indol-3- carboxialdehido. Dentro de las auxinas sintéticas se cuentan el 2,4-D, el Acido-Naftalíen-Acético ANA) y el Acido-Indol-Butírico (AIB) (Roca,1991; Azcon y Talon, 2001; Hartmann, *et al.*, 1997).

### 2.4.3.2 Citoquininas

Al parecer tanto las citoquininas endógenas como las exógenas provienen de la adenina (base nitrogenada de las purinas). Provocan la división celular y regulan la diferenciación de los tejidos cortados. En los diferentes ensayos de bioanálisis de citoquininas deben agregarse auxinas al medio basal, ya que estas hormonas ejercen una acción sinérgica en la inducción de la división celular y en el crecimiento no diferenciado de cultivos de tejidos (Weaver, 1982).

Al parecer en cultivo de tejidos, las citoquininas poseen un efecto promotor sobre la síntesis de RNA y enzimas, lo que se traduce en un incremento en la velocidad de la síntesis de proteínas, algunas de las cuales podrían ser necesarias para la mitosis (Salisbury, 1994).

La Kinetina es tal vez la mas importante de las citoquininas naturales. Dentro de las artificiales la mas importante es la Benzilaminopurina (BAP), otras comúnmente usadas son la Isopentiladenina (2ip), Isopentiladenosina (IPA) y la Zeatina (ZEA) (Roca,1991; Azcon y Talon, 2001).

Las hormonas restantes: giberelinas, etileno y ácido abscísico no son esenciales para la formación de órganos, pero actuan como moduladores de la respuesta morfogénética (Ammirato, 1986).

### 2.4.4 Agentes gelificantes o sistemas de soporte

Los sistemas de soporte se requieren para mantener la planta en pie al colocarse en el medio de cultivo. Entre los sistemas de soporte o agentes gelificantes se encuentran el agar, **Gellamm gum** y agarosa, además de sistemas de soporte mecánicos como los puentes de papel filtro y membranas de polipropileno (López, 1990).

## 2.5 ANTECEDENTES

### 2.5.1 Cultivo *in vitro* de *Passifloras*

Morán - Robles (1978) probó el potencial morfogénico de los entrenudos de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener y *Passiflora mollissima* Bailey utilizando como medio de cultivo Nitsch (1969) y como regulador de crecimiento kinetina 2 mg./l. Concluyó que la utilización de kinetina es suficiente para dar paso a la formación de plantas completas. El mismo autor, logró multiplicar vegetativamente yemas axilares *in vitro*, usando como medio basal Murasighe & Skoog (MS) (1962).

Mourad-Agha y Dexheimer (1979) indujeron callos en segmentos de tallos de *Passiflora quadrangularis* (Badea) en medio Nitsch suplementado con AIA y Kinetina.

Schall, (1983) citado por Talero y Rivas (1991) elongó microestacas de *Passiflora edulis* Sims de plantas adultas usando como medio de cultivo MS a la mitad y la mezcla vitamínica de Morel suplementado con BAP a diferentes concentraciones..

Desay y Mehta (1985), obtuvieron brotes a partir de discos de hoja del híbrido *Passiflora alata* x *Passiflora caerulea*. Los brotes se obtuvieron a los 15 días en medio MS suplementado con BA y Kinetina. La aparición de raíces se dio en el mismo medio, pero suplementado con ANA y BA.

Kantharajah y Dodd (1990), trabajaron en la micropropagación *in vitro* de *Passiflora edulis*, midieron la multiplicación de brotes de plantas germinadas en medio MS con combinaciones de 1.0, 2.0 y 3.0 mg/l de BAP , 2% y 3% de sacarosa y agua de coco; encontraron que las concentraciones de sacarosa no eran significativas sobre el número de brotes, pero la presencia de agua de coco si aumentaba significativamente la producción de brotes por explante.

Guerrero, Hodson y Cancino, (1990) indujeron la regeneración de brotes a partir de yemas apicales *P mollissima* al adicionar al medio Nitsch 2.2 µM, 6.6

$\mu\text{M}$ , y  $11 \mu\text{M}$  de BA. El 65% de los brotes inducidos enraizaron en medio Nitsch sin reguladores de crecimiento.

Roderick (1991), comparó las sales de Murashige y Skoog (1962) con las de Fassard *et al.* (1974) citado por Talero y Rivas (1991), y encontró sólo desarrollo de los brotes con las sales minerales de MS y la incubación en la oscuridad (pero siendo estos muy pocos), concluyó que la regeneración *in vitro* de tejido adulto es notablemente más baja que la de tejido joven.

Hodson y Cancino, (1992) estandarizaron un método de micropropagación de *P.mollissima*. Trabajaron con material *in vitro* (yemas apicales y axiales, nudos y entrenudos) y obtuvieron los mejores brotes adventicios al adicionar  $3 \text{ mg/l}$  de BA en medio Nitsch. El enraizamiento se logró en el mismo medio, sin reguladores de crecimiento.

Amogune, Gopalan y Bytebier (1993), probaron la regeneración de plantas a partir de discos de hoja de *Passiflora edulis* var. *Flavicarpa*. La regeneración directa de brotes sin pasar por la fase de callo se logró en *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* en presencia de  $8.90 \mu\text{M}$  de BAP y  $2.32 \mu\text{M}$  de Kinetina en cuatro semanas. Utilizando  $11.42 \mu\text{M}$  de IAA,  $10.74 \mu\text{M}$  de NAA y  $1.86 \mu\text{M}$  de KIN reportaron sólo formación de callos y con  $10.74 \mu\text{M}$  de NAA y  $2.32 \mu\text{M}$  de KIN formación de callos y raíces.

En el trabajo de Carnier y Carneiro (1994), se midió el efecto de diferentes fuentes de explantes en la regeneración de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*, utilizando reguladores de crecimiento, agua de coco y radiación de luz. La organogénesis directa se presentó en el medio Murashige y Skoog (1962) en presencia de BA únicamente.

Kawata *et al.*, (1995), trabajaron en la micropropagación de *Passiflora edulis* subcultivando brotes primarios a partir de discos de hoja, cultivados en medio MS (1962). Encontraron que  $10 \mu\text{M}$  de BA era la concentración más recomendable para el subcultivo de los brotes primarios y permitía mantenerlos en intervalos de tres semanas por tres años. Concluyeron que la adición baja de citoquininas (BA) es suficiente para la formación de brotes.

Ovalle, (1995) definió las mejores condiciones de cultivo para lograr la regeneración de brotes organogénicos de *Passiflora mollissima* sobre discos de

hoja. Obtuvo brotes en medio basal Nitsch suplementado con 3mg/l de BA y 2 mg/l de Kinentina. No logró la regeneración de brotes de *Passiflora ligularis* pero observó que la mejor producción de callo se obtenía al cultivarlos en medio de cultivo MS/2 con 6 mg/l de BAP y 3 mg/l de kinetina.

Cancino, (2001), reportó un efecto positivo en la inducción de brotes de *Passiflora mollissima* empleando el compuesto *Pluronic*.

### 2.5.2 Transformación genética en *Passifloras*

En el campo de la transformación genética de *Passifloras* usando *Agrobacterium tumefaciens*, Manders *et al.*,(1994) trabajaron con tallos y discos de hoja de *Passiflora edulis* var.*flavicarpa* Degener; utilizaron la cepa GV3111SE con el plásmido pMON 200 y como gen marcador *nptII*. Finalmente, regeneraron cuatro plantas a partir de discos, tres de las cuales sintetizaron nopalina y expresaron la actividad de la neomicin fosfotransferasa.

Forero (1999), cultivó discos de hoja de *Passiflora mollissima* con las cepas desarmadas ABI y LBA 4404 de *Agrobacterium tumefaciens*. Estas cepas portaban los plásmidos PMON 10098 y PBI 121, obtuvo callos transgénicos, siendo mejores en cuanto al proceso de regeneración y transferencia de genes los explantes co-cultivados con LBA 4404 pBI121.

Cancino (2001), trabajó con explantes de *Passiflora mollissima* y *Passiflora edulis* var *flavicarpa*, utilizó las cepas de *A. tumefaciens*: LBA4404 (pVDH65) y EHA 105 (pGUSINT). Adicionó el flavonoide *naringenin* como suplemento en el cocultivo lo que significó un aumento en la expresión transitoria del gen  $\beta$ -*gus* Obtuvo plantas transgénicas de *P. mollissima* resistentes a kanamicina con la cepa EHA 105 y comprobó la integración estable del gen *bar* en las plantas de *P. edulis*

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

El estudio fue experimental y analítico, con un diseño experimental factorial completamente al azar.

##### 3.1.1 Población y muestra

La población estuvo conformada por frutos maduros de *P. mollissima* colectados en Nuevo Colón, Boyacá (Colombia). Las semillas obtenidas se germinaron y se mantuvieron en el invernadero de la Unidad de Biotecnología Vegetal de la Universidad Javeriana.

##### 3.1.2 Variables de estudio

Las variables dependientes son las respuestas por efecto de los tratamientos:

- Número de brotes formados por vía organogénica directa o indirecta en los diferentes tratamientos.
- Porcentaje de discos foliares sobrevivientes al proceso de infección.
- Porcentaje de brotes transformados.

Dentro de las variables independientes se tomaron:

- Las plantas de *Passiflora mollissima* que sirvieron como fuente de hojas.
- Tiempo en que los discos foliares dan respuesta organogénica
- Cepa bacteriana utilizada en el proceso de infección de discos foliares.

-Tratamientos empleados.

### 3.1.3 Tratamientos

En este ensayo, se combinaron BA (0;2.22, 4.44, 8.88, 13.32  $\mu\text{M/l}$ ) y KIN (0;2.32,4.65,9.29,13.94  $\mu\text{M/l}$ ) en 25 tratamientos (Anexo 1), con cefotaxime 250mg/l en medio basal Nitsch completo. El experimento contó con tres repeticiones en el tiempo, cada una de las cuales constó de 40 explantes infectados y 20 como control para cada uno de los tratamientos.

Adicionalmente se realizó un control positivo para la transformación en cada una de las repeticiones en el tiempo, utilizando 40 explantes de *Nicotiana tabacum* var *Xhanti* (especie modelo de transformación genética) infectados con la misma cepa bacteriana y mantenidos en medio MS con IAA 0,2 mg/l y KIN 2 mg/l.

## 3.2 METODOS

### 3.2.1 Material vegetal:

Se germinaron semillas de *Passiflora mollissima*, obtenidas de frutos maduros provenientes de un mismo lote, ubicado en Nuevo Colón, Boyacá (Colombia). Fueron liberadas del arilo por medio de una fricción contra un tamiz y se secaron a la sombra sobre papel periódico para eliminar los residuos y se sometieron al proceso de germinación. Para facilitar este proceso de germinación, se escarificaron mecánicamente con una lija de agua (P-150 3M) (Caicedo y González, 1997). Se remojaron por 2 días en agua corriente (Jaramillo, 1957). Posteriormente se sembraron en semilleros con turba y se mantuvieron en el cuarto de incubación a 24-26°C. Los riegos se realizaron tres veces por semana. Un mes mas tarde de haber germinado, se trasplantaron a bolsas plásticas y se mantuvieron en el invernadero a 16-20 °C .

Las plantas de *Nicotiana tabacum* var *Xhanthi* que sirvieron como control positivo para la transformación, provenían de plantas mantenidas *in vitro* en la Unidad de Biotecnología Vegetal de la Pontificia Universidad Javeriana.

### 3.2.2 Evaluación de diferentes concentraciones de kanamicina sobre discos de hoja de *P. mollissima* no infectados con *Agrobacterium tumefaciens*

Para determinar si con una concentración de kanamicina menor a la encontrada por Forero, (1999) (25 mg/l) se produce la muerte del tejido vegetal, se realizó una prueba de tres tratamientos (Tabla 3) empleando discos de hoja no infectados en medio Nitsch (1969) (Anexo 2A). En los tratamientos además de kanamicina se usó una combinación de BA 3.0 mg/l y KIN 2.0 mg/l (concentraciones hormonales determinadas en el protocolo de regeneración desarrollado por Ovalle, 1995)

Tabla 3. Tratamientos en los que se combinan concentraciones de Kanamicina con hormonas para comprobar la susceptibilidad del tejido vegetal a este antibiótico.

Tratamiento	Kanamicina mg/l	BA mg/l	KIN mg/l
T1	0	3	2
T2	12.5	3	2
T3	25	3	2

### 3.2.3 Mantenimiento de cepas

Las bacterias a utilizar, se mantuvieron en cajas de Petri con medio Luria Bertani (LB) (Anexo 2B) gelificado con Bactoagar®, llevado a pH 7,2 y autoclavado (121 °C , 15 lb de presión por 25 min). Al medio se le adicionaron los antibióticos correspondientes para cada cepa:

#### ***A. tumefaciens:***

-LBA4404 de Electromax® (50mg/l de estreptomina)

-LBA4404 pBI121 (50mg/l de kanamicina y 200mg/l de cloranfenicol).



***E.coli:***

-DH5 $\alpha$  (sin antibiótico).

-DH5 $\alpha$  pBI121 (50 mg/l de kanamicina).

-PRK2013 (50 mg/l de kanamicina).

Estas cepas se almacenaron en medio LB y glicerol a -70°C, para luego ser usadas.

**3.2.4 Transformación bacteriana**

Todo el procedimiento se ilustra en la figura 1.

El plásmido pBI121 (Figura 2), fue insertado en la cepa de ***E.coli*** DH5 $\alpha$ , utilizando CaCl<sub>2</sub> (Sambrock, ***et. al.***, 1989), para finalmente realizar conjugación triparental con la cepa de ***Agrobacterium*** LBA4404 y obtener LBA4404 pBI121.



Figura 1. Etapas implicadas en el proceso de transformación bacteriana

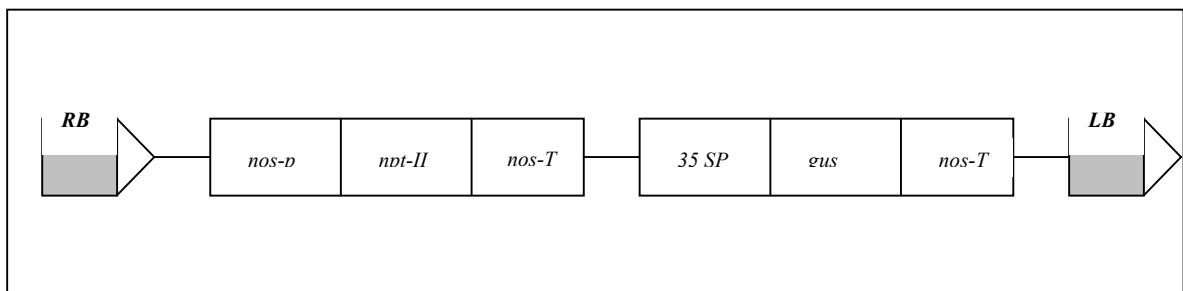


Figura 2. Estructura del T-DNA de pBI121. Su tamaño es de 13 Kb. (RB. Borde Derecho. LB. Borde Izquierdo. 35 SP. Promotor 35S. *npt-II*. Neomicin fosfotransferasa. *nos-T*. Sitio de terminación nopalinsintetasa. *gus* β-glucoronidasa. *nos-P*. Promotor nopalinsintetasa. Producido por CLONTECH® Laboratory. Fuente: Foreo, 1999.

### 3.2.4.1 Establecimiento de células competentes

Este procedimiento se fundamenta en la obtención de células competentes, que fueron aquellas que tenían una mayor capacidad de incorporar moléculas de DNA exógeno y ser transformadas por ellas (Madigan, 1997).

Las células hospederas de *E. Coli* en crecimiento activo, se hacen permeables al DNA por incubación en el buffer CaCl<sub>2</sub> y almacenamiento en frío; el plásmido es transportado de la solución circundante al interior de una pequeña fracción de células hospederas. Utilizando un antibiótico respectivo para cada cepa en medio LB, se obtiene crecimiento selectivo de células portadoras del plásmido, cuyas colonias se hacen visibles luego de 12-16 horas de incubación ( protocolo Anexo 3A) (Davis, *et al.*, 1994).

Con este procedimiento se logra abrir poros en la membrana celular para que el plásmido pueda entrar. Luego se procedió a la transformación con el plásmido pBI 121 (Anexo 3B).

### 3.2.4.2 Conjugación triparental

La conjugación triparental es el método más usado para introducir plásmidos en cepas de *Agrobacterium tumefaciens*. Consiste en cultivar tres bacterias juntas: La cepa de *E.coli* que contiene el plásmido de movilización (PRK2013), que lleva los genes de transferencia; una cepa de *E.coli* que contiene el plásmido recombinante y la cepa de *A. tumefaciens* receptora. El PRK2013 provee las proteínas de transferencia RK2 y ColE1 *mob* que permite al plásmido recombinante ser movilizado dentro de *Agrobacterium*. Para la purificación de las cepas recombinantes se sembró por agotamiento en cajas de Petri con los antibióticos correspondientes (Singh y Lin, 1993). Como resultado, se obtuvo la cepa LBA4404 pBI121 que en este trabajo, fué utilizada en las infecciones de los explantes (Anexo 3C).

### 3.2.4.3 Evaluación de la Transformación Bacteriana

Se empleó el kit comercial CONCERT® *Rapid plasmid purification systems* de la marca GIBCO BRL, que provoca lisis alcalina en las células bacterianas para que se libere el plásmido, elimina las impurezas de RNA con RNAasas y separa el DNA plasmídico por precipitación de los demás componentes celulares. Posteriormente se realizó electroforesis en un gel de agarosa del 0.7% para verificar la transformación bacteriana.

### 3.2.5 Proceso de infección

El proceso se ilustra en la figura 3.

#### 3.2.5.1 Obtención y Desinfección de Explantes

Se tomaron hojas de plantas de 3 meses y se colocaron en agua destilada estéril, para evitar oxidación y deshidratación (Hodson y Cancino, 1992). Posteriormente se sometieron a un lavado por inmersión y agitación durante 6 minutos en solución de agua e Hipoclorito de sodio al 2.5% y el detergente Tween20® (una gota por cada 100ml). En la cámara de flujo laminar se realizaron 4 lavados con agua desionizada estéril, más o menos de 5 minutos cada uno para eliminar el hipoclorito del tejido vegetal (Ovalle, 1995; Hodson y Cancino, 1992).

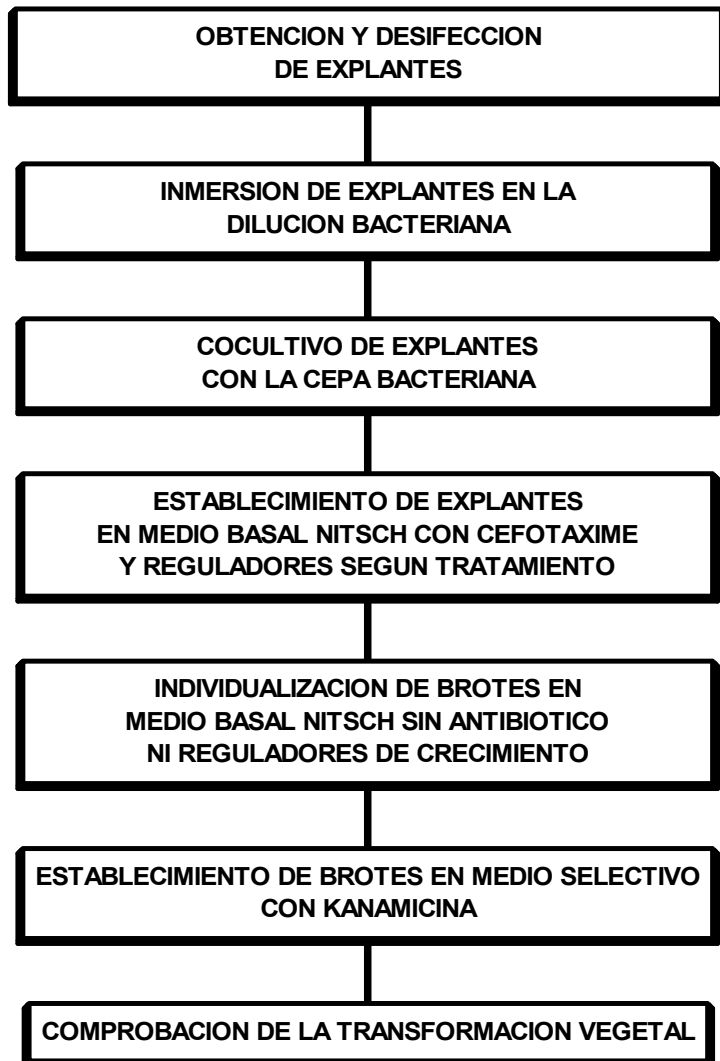
Se cortaron discos de hoja de 10-12 mm de diámetro con un bisturí estéril, retirando cuidadosamente los bordes de la hoja para causar heridas que faciliten el proceso de infección. Los explantes cortados fueron llevados a cajas de Petri con papel filtro húmedo para mantenerlos hidratados.

Hay que anotar que no se usó como fuente de discos de hoja material *in vitro*, ya que en el trabajo de Forero (1999), se determinó un mayor porcentaje de transformación usando material proveniente de invernadero.

### 3.2.5.2 Crecimiento y dilución bacteriana

La cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 pBI121 se sembró en 10 ml de LB, con los antibióticos correspondientes y se mantuvo en agitación constante a 125 r.p.m. por 16 horas a 28°C. Posteriormente se realizó la dilución bacteriana de la siguiente forma:

1. El crecimiento bacteriano se transfirió a tubos de centrífuga de 50ml y se centrifugó a 4.000 r.p.m. por 10 minutos.
2. Se descartó el sobrenadante y se adicionaron 10 ml de medio Nitsch de regeneración. Se realizó una dilución 1:10 y se sumergieron en ella los discos de hoja previamente cortados.
3. Se dejó en agitación por 30 minutos, a temperatura ambiente.



**Figura 3. Proceso de infección de discos de hoja vía *A. tumefaciens* Para la transformación.**

### **3.2.5.3 Cocultivo**

Los explantes infectados fueron puestos en cocultivo en cajas de petri con papel filtro y medio Nitsh sólido según tratamiento, cada una de ellas con 10 discos de hoja; así se mantuvieron durante tres días en oscuridad en el cuarto de incubación a 24-26 °C.

### **3.2.5.4 Establecimiento de los explantes**

Luego del cocultivo, los explantes se colocaron en frascos con medio basal Nitsh suplementado con BA y KIN según el tratamiento y antibiótico cefotaxime (concentración de 250 mg/l), en el cuarto de incubación con 24-26°C con fotoperiodo de 12 horas. En estas condiciones permanecieron por 30 días. Los brotes obtenidos se individualizaron en medio Nitsch libre de hormonas y sin cefotaxime, por 15 días.

\* El mismo proceso de infección se realizó para los explantes de tabaco, pero utilizando medio MS (Anexo 2A) con IAA 0.2 mg/l y KIN 2 mg/l como reguladores de crecimiento.

### **3.2.6 Evaluación de la transformación genética de *P. mollissima***

#### **3.2.6.1 Determinación de la expresión del gen *npt II* en *P. mollissima***

Dentro del grupo de brotes individualizados, se eligieron los que tenían aproximadamente 1 cm y no presentaban vitrificación ni malformaciones en las hojas; posteriormente se establecieron en medio Nitsch selectivo con kanamicina, sin reguladores de crecimiento, para evaluar la transformación vegetal. Se mantuvieron a 24-26°C con fotoperiodo de 12 horas por 30 días.

### 3.2.6.2 Determinación de la integración del gen *npt II* en *P. mollissima*

De los brotes de *P. mollissima* que sobrevivieron en medio selectivo con kanamicina, se tomaron 10 muestras; adicionalmente se tomaron 5 controles negativos para la transformación que no habían sido mantenidos en medio de selección. Se realizó aislamiento de DNA genómico de cada una de las plantas (Anexo 3E).

Se verificó la integración del gen *npt II* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa PCR (protocolo Anexo 3D); se empleó el primer de *nptII*:

3'GTCGCTTGGTCGGTCATTTCG 5'

3'GTCATCTCACCTTGCTCCTGCC 5'

95°C	45 seg	30 CICLOS
52°C	40 seg	
72°C	2 min	
72°C	10 min	
4°C	Indefinido	

Los amplificados se analizaron en gel de agarosa al 1% con tinción por bromuro de etidio (Sambrock *et al.*, 1989).

\*El mismo procedimiento se realizó para los brotes de *Nicotiana tabacum* var *Xhanthi*.

### 3.2.6.3 Detección de la integración del gen $\beta$ -*gus*

De los brotes que sobrevivieron al medio selectivo con kanamicina, se tomó una muestra de 10 plantas y 5 controles negativos para la transformación que no habían sido mantenidos en medio de selección para comprobar la integración del gen *gus* en los tejidos potencialmente transformados.

Este procedimiento se realizó buscando que la  $\beta$ -glucuronidasa reaccione con el sustrato X-GLUC (5-bromo-4-cloro-3 indol-beta-D-glucoronido), lo que



indica la presencia del gen *gus* y, por lo tanto, la integración del T-DNA. Los tejidos transformados se colorearon de azul (Anexo 3F) (Jefferson, 1987).

\*El mismo procedimiento se realizó para los brotes de *Nicotiana tabacum* var *Xhanti*.

### **3.3 RECOLECCION DE LA INFORMACIÓN**

#### **3.3.1 Regeneración de explantes**

Para este propósito, se cuantificó el número de brotes, la presencia o ausencia de callos y raíces, además se calculó el porcentaje de oxidación por explante (se dividió el disco en cuatro cuadros, cada uno de los cuales correspondió a un 25%) y la contaminación ( formato de toma de datos Anexo 4). Esto se realizó cada 15 días, por un mes después del establecimiento de los explantes. La información se tomó para cada explante de manera individual.

#### **3.3.2 Transformación vegetal**

Se transfirieron a medio de cultivo Nitsch con kanamicina y estimó el número de plantas sobrevivientes: Así mismo de ellos se sacó una muestra para PCR y tinción histoquímica.

### **3.4 ANALISIS DE DATOS**

Inicialmente, se realizaron pruebas de normalidad, y se encontró que los datos no presentaban una distribución normal por lo que se transformaron utilizando raíz cuadrada de la variable mas 0.5.

La fase de organogénesis *in vitro* y de transformación se analizó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de análisis multivariado de Tukey para detectar diferencias entre los tratamientos, en donde se obtuvo

comparaciones entre los promedios de cada variable evaluada. Todos los datos fueron procesados en el programa PC-SAS versión 6.3.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 TRANSFORMACION BACTERIANA

Para comprobar que la cepa LBA 4404 había incorporado el plásmido pBI 121, se realizó el aislamiento de DNA plasmídico y mediante electroforesis en gel de agarosa 0.7%, se comprobó la transferencia del plásmido pBI 121 en la cepa LBA4404 usada en las infecciones (figura 4).

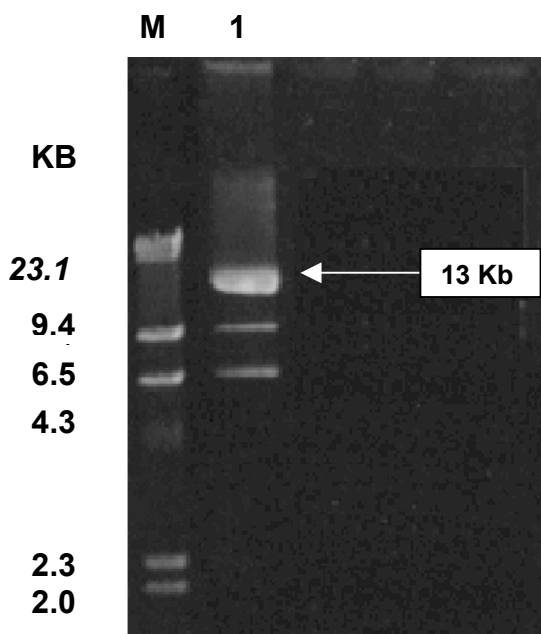


Figura 4. Electroforesis de DNA plasmídico.

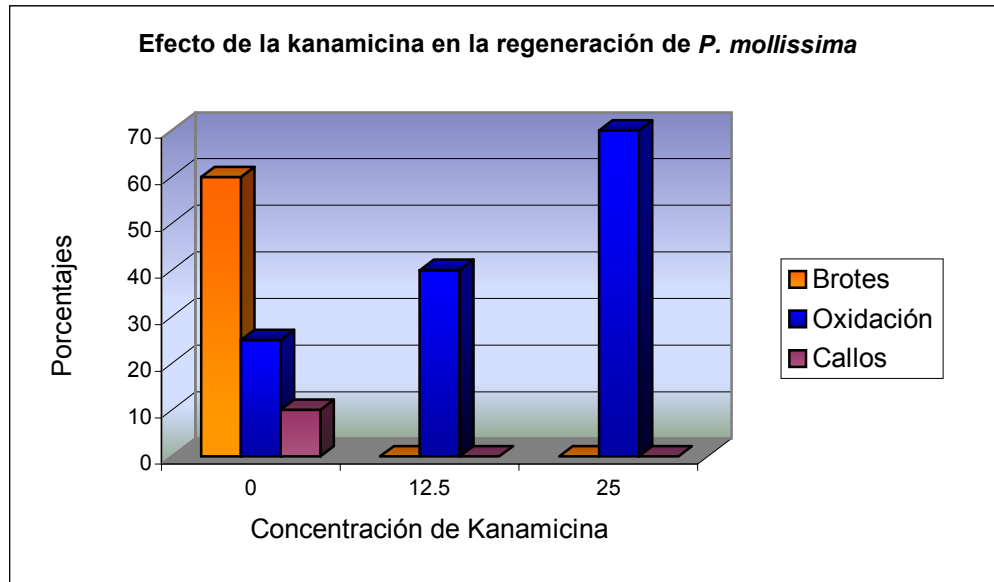
M: Marcador  $\lambda$ -Hind III. Línea 1: LBA 4404 pBI 121 (13 Kb). Gel de agarosa 0.7%

#### **4.2 EVALUACION DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE KANAMICINA SOBRE DISCOS DE HOJA DE *P. mollissima* no infectados con *Agrobacterium tumefaciens***

Para determinar la concentración de antibiótico que se usó para el proceso de selección del tejido vegetal transformado, se establecieron en medio de cultivo Nitsch discos de hoja en presencia de kanamicina, de acuerdo a lo descrito en el numeral 3.2.2.

Los resultados obtenidos permiten concluir una alta susceptibilidad de los tejidos de *P. mollissima* a las diferentes concentraciones de kanamicina evaluadas en este ensayo, ya que la única respuesta organogénica se obtuvo en el tratamiento control, en los demás, la regeneración de brotes y/o callos se inhibió completamente y la oxidación fue significativamente alta (Figura 5).

De acuerdo con estos resultados, se determinó que 12.5 mg/l de kanamicina (tratamiento 2), era una concentración adecuada para seleccionar el tejido vegetal transformado, ya que con esta concentración se produce muerte de los discos de hoja de *Passiflora mollissima* no transformados, es decir, que no tienen presente el gen que codifica para la neomicin fosfotransferasa, la cual permite la detoxificación de este antibiótico, que es normalmente letal para los tejidos vegetales.



**Figura 5. Efecto de la concentración de kanamicina en la regeneración de explantes no transformados de *P. mollissima***

### 4.3 EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS HORMONALES SOBRE LA ORGANOGÉNESIS DE DISCOS DE HOJA DE *Passiflora mollissima*.

La evaluación de la respuesta organogénica se realizó a los 15 días (tiempo 1) y 30 días (tiempo 2) siguientes al establecimiento de los discos de hoja en el medio de regeneración según el tratamiento.

Posteriormente, se realizaron los análisis de normalidad y se determinó que los datos no presentaban una distribución normal, por lo cual fue necesario transformarlos utilizando la raíz cuadrada de la variable + 0.5.

Para los análisis de varianza (ANOVA), se tomaron como variables el tratamiento hormonal, el tiempo de establecimiento (1 y 2), la réplica en el tiempo y la presencia o ausencia de *Agrobacterium tumefaciens* en el momento de la infección. De igual manera, se estimaron las interacciones: tratamiento hormonal x tiempo, tratamiento hormonal x infección y tratamiento hormonal x réplica.

Con respecto al número de brotes por explante, el ANOVA ( $\alpha = 0.05$ ) mostró diferencias significativas según el tratamiento (Anexo 5A). De tal forma, en el tratamiento 1 control negativo y en los tratamientos 2 (BA 0  $\mu\text{M/l}$ , KIN 2.32  $\mu\text{M/l}$ ) y 5 (BA 0  $\mu\text{M/l}$ , KIN 13.94  $\mu\text{M/l}$ ) no hubo ninguna respuesta organogénica (Figura 6).

La mayor producción de brotes por explante se registro en el tratamiento 21 que contenía 13.32  $\mu\text{M/l}$  de BA y 0  $\mu\text{M/l}$  de KIN (Figura 6). En este tratamiento se obtuvo un promedio de 5.16 brotes por explante que es significativamente ( $\alpha = 0.05$ ) superior a los demás tratamientos evaluados (Anexo 6A), de igual forma la comparación de promedios de Tukey confirmó este resultado (Anexo 5E).

El ANOVA (Anexo 5 I) mostró diferencias significativas ( $\alpha = 0.05$ ) con respecto al tiempo: el promedio de brotes por explante para el tiempo 1 fue de 0.57 y para el tiempo 2 fue de 1.40, lo que evidenció aumento en el número de brotes en el tiempo que se originaron vía organogénesis.

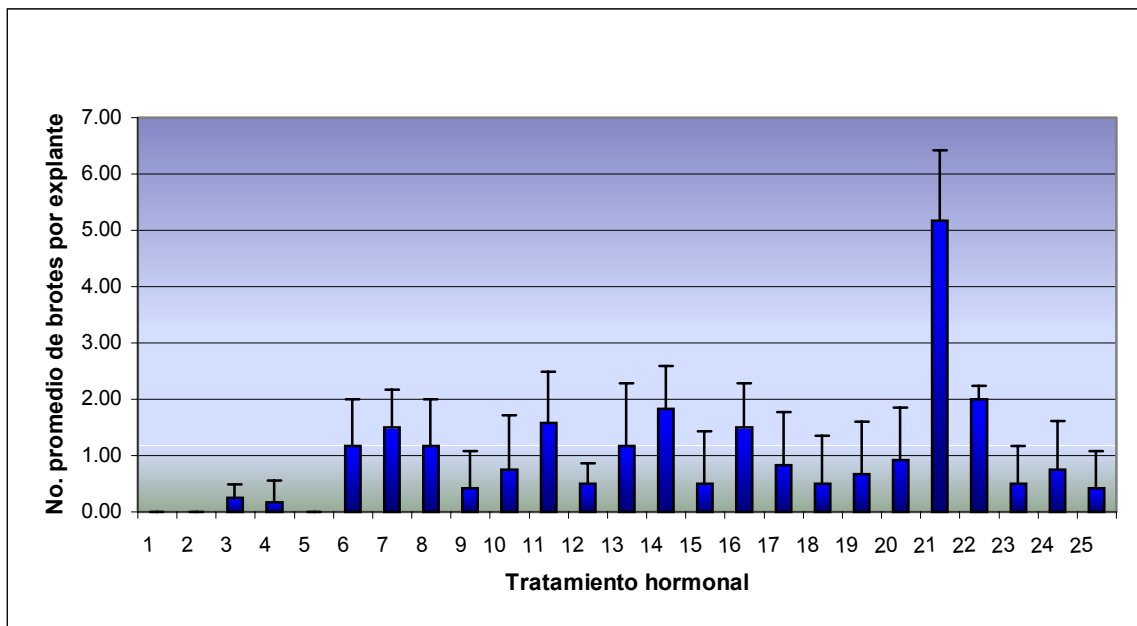
La réplica y la interacción tratamiento x réplica, no mostraron diferencias significativas, lo que indica que las condiciones en que se realizó este ensayo se mantuvieron estables.

En los tratamientos con promedios de número de brotes por explante mas altos: tratamientos 21 (BA 13.32  $\mu\text{M/l}$ , KIN 0  $\mu\text{M/l}$ ), 22 (BA 13.32  $\mu\text{M/l}$ , KIN 2.32  $\mu\text{M/l}$ ) y 14 (BA 4.44  $\mu\text{M/l}$ , KIN 9.29  $\mu\text{M/l}$ ), algunos de los brotes regenerados sufrieron vitrificación y muerte antes de ser individualizados, a excepción del tratamiento 21.

Vale la pena anotar, que se observó un mayor regeneración de brotes hacía los bordes del explante, en comparación con la región central del disco de hoja, evento que ha sido reportado en otros trabajos con otras especies del género *Passiflora* (Figura 7 ).

De igual forma, aunque estadísticamente no se encontró diferencia significativa en la producción de brotes por explante con respecto a la infección, se observó una mayor respuesta organogénica en los discos de hoja no expuestos a *Agrobacterium tumefaciens*.

Por otro lado, en los brotes individualizados provenientes de los tratamientos 22 y 23, se observó variación en la morfología de las hojas, así como se detectó crecimiento reducido, aunque en bajas proporciones.



**Figura 6. Cuantificación del número promedio de brotes por explante según tratamiento hormonal.**



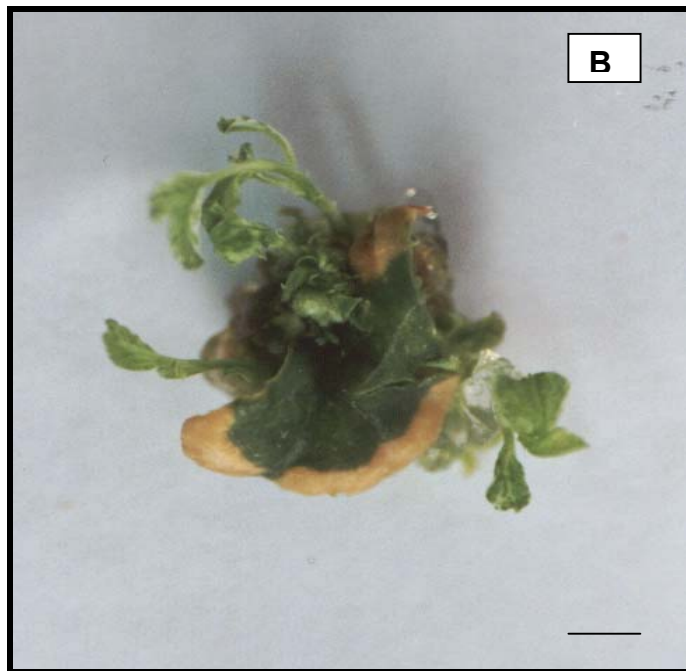
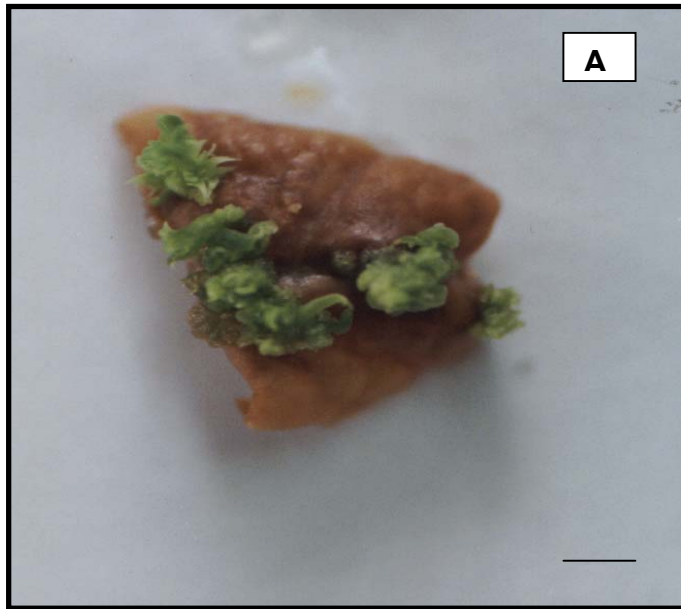


Figura 7. A. Obtención de brotes de *P. mollissima* regenerados vía organogénesis B. Brotes de 30 días. Escala: —2 mm.

Adicionalmente, se tomaron datos de la producción de callos, la aparición de raíces en el explante y el porcentaje de oxidación por explante.

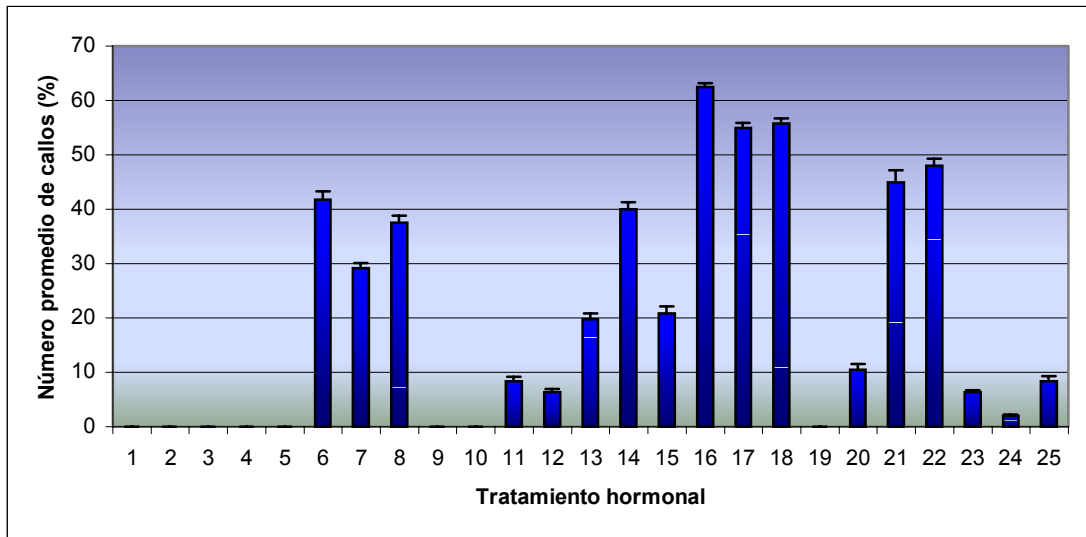
Para la evaluación de la presencia de callos se determinó el número de bordes del explante en el que se presentó el tejido indiferenciado, luego se hizo una conversión de estos datos a porcentaje de callos por explante en cada tratamiento.

El ANOVA (Anexo 5B), mostró diferencias significativas ( $\alpha = 0.05$ ) en cuanto al tratamiento. El tratamiento con mayor porcentaje promedio de callos por explante fue el 16 (BA 8.88  $\mu\text{M/l}$ , KIN 0  $\mu\text{M/l}$ ) con 62.5% seguido por los tratamientos 17 (BA 8.88  $\mu\text{M/l}$ , KIN 0.5  $\mu\text{M/l}$ ) y 18 (BA 8.88  $\mu\text{M/l}$ , KIN 4.65  $\mu\text{M/l}$ ) con 55% y 55.7% respectivamente (Anexo 6C) (Figura 8); lo anterior es consistente con la prueba de Tukey que demuestra una diferencia altamente significativa del tratamiento 16 con respecto a los demás tratamientos (Anexo 5F).

De igual forma, según el ANOVA (Anexo 5B), la interacción tratamiento x tiempo mostró diferencias significativas ( $\alpha = 0.05$ ); el mayor promedio de callos por explante se obtuvo en el tiempo 2 en general para todos los tratamientos.

En cuanto a las réplicas y a la infección, no hay diferencias significativas con respecto a la producción de callos por explante (Anexo 5k).

Hay que resaltar, que en la parte central del disco de hoja, la aparición de callos fue muy esporádica, mientras que hacia los bordes se observaron en mayor grado (Figura 9 A); además durante el tiempo 2, se hizo evidente la presencia de brotes y callos sobre el explante simultáneamente (Figura 9B).



**Figura 8. Cuantificación del número promedio de callos por explante (expresado en porcentaje) de *P. mollisima* en cada uno de los tratamientos hormonales.**

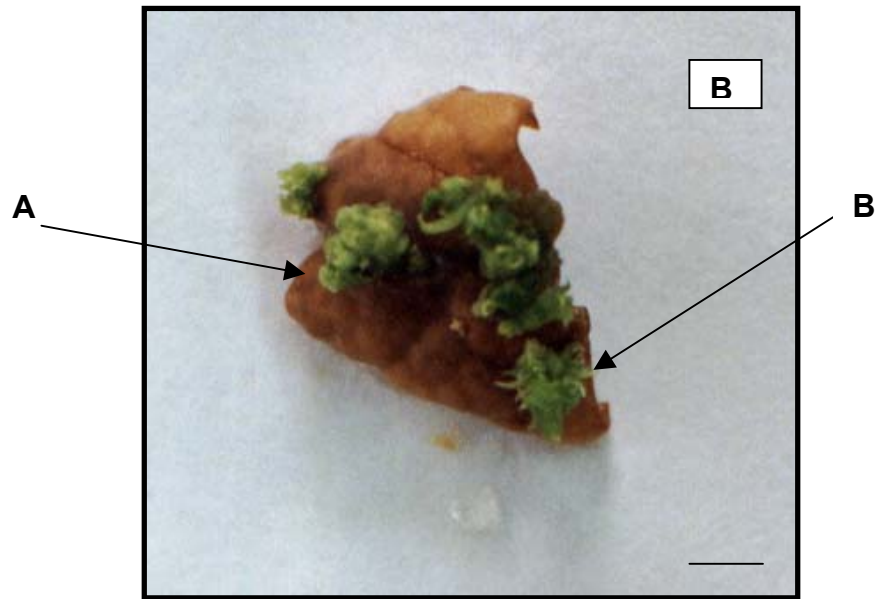
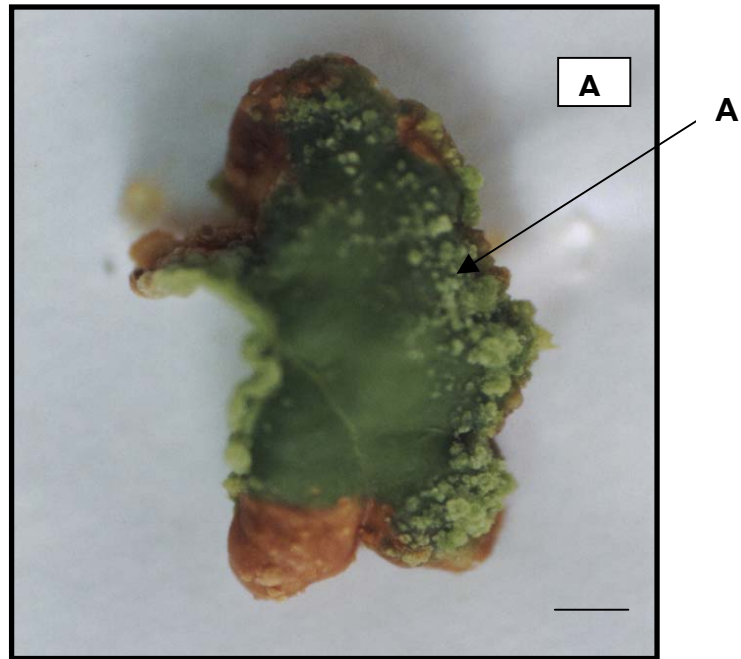


Figura 9. Obtención de callos de *P. mollissima*. A. a) Callos distribuidos por los bordes del explante. B. a) callos, b) brotes simultáneamente en un explante.  
Escala: — 2mm.

Como se mencionó anteriormente, se registró la aparición de raíces en los discos de hoja en los tratamientos: 16 (BA 8.88  $\mu\text{M/l}$ , KIN 0  $\mu\text{M/l}$ ) con promedio de 0.25 raíces por explante, 19 (BA 8.88  $\mu\text{M/l}$ , KIN 9.29  $\mu\text{M/l}$ ), 13 (BA 4.44  $\mu\text{M/l}$ , KIN 4.65  $\mu\text{M/l}$ ) y 8 (BA 2.22  $\mu\text{M/l}$ , KIN 4.65  $\mu\text{M/l}$ ) con promedios 0.15, 0.08 y 0.08 raíces en el explante respectivamente (Anexo 6B). Sin embargo, el ANOVA (Anexo 5C), no mostró diferencias significativas ( $\alpha= 0.05$ ), sobre la presencia de raíces en ninguna de las fuentes de variación evaluadas.

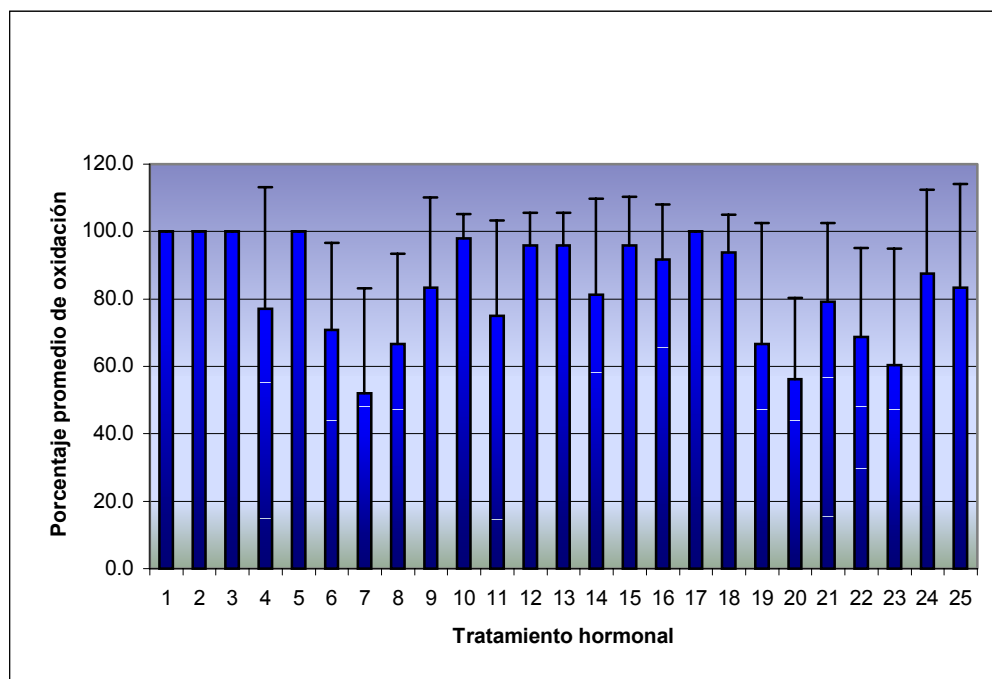
Por otro lado, el enraizamiento de brotes se produjo en medio libre de reguladores de crecimiento y cefotaxime, de manera espontánea.

Así mismo, se determinaron los porcentajes de oxidación de los discos de hoja infectados y no infectados. En general, los tratamientos presentarán un alto porcentaje de oxidación, superior al 50% (Figura 10). El porcentaje mas bajo fue de 52.1% para el tratamiento 7 en ambos casos, pero si se relaciona con el tiempo se evidenció una tendencia de aumento (Anexo 6D). Con respecto a las réplicas realizadas en el tiempo el porcentaje de oxidación osciló entre 80-86.7% (Anexo 6E).

Así mismo, fue evidente una relación entre el tratamiento hormonal y la alta oxidación presente en el tejido, lo que fue confirmado por el análisis de varianza, el cual mostró diferencias significativas ( $\alpha= 0.05$ ) en cuanto a la interacción de estas dos variables. Así, los tratamientos: 1 (control negativo), 2 (BA 0  $\mu\text{M/l}$ , KIN 2.32  $\mu\text{M/l}$ ), 3 (BA 0  $\mu\text{M/l}$ , KIN 4.65  $\mu\text{M/l}$ ), 5 (BA 0  $\mu\text{M/l}$ , KIN 13.94  $\mu\text{M/l}$ ), y 17 (BA 8.88  $\mu\text{M/l}$ , KIN 2.32  $\mu\text{M/l}$ ), presentaron los porcentajes de oxidación mas altos.

Aunque se procuró tener uniformidad en el tamaño de los explantes, los mas pequeños presentaron oxidación en mayores proporciones que los demás, de igual forma ésta se hizo evidente en muchos casos inmediatamente después del cocultivo.

Por otra parte, en cuanto a la infección, no se encontraron diferencias significativas ( Anexo 5D).



**Figura 10. Porcentaje promedio de oxidación de *P.mollisima* según los diferentes tratamientos hormonales.**

#### **4.4 EVALUACION DE LA TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE *P. mollissima***

Para determinar la transformación genética de *P. mollissima*, se evaluó la expresión del gen  $\beta$ -*gus* y del gen *npt II* en los brotes regenerados.

Igualmente, para evaluar la transformación genética de los brotes *Nicotiana tabacum* var *Xhanti* (control positivo de la transformación genética), se determinó la expresión del gen  $\beta$ -*gus* y del gen *npt II*).

##### **4.4.1 Evaluación de la expresión del gen *npt II* en brotes de *P. mollissima***

Para evaluar la expresión del gen *npt II*, se eligieron dentro del grupo de brotes individualizados en medio basal Nitsch libre de reguladores de crecimiento y cefotaxime (250mg/l), los que presentaban mejores condiciones en cuanto a tamaño (1 cm aprox), ausencia de vitrificación y de malformaciones en las hojas. Estos brotes se establecieron en medio basal Nitsch de selección con 12.5 mg/l de kanamicina por un mes.

Se determinó que el porcentaje de sobrevivencia de los brotes transferidos al medio selectivo con kanamicina (12.5 mg/l) fue de 34.9%, respuesta que se mantuvo estable en las diferentes replicas realizadas (Anexo 5Q).

Por otro lado, los controles positivos (tabaco), mostraron un porcentaje de sobrevivencia de 63.4%.

Tanto los brotes de *P. mollissima*, como los de *N. tabacum* var *Xhanti*, se mantuvieron en medio selectivo con kanamicina durante los 2 meses, siguientes a la transferencia. (Figura 11).



Figura 11. Plantas transformadas de 3 meses de edad en medio selectivo con 12.5 mg/l de kanamicina. A. *P. mollissima*. B. *N. Tabacum*.



#### **4.4.2 Evaluación de la integración del gen *npt II* en plantas de *P. mollissima***

Para comprobar que las plantas sobrevivientes al medio selectivo con kanamicina habían incorporado el gen *npt II* en el genoma vegetal, se eligieron 10 muestras al azar por cada réplica, estas muestras eran plantas de *P. mollissima* regeneradas a partir de discos de hoja infectados; además se tomaron 5 controles negativos que eran plantas de *P. mollissima* obtenidas de los explantes no infectados.

Se realizó PCR y se comprobó mediante electroforesis que los controles no mostraron integración de este gen. En las plantas sobrevivientes se encontró que el gen *npt II* se integró (Figura 12) aunque no en todas las plantas evaluadas : en la réplica 1, 2 plantas; réplica 2, 3 plantas y réplica 3, 2 plantas.

Para el caso de las plantas regeneradas de tabaco que sirvieron como control positivo de la transformación genética, se hizo el mismo procedimiento descrito anteriormente para las de *P. mollissima* . Todos los brotes evaluados a excepción de los controles, demostraron la integración del gen *npt II*.

#### **4.4.3 Evaluación de la expresión del gen $\beta$ -*gus* en plantas de *P. mollissima***

Esta evaluación se realizó mediante tinción histoquímica para determinar la reacción de la enzima  $\beta$ -glucoronidasa con el sustrato X-GLUC, que tiene como consecuencia la coloración azul del tejido vegetal.

Se eligieron 10 muestras al azar por cada réplica, estas muestras eran plantas de *P. mollissima* regeneradas a partir de discos de hoja infectados;

además se tomaron 5 controles negativos que eran plantas de *P. mollissima* mantenidas en un medio sin kanamicina.

Se determinó que a excepción de los controles, todas las muestras resultaron positivas, es decir el tejido tomó una coloración azul (Figura 13). Cabe resaltar que la coloración mas intensa se presentó cerca al tejido vascular de las hojas de las plantas evaluadas.

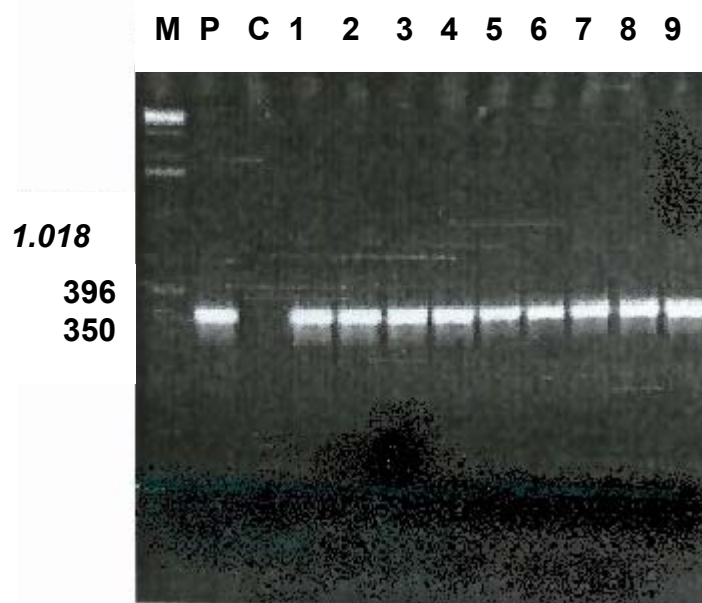


Figura 12. Detección de la integración la integración del gen *npt II* en plantas de *P.mollissima*. Los números representan muestras. (M) Marcador 1-kb DNA Leader. (P) Control positivo. (C) Control negativo.

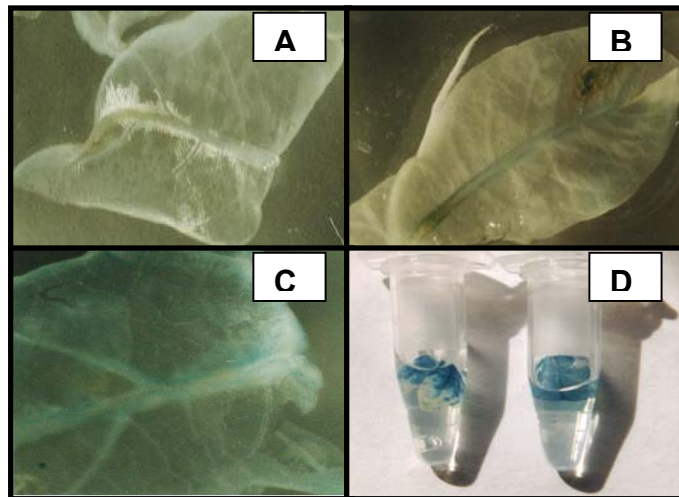


Figura 13. Hojas de *P.mollissima*, con expresión del gen  $\beta$ -*gus*, mediante tinción histoquímica. A. Control. B. Expresión hacia el tejido vascular. C y D. Expresión en el tejido foliar.

## 5. DISCUSION

### 5.1 EVALUACION DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE KANAMICINA SOBRE LA REGENERACIÓN DE LOS DISCOS DE HOJA DE *P. mollissima* NO INFECTADOS CON *Agrobacterium tumefaciens*

El objetivo de este ensayo fue determinar la concentración de kanamicina requerida para seleccionar los tejidos transformados, de tal forma, la toxicidad de este antibiótico y los efectos negativos sobre el tejido vegetal se hicieron evidentes en el ensayo.

La ausencia de respuesta organogénica y muerte del explante en todos los tratamientos a excepción del control (Figura 5), pone de manifiesto una alta susceptibilidad de *Passiflora mollissima* a la kanamicina. Observaciones similares reportaron Maximova *et al.*, (1998) para tejidos de manzana y Yu *et al.*, (2001) para tejidos de papaya, en los que igualmente se observó una alta susceptibilidad a este antibiótico.

Lo anterior puede ser explicado por el efecto inhibitorio de este antibiótico sobre la síntesis de proteínas, ya que afecta sitios críticos del complejo de traducción (Davies, 1980), de igual manera, impide el ensamblaje de complejos de proteínas necesarias para la fotosíntesis (Eu, *et al.*, 1998), hecho que explica la clorosis y muerte de los explantes en este ensayo.

## 5.2 EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS HORMONALES EN LOS PROCESOS DE REGENERACIÓN VIA ORGANOGÉNESIS DE DISCOS DE HOJA DE *Passiflora mollissima*

Para los tratamientos en general, a excepción del tratamiento 21, fue notable el hecho de la baja frecuencia de producción de brotes por explante (Figura 6).

Ahora bien, en el tratamiento 21 estimado como el mejor para la obtención de brotes, el medio de cultivo estaba suplementado con 13.32  $\mu\text{M/l}$  de BA; la adición exclusiva de BA para la obtención de brotes, es consistente con otros trabajos de *Passifloras* (Mourad-Agha y Dexheimer, 1979; Scorza y Janick, 1980; Kantharajah y Dodd, 1990). Vale la pena anotar, que no fue necesaria la aplicación de kinetina para obtener un alto número de regenerantes, aunque en el trabajo desarrollado por Ovalle (1995), se reportó que el mejor tratamiento para obtener respuesta organogénica a partir de discos foliares de *P. mollissima* es en medio Nitsch suplementado con 13.32  $\mu\text{M/l}$  de BA y 9.29  $\mu\text{M/l}$  de kinetina.

Así mismo, se observó un mayor número de brotes desarrollándose en los bordes del explante, hecho que podría explicarse por el daño mecánico como estímulo efectivo para inducir células competentes para la regeneración (Horsch *et al.*, 1985; Draper *et al.*, 1988; Kahl y Weising, 1993). La respuesta a heridas es probablemente la base biológica de la proliferación y regeneración de las células somáticas, porque al parecer esta herida en el borde del disco no solamente es susceptible a la infección con *Agrobacterium* sino también es un sitio de rápida división celular y por ende de inducción de brotes, proporcionando un excelente tejido blanco para la transformación y regeneración del mismo grupo de células (Potrykus, 1991).

De igual manera, un alto número de brotes se desarrollaron en secciones del tejido que comprometían la nervadura central hecho que concuerda con lo expuesto por Ovalle (1995) quien observó que el 80% de

los brotes de *P. mollissima* provenían de áreas cercanas al tejido vascular. Kantharajah y Dodd (1990) y Carnier y Carneiro (1994), plantearon que la parte central de la vena foliar posee un elevado potencial organogénico, lo que podría explicarse ya que las hormonas se transportan vía haces vasculares, lo que tendría como consecuencia una mayor concentración de estas sustancias en este tejido; además aunque las citoquininas se sintetizan en su mayoría en las raíces, también pueden sintetizarse en los órganos aéreos y tejidos meristemáticos (Azcon y Talon, 2001) en donde en principio podrían ejercer un estímulo de regeneración.

Por otro lado, la clorosis, vitrificación y enanismo de los brotes en los tratamientos en donde se combinó 13.32  $\mu\text{M/l}$  de BA con kinetina, sugiere que un exceso en este regulador de crecimiento tiene efectos negativos sobre la producción y desarrollo de los brotes, ya que el BA específicamente influye sobre la actividad metabólica en general de la planta, afectando procesos como la síntesis de proteínas (Staden y Crouch, 1996).

Hay que resaltar, que la producción de brotes se vio favorecida por la edad de la planta, ya que por ser tejidos juveniles poseen una alta actividad meristemática y por ende un mayor potencial organogénico (Roca y Mroginski, 1991).

Por otra parte, los tratamientos 16, 17 y 18, presentaron los valores más altos de callo con respecto a los demás y la producción de brotes no se vio favorecida, hecho que concuerda con lo descrito por Ovalle (1995), quien reportó que el promedio mayor de callos se obtenía en los tratamientos en los que sólo se adicionaba BA, para este caso al tratamiento 16 con mayor promedio sólo se le adicionó 8.88  $\mu\text{M/l}$  de BA.

Esta aparición de masas de tejido indiferenciado, se explica al tener en cuenta que el cefotaximne puede inducir la producción de metabolitos con actividad de reguladores de crecimiento, lo que estimularía la producción de callos como lo reportado por D'Utra vaz, *et al.*, (1993) en *P. edulis*.

Sin embargo, muchos de los efectos fisiológicos de las citoquininas pueden explicarse por su interacción con las auxinas, esta interacción se manifiesta a nivel bioquímico, ya que ambos reguladores de crecimiento participan en el nivel mutuo de su abundancia. De esta forma, la manipulación de los niveles de citoquininas causa incremento en los niveles de auxinas endógenas, (Haberer y Kieber, 2002) y aunque se desconocen las bases bioquímicas de este efecto, se sugiere que las citoquininas inhiben la conjugación del ácido indolacético libre (Azcon y Talon, 2001), por lo tanto la concentración de auxinas endógenas estimularía la producción de tejido indiferenciado.

De igual forma, esta alta concentración de auxinas endógenas favorecería la aparición de raíces en los explantes y el posterior enraizamiento de los brotes en medio sin reguladores de crecimiento.

Además, Bhaskaran y Smith (1990) y Chaudhury y Rongda, (2000) plantearon que los requerimientos de reguladores de crecimiento exógenos necesarios para obtener una respuesta organogénica, probablemente dependen de los niveles específicos de hormonas endógenas.

En general, dentro de los tratamientos se observaron diferentes respuestas organogénicas de los explantes a pesar de ser mantenidos en las mismas condiciones, lo que permite sustentar la hipótesis de la influencia del genotipo sobre la regeneración; aspecto que ya había sido reportado por Ovalle (1995) para *P. mollissima*.

Por otro lado, los explantes no infectados con *Agrobacterium tumefaciens* presentaron una respuesta organogénica superior a los no infectados, estas observaciones, junto con las de Forero (1999), quien reportó que el uso de medio Nitsch con 13.32  $\mu$ M/l de BA y 9.29  $\mu$ M/l de kinetina, no resultó apto para regenerar discos de hoja de *P. mollissima* infectados con *Agrobacterium tumefaciens*, demuestran que el proceso de infección influye directamente sobre la respuesta organogénica de los explantes.

La causa de esta reducción en la eficiencia de regeneración en los tejidos infectados, puede estar relacionada con el grado de respuesta hipersensitiva de los discos de hoja de *P. mollissima*, que como se ha reportado en otras especies, por ejemplo en cartamus, tiene como consecuencia una reducción en la frecuencia de regeneración (Orlikowska, *et al.*, 1995). Sin embargo, esta disminución en la eficiencia de regeneración no es tan evidente en otros trabajos, lo que podría indicar que esta respuesta puede presentar especificidad hacia ciertos grupos taxonómicos: familias o especies (Hassan *et al.*, 1993).

Además, la infección induce respuestas en las células periféricas que pueden afectar sistemáticamente la regeneración de células adyacentes y células organogénicas más distantes (Orlikowska, *et al.*, 1995).

Al parecer, este evento es ocasionado por un incremento en la producción de fenoles a causa de la infección que interfiere en el proceso de regeneración (Mukhopadhday *et al.*, 1992); estos fenoles se producen como una respuesta de defensa a la infección bacteriana, que en condiciones naturales es la rápida activación de reacciones que llevan a la muerte de la célula hospedera, por un incremento en la concentración de moléculas con propiedades antimicrobianas (Buchanan, *et al.*, 2000), como compuestos fenólicos responsables de la oxidación, algunos de los cuales, intervienen en reacciones de autotoxicidad y causan muerte celular (López y Duque, 1987; Stump y Conn, 1989).

Por otra parte, se presentó oxidación de los discos foliares superior al 50%, en la mayoría de los tratamientos evaluados (figura 10). Este hecho puede explicarse teniendo en cuenta que cuando se presenta una herida en el tejido y esta se pone en contacto con el oxígeno, los fenoles se oxidan a quinonas, que son tóxicas para el desarrollo del explante y favorecen la oxidación de los discos foliares (Hodson y Cancino, 1991).



Adicionalmente, Kantarajah y Dodd (1990), reportaron oxidación en diferentes áreas de la hoja como consecuencia del medio de cultivo, hecho que concuerda con lo descrito por Biondi y Thorpe (1981), quienes plantearon que algunas especies tienden a oxidarse cuando se cultivan en medios ricos en sales minerales. Sin embargo, algunos autores han reportado que el medio de cultivo Nitsch, al ser bajo en amonio, evita la oxidación de los tejidos (Bonga, 1982; Guerrero, *et al.*, 1990).

Otro aspecto que pudo incrementar la oxidación de los tejidos, fue el uso de hipoclorito para la desinfección superficial de las hojas, ya que se ha demostrado toxicidad de esta sustancia para los tejidos vegetales, aunque sea usado en bajas concentraciones (Bonga, 1982). Adicionalmente, Ovalle (1995) reportó que en discos foliares de *P.mollissima* la oxidación se hizo evidente en tejidos seccionados una vez se realizó la desinfección.

Para concluir, el ensayo de regeneración organogénica de *P.mollissima*, demostró la conveniencia de modificar la concentración hormonal determinada para la regeneración de discos foliares de esta especie, ya que como se describió anteriormente, las respuestas organogénicas del tejido vegetal se ven influenciadas por las condiciones que se generan como consecuencia de la infección bacteriana.

### **5.3 EVALUACION DE LA TRANSFORMACIÓN GENETICA DE *P.mollissima***

La eficiencia de transformación y la producción de plantas transgénicas depende del desarrollo de protocolos confiables de inoculación, cocultivo, de la forma de regeneración y selección del tejido vegetal potencialmente transformado, del genotipo, la cepa de *Agrobacterium* utilizada y el plásmido vector (Venkatachalam, *et al.*, 1998).

La habilidad para controlar una respuesta hipersensitiva de los explantes al cocultivo con *A. tumefaciens* es un punto crítico en la eficiencia de transformación (Lemmetvienen, 1998). En este caso el tiempo (3 días) y las condiciones que ya habían sido determinadas por Forero (1999) y que concuerdan con trabajos en *Brassica* (Narasimhulu, *et al.*, 1992), cartamus (Orlikowska, 1995) y alfalfa (Chabaud, *et al.*, 1988). En varias especies un periodo mayor a 4 días causa lesiones en el explante por contaminación bacterial, por lo tanto la frecuencia de transformación se reduce (Muthukumar, *et al.*, 1996; Venkatachalam, *et al.*, 1998).

El porcentaje de plantas tolerantes a kanamicina, podría explicarse por que la selección del tejido en etapas avanzadas de desarrollo, puede aumentar las posibilidades de sobrevivencia al agente selectivo, ya que se da mas espacio a la división de las células transformadas (Van Wordragen., *et al.*, 1992). Sin embargo, esta tardanza en el proceso de selección podría favorecer a los brotes no transformados (Metz, *et al.*, 1995).

Además dados los resultados del ensayo de susceptibilidad a kanamicina, no se establecieron los explantes inmediatamente después del cocultivo, ya que se ha determinado que la extrema sensibilidad de algunas especies a la kanamicina puede afectar la regeneración incluso de brotes transformados (Hassan *et al.*, 1993).

Como se ha observado en *Brassica campestris*, la frecuencia de brotes transgénicos está fuertemente influenciada por el tipo de células involucradas en la transformación (Mukhopadhyay, *et al.*, 1992). Así, las células con un metabolismo activo y una alta división celular, condiciones necesarias para que haya integración del DNA foráneo (Potrykus, 1991; Ahn, *et al.*, 2001), pueden no ser la mismas para aquellas con competencia celular para la organogénesis, por lo tanto los brotes regenerados pueden tener origen en el tejido no transformado (Mukhopadhyay, *et al.*, 1992).

En este trabajo se observó deformación y vitrificación en brotes mantenidos en medio selectivo con kanamicina, hecho que ya había sido

reportado por Manders *et al.*, (1994), en brotes transformados de *P. edulis*. Lo anterior es una respuesta del tejido vegetal a los efectos tóxicos del sulfato de kanamicina. Grahan, *et al.*, (1998), reportó efectos deletéreos de este antibiótico sobre la morfogénesis y el desarrollo de plantas transformadas, de igual manera Maximova, *et al.*, (1998), observó en plantas de manzana que el crecimiento de plántulas transformadas se detuvo en presencia de este antibiótico.

La coloración más intensa en el tejido vascular de las hojas sometidas a tinción histoquímica para detección del gen  $\beta$ -*gus*, concuerda con lo descrito Maximova, *et al.*, (1998) para manzana, quienes reportaron los niveles de expresión más altos de los genes marcadores en estos tejidos, ya que hay una alta densidad de células en el tejido vascular de la hoja con respecto a un bajo número en otras áreas o a que las células vasculares tienen características morfológicas y bioquímicas que inducen a una alta sensibilidad a *Agrobacterium* (Maximova, *et al.*, 1998).

Finalmente, utilizando el presente método de transformación junto con la concentración hormonal determinada en este trabajo, se obtuvieron plantas transgénicas de *P. mollissima*, que mostraron la integración estable de los genes marcadores. Este resultado, abre el camino a nuevas investigaciones encaminadas al uso de genes de interés agronómico en esta especie.

## 6. CONCLUSIONES

Las plantas de *Passiflora mollissima* son altamente susceptibles a la kanamicina.

La infección con *Agrobacterium tumefaciens*, influye de forma negativa sobre la regeneración organogénica de los discos de hoja de *Passiflora mollissima*.

La mejor respuesta organogénica a partir de discos de hoja de *Passiflora mollissima infectados* con *Agrobacterium tumefaciens*, se obtiene en medio Nitsch suplementado con BA 13.32  $\mu\text{M}$  /l.

Es posible obtener plantas de *Passiflora mollissima*, mostrando expresión de los genes marcadores, utilizando las condiciones de regeneración y transformación sugeridas en este estudio.

## 7. RECOMENDACIONES

Confirmar la presencia del gen  $\beta$ -gus mediante PCR, así como, pruebas de Southern blotting para  $\beta$ -gus y *npt II* .

Evaluar de forma independiente el efecto del cefotaxime sobre la regeneración de *Passiflora mollissima*.

Realizar futuros experimentos de transformación utilizando genes de interés agronómico para esta especie.

Realizar trabajos en donde se emplee la selección positiva como alternativa para seleccionar el tejido transformado, dada la alta susceptibilidad de *P. mollissima* a el antibiótico Kanamicina utilizado en este estudio.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Ahn, S., Park, Y., Shin, D., Woo, S.Y., Park, H.S., Choi, J.W., and Sul, W.I.** 2001. Genetic transformation of *Pupulus nigra* x *maximoviczii* using *Agrobacterium tumefaciens* harboring antisense OMT gen. J. Plant Biotechnology. 3 (3): 135-140.
- Akama, K., H. Shiraishi, S. Ohta, K. Nakamura, K. Okada, and Y. Shimura.** 1992. Efficient transformation of *Arabidopsis thaliana*: comparison of the efficiencies with various organs, plant ecotypes and *Agrobacterium* strains. Plant Cell Rep. 12: 7-11.
- Ammirato, P.V.** 1986. Control and expression of morphogenesis in culture. En: Plant tissue and this agricultural applications (Withers L.A & Anderson P.G eds), University Press Cambridge. Pp. 23-45.
- Amougne, N., Gopalan, H. and Bytebier, R.** 1993. Leaf regeneration of Passion fruit. African Crop Science journal. 1 (2): 22-28.
- APS.** 1998. Compendium of tropical fruit diseases. APS Press. 88 p.
- Ariza, E. y Rojas, A.** 1975. Estudios básicos sobre un barrenador en la flor de la curuba (*Passiflora mollissima*). Tesis de pregrado. Facultad de Agronomía. Universidad Pedagógica y tecnológica de Colombia. Tunja. 120p.
- Andean Community.** 1998. Andean fruits and vegetables for the world. FAO.80p.
- Azcon, B. y Talon, M.** 2001. Fisiología y bioquímica vegetal. Ed. Mc Graw Hill Interamericana de España. Pg. 381-386, 493-514.
- Babic, V., Datla, R.S., Scoles, G.J. and Keller, W.A.** 1998. Development of an efficient *Agrobacterium*- mediated transformation system for *Brassica carinata*. Plant Cell Rep. 17: 183-188.
- Baker B, Zambryski P, Staskawicz B, Dinesh-Kumar SP.** 1997. Signaling in plant-microbe interactions. Science 276: 726-33.
- Barriga, H.** 1992. Flora medicinal de Colombia. Instituto de ciencias naturales. Universidad nacional. Bogotá. Colombia. Vol 3. 250p.

**Barton, J.E. and Dracup, M.** 2000. Genetically modified crops and the environment. *Agronomy Journal*. 92: 797-803.

**Benedicksoon, Y., Kohler, F. and Schieder, O.** 1991. Transient and stable expression of marker genes in cotransformed petunia protoplast in relation to x-ray and U.V. irradiation. *Transgenic Research*. 18: 38-44.

**Bhaskaran, S and Smith, Rh.** 1990. Regeneration in cereal tissue culture: a review. *Crop Sci*. 30:1328-1336.

**Bonga, J.** 1982. Vegetative propagation of mature trees by tissue culture. *Proc. Costed Symp. On Tissue Culture of economically import plants*. Ed. A.N. Rao. Singapore. Pp 190-196.

**Brasileiro, ACM.** 1998. Neomicina fosfotransferasa II (NPTII). In: Brasileiro, A.C.M and Carneiro, V.T.C. (Eds). *Manual de transformacao genetica de plantas*. Brasilia, EMBRAPA-SPI, EMBRAPA-Cenargen. P 143-154.

**Brasileiro, ACM., y Dusi, DMA.** 1999. Transformacao genética de plantas. In: Torres, AC., Caldas, LS., Buso, JA. (Eds). *Cutura de tecidos e transformacao genética de planats*. Brasilia, EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH. P. 679-735.

**Buchanan, B., Gruissem, W. and Jones, R.** 2000. *Biochemistry & Molecular Biology of plants*. Ed. American society of plant physiologist. 1365p.

**Caicedo, G. y González, V.** 1997. La curuba de castilla. Jardín Botánico de Bogota José Celestino Mutis. *Notas Divulgativas*. Bogota, Colombia. 25p.

**Cancino, G.** 2001. Tissue culture ad *Agrobacterium*-mediated transformation studies in passiflora. *Tesis de doctorado*. University of Nottingham. U.K 187 p.

**Carman, J.G.** 1990. Embryogenyc cells in plant tissue cultures: ocurrence and behavior. *In vitro cell Dev. Biol.* 26:746-753.

**Carnier, M and Carneiro, M. L.** 1994. Tissue culture studies on species of *Passiflora*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 36: 211-217.

**Castle, L and Morris, R.** 1994. Trasient Expression Assays using GUS constructs and fluorometric detection for analysis of T-DNA transfer. *Plant Molecular Biology Manual*. Kluwer Academic Publishers. Belgium. 5:1-16.

**Cordero, M., Jiménez, S., Quesada, M.A., Mercado, J.A and Pliego, F.** 1999. Transformación genética de fresa combinando la técnica biobalística y

la infección con ***Agrobacterium***. Reunión nacional de la sociedad española de fisiología vegetal. VI congreso hispano-Luso de fisiología vegetal. Sept.19-22.

**Chabaud, M., Passiatore, J.E., Cannon, F. and Buchanan-Wollaston, V.** 1988. Parameters affecting the frequency of kanamycin resistant alfalfa obtained by ***Agrobacterium tumefaciens*** mediated transformation. Plant Cell Rep. 7: 512-516.

**Chakrabarty, K., Viswakarma, N., Bhat, S.R., Kirti, P.B., Singh, B. D. and Chopra, V.L.** 2002. Agrobacterium-mediated transformation of cauliflower optimization of protocol and development of Bt-transgenic cauliflower. J. Biosci. 27 (5): 495-502.

**Chaudhury, A and Rongda, Q.** 2000. Somatic embryogenesis and plant regeneration of turf-type bermudagrass: Effect of 6-Benzyladenine in callus induction medium.

**Chilton, M.** 1983. Un vector para introducir genes en vegetales. Investigación y Ciencia. Agosto: 22-27

**Christianson, M.L. and Warnick, D.A.** 1988. Organogenesis *in vitro* as developmental process. Hort. Sci. 23(3). 515-519.

**Cronquist, A.** 1981. An integrated system of classification of flowering plant. Columbia. Univ. Press. New York. 820-870 p.

**Davis, E.** 1980. Aminoglycoside-aminocyclitol antibiotics and their modifying enzymes. In: Lorian, V (Eds). Antibiotic laboratory medicine. Williams and Wilkins. Baltimore. Pg. 474-489.

**Davis, L., Kuehl, M and Battey, J.** 1994. Basic methods in molecular biology. Connecticut. Segunda edición. Appleto & Lange. 777p.

**Desay, H. and Mehta, A.** 1985. Changes in polyamine levels during shoot formation, root formation, and callus induction in cultured ***Passiflora*** leaf disc. J. Plant Physiol. 119 (1): 45-53.

**Dessaux, Y., A. Petit, S. K. Farrand, and P. J. Murphy.** 1998. Opines and opine-like molecules involved in plant-***Rhizobiaceae*** interactions, p. 173-197. In H. P. Spaink, A. Kondorosi, and P. J. J. Hooykaas (ed.), The ***Rhizobiaceae***: molecular biology of model plant-associated bacteria. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.



**Domínguez, A., Guerri, J., Cambra, M. Navarro, L., Moreno, P. and Peña, L.** 2000. Efficient production of transgenic citrus plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. *Plant Cell. Rep.* 19: 427-433.

**Drew, R.a.** 1991. In vitro culture of adult and juvenile bud explants of *Passiflora* species. *Plant Cell. Reports.* 26: 23-29.

**D´Utra-Vaz, F., Santos, A.V.P., Manders, G., Cocking, E.C., Davey, M.R. and Power, J.B.** 1993. Plant regeneration from leaf mesophyll protoplast of the tropical woody plant, passion fruit ( *Passiflora edulis* var *flavicarpa* Degener: The importance of antibiotic cefotaxime in the culture medium. *Plant Cell. Rep.* 12 (4): 220-225.

**Dye F, Berthelot K, Griffon B, Delay D, Delmotte FM.** 1997. Alkylsyringamides, new inducers of *Agrobacterium tumefaciens* virulence genes. *Biochimie* 79:3-6.

**Enríquez, G.A., Vásquez, R.I., Prieto, D.L., Perez, M. and Selman, H.** 1997. Genetic transformation of sugarcane by *Agrobacterium tumefaciens* using antioxidants compounds. *Biotechnologia aplicada.* 14: 169-174.

**Enríquez, O., Vásquez, R. I., Prieto, D.L., De La Riva, G.A and Selman, H.** 1998. Herbicide resistant sugarcane (*saccharum officinarum* L.) plant by *Agrobacterium*- mediated transformation. *Planta* 206: 20-27.

**Escobar, L.** 1988. Flora de Colombia. Passifloraceae. Tomo10. Ed. Pinto y Lozano. Instituto de ciencias naturales. Museo de historia natural. Universidad nacional de Colombia. Pg. 51-88.

**Escobar, L.** 1991. La sistemática y la evolución de las passifloras. Primer simposio internacional de passifloras. Palmira. Colombia.

**Eu, Y.J., Lee, M.H., Chang, H.S., Rhew, T.H., Lee, H.Y., Lee, C.H.** 1998. Chlorophyll fluorescence assay for kanamycin resistance screening in transgenic plants. *Plant Cell Rep.* 17: 189-194.

**Falconi- Borja, C.** 2001. Reguladores Biológicos de plagas, enfermedades y malezas en cultivos ecuatorianos. BIOSOFTWARE (Department of Agriculture, Technology and Environment). Quito. Ecuador.

**Ferreira, F.** 1991. *Passiflora* en Brasil. Primer simposio internacional de passifloras. Palmira. Colombia.P.32-40.

**Forero, A.** 1999. Evaluación de algunas condiciones para transformación genética de la curuba de castilla (*passiflora mollissima* H.B.K. Bailey)

usando *Agrobacterium tumefaciens*. Tesis de pregrado. Biología. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia. 150p.

**Galun, N. and Breiman, A.** 1998. Transgenic plants. Imperial collage press. Londres. U.K. 220p.

**Gamborg, O.L.** 1991. Media Preparation. Plant tissue and organ culture manual (Linsey, K. ed). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. A1: 1-24.

**Guerrero, E., Hodson, E. y Cancino, G.** 1990. Cultivo de tejidos vegetales en especies promisorias de la familia passifloraceae. Primer congreso de investigación en la universidad Javeriana. Bogotá. Colombia. Pg.516-524

**Graham, M., Ko,L., Ardí, V., Robinson, S., Sawyer, B., O'Hare, T., Jobin, M., Dalher, J., Underhill, S. and Smith, M.** 1998. The development of blackhead resistant pineapples through genetic engineering. In: Abstracts of third International pineapple symposium. Pattaya, Thailand.11pp.

**Grierson, D. and Covey, S.**1991. Biología molecular de las plantas. Ed. Acribia. Zaragoza. España. 320p.

**Gutiérrez-E, M.A., Luth, D. And Moore, G.A.** 1997. Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation in citrus and production of sour orange (*Citrus aurantium* L.) plants expressingn the coat protein gene of citrus tristeza virus. Plant Cell Rep. 16: 745-753.

**Haberer, G. and Kieber, J.** 2002. Cytokinins. New Insights into a classic Phytohormone. Plant Physiol. 128: 354-362.

**Han, K., Meilan, R., Ma, C. and Strauss, R.** 2000. An *Agrobacterium tumefaciens* transformation protocol effective on a variety of cottonwood hybrids (genus *Pupulus*). Plant Cell Reports. 19: 315-320.

**Hansen, H.** 1987. Aspectos relevantes del manejo precosecha, cosecha y pos-cosecha en el desarrollo de las exportaciones de frutas tropicales. En: producción, manejo y exportación de frutas tropicales de América latina. Federación nacional de cafeteros de Colombia. Organización de las naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. Compilación: Sandra Cuellar de García. Ed. Presencia Ltda. Bogota, Colombia. 80p.

**Hartmann, H., Kester, D., Davies, F and Geneve, R.** 1997. Plant Propagation: Principles and Practices. Ed. Prentice Hall. New Jersey. 770p.

**Hassan, M., Swartz, H.J. Inamine, G. and Mullineaux, P.** 1993. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of several genotypes and recovery of transformed plants. Plant. Cell. Tiss. Organ. Cult. 33: 9-17.

**Herrera-Estrella, L., Teeri, T and Simpson, J.** 1988. Use of reporter genes to study gene expression in plants cells. En: Gelvin S., Schilperoort, D., Verma. Eds. Plant Molecular Biology Manual. 1ª edición. Ed. Kluwer Acad. Dordrecht.

**Herrera-Estrella, L., Leon, P., Olsson O. and Teeri, T.** 1994. Reporter genes of plants. Plant Molecular Biology Manual. C2: 1-32. Kluwer Academic Publishers. Belgium.

**Herrera-Estrella, L., and Simpson L.** 1988. Foreign gene expression in plants. En: C.H. Shaw, ed. Plant Molecular Biology: A Practical Approach. IRL Press, Oxford. Pp. 131-160.

**Heywood, V. H.** 1985. Las plantas con flores. Ed. Reverté. Barcelona, España. 350p.

**Hodson y Cancino.** 1992. Micropropagación de la "curuba" *Passiflora mollissima* (H.B.K.) Bailey. (PASSIFLOREACEAE). Cuadernos divulgativos. No. 27. junio. Bogotá. Colombia. 45p.

**Hodson, E.** 1999. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Passiflora edulis* for Potyvirus resistance. Tesis de doctorado. University of Nottingham. U.K. 120p.

**Holford, P. and H.J. Newbury.** 1992. The effects of antibiotics and their breakdown products on the *in vitro* growth of *Antirrhinum Majas*. Plant Cell Rep. 11: 93-96.

**Hooykaas, P. and Shilperoort, R.** 1992. *Agrobacterium* and genetic engineering. Plant Mol. Biol. 19:15-38.

**Hooykaas, P and Beijersbergen, A.,** 1994. The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. Ann. Rev. Phytopathol. 32: 157-179.

**Horsch, R. B. Fry, J.E., Hoffmann, N.L. Eicholtz, D., Rogers, S.G and Fraley, R.T.** 1985. A simple and general method for transferring genes in to plants. Science. 227: 1229-1231.

**Hughes, M.** 1996. Plant Molecular Genetics. Ed. Longman. England. U. K. Pp. 77-103.

**Hughes, M. and Beijersbergen, A.** 1994. The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. Annu. Rev. Phytopathol. 32:157-179.

**Ibarra, G.** 2002. Arancel armonizado de Colombia. Ed. Legis. Colombia. Pg. 193.

**ICA** (Instituto colombiano Agropecuario). 1976. Frutales. Vol. 2. 420 pp.

**James, D., Uratsu, S., Cheg, J., Negri, P., Viss, P and Dandekar, A.** 1993. Acetosyringone and osmoprotectants like betaine or proline synergistically enhance *Agrobacterium* -mediated transformation of apple. Plat Cell Report. 12: 559-563.

**Jaramillo, E.** 1993. Entomofauna causante de problemas en la curuba (*P. mollisima* H.B.K. Bailey) en el Gran Caldas. Agricultura tropical-Frutales. Colombia. 90pp.

**Jaramillo, A. J.** 1957. Primeros resultados de un ensayo sobre el cultivo de la curuba (*Passiflora sp.*). Agricultura tropical. 13: 301-308pp.

**Jefferson, R:** 1987. Assaying chimeric genes in plan: the *gus* gene fusion system. Plant Mol. Biol. Rep. 5 (4): 387-405.

**Jin, S., Prusti, R.K., Roitsch, T., Ankenbauer, R.G and Nester, E.W.** 1990. The vir A protein ad this is essential For its biological activity. Journal of Bacteriology. 172: 4945-4950.

**Johnson, T. M., and A. Das.** 1998. Organization and regulation of expression of the *Agrobacterium virulence* genes, p. 265-279. In H. P. Spaink, A. Kondorosi, and P. J. J. Hooykaas (ed.), The *Rhizobiaceae*: molecular biology of model plant-associated bacteria. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

**Kahl, G and Weising, K.** 1993. Genetic engineering of plant cells. In: Biotechnology. Second edition. Vol. 2. genet6ic fundamentals and genetic engineering. Rehm H.J. and Reed, G. (eds). VHC publishers. Weinheim, Germany. Pp.547-625.

**Kantharajah, A.S and Dodd, A.W.** 1990. *in vitro* micropropagation of *Passiflora edulis* (Purple Passion fruit). Annals of Botany. 65:337-339.

**Kalogeraki, V. S., and S. C. Winans.** 1998. Wound-released chemical signals may elicit multiple responses from an *Agrobacterium tumefaciens* strain containing an octopine-type Ti plasmid. J. Bacteriol. 180:5660-5667.

**Kar, s., Johnsons, T.M., Nayak, P and Sen, S.K.** 1996. Efficient transgenic plant regeneration through *Agrobacterium*-mediated transformation of chickpea (*Cicer aritinum* L). Plant Cell Rep. 16: 32-37.

**Kawata, K., Ushida, C., Kawai, F., Kanamori, M and Kuriyama, A.** 1995. Micropropagation of passion fruit from subcultured multiple shoot primordial. J Plant Physiol. 147: 281-284.

**Kunpei, K.** 1995. Micropropagation of Pasi3n fruti from subcultured multiple shoot primordial. J. Plant Physiology. 147: 35-38.

**Lai, R and Lai, S.** 1993. Genetic engineering of plants for crop improvement. CRC Press. Boca Rat3n, F.L. 332 p.

**Lee L-Y, Gelvin SB. and Kado Ci.** 1999. pSa causes oncogenic suppression of *Agrobacterium* by inhibiting VirE2 protein export. J. Bacteriol. 181:186-96

**Lindsey, K y Jones, M.G.K.** 1989. Biotecnolog3a Vegetal Agr3cola. Ed. Acribia. Barcelona. Espa3a. 220p.

**L3pez, E y Duque, A.** 1987. An3lisis de compuestos fen3licos de hojas, callos, c3lulas en suspensi3n de caf3 (*Coffea arabica*). Tesis de pregrado. Facultad de qu3mica. Universidad Nacional de Colombia. Bogot3. Colombia. 100p.

**L3pez, C.** 1990. Medios de cultivo. En: Fundamentos teorico-pr3cticos del cultivo de tejidos vegetales. Rosell, H.C. Villalobos, M.V. Eds. Organizaci3n de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentaci3n. Pg.15-19.

**Madigan, T., Martinko, M., Parker, J.** 1997. Brock Biology of Microorganisms. Octava edici3n. Ed. Prentice may, Inc. New Jersey. 450pp.

**Manders, G., Otoni, W.C., D3tra-vaz, F.B., Blachshall, N.W., Power, J.B. and Davey, M.R.** 1994. Transformation of Passion fruit (*Passiflora edulis* var *flavicarpa* Degener) using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Rep. 13 (12): 697-702.

**Maximova, S., Abhaya, M., Dandekar, M and Gultinan, M.** 1998. Investigation of *Agrobacterium* mediated transformation of apple using green fluorescent protein: high transient expresi3n and low stable transformation suggest that factors other than T-DNA transfer are rate-limiting. Plant Molecular Biology. 37: 549-559.

**Metz, T.A., Dixit, R. And Earle, E.D.** 1995. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) and cabbage (*B. oleracea* var *capitata*). Plant Cell Report. 15: 287-292.

**Morales, J.** 2003. Ministerio de Agricultura. Biblioteca general. Bogota Colombia. *Comunicación personal*.

**Moran-Robles, M.J.** 1978. Multiplication végétative *in vitro*, des bourgeons axillaires de *passiflora edulis* var. *flavicarpa* et de *Passiflora mollissima* Bailey. Fruits. 33(10):693-699.

**Moran-Robles, M.J.** 1979. Potentiel morphogénétique des entrenoeuds de *Passiflora edulis* Var. *flavicarpa* Degener et *P. mollissima* Bailey en culture *in vitro*. Trimestre Juillet-Setembre. Turrialba 29 (3): 224-228.

**Mukhopadhyay, A., Arumugam, N., Nandakumar, P., Pradhan, A., Gupta, V. and Pental, D.** 1992. *Agrobacterium* mediated genetic transformation of oilseed *Brassica campestris*: Transformation frequency is strongly influenced by the mode of shoot regeneration. Plant Cell Rep. 11: 506-513.

**Murashige, T. and Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-479.

**Muthukumar, B., Mariamma, M., Veluthambi, K and Gnanam, A.** 1996. Genetic transformation of cotyledon explants of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Rep. 15: 980-985.

**Mourad N. and Dexheimer, J.** 1979. Ultrastructural studies of diferenciation of conductor element in a culture of *Passiflora quadrangularis* L, tissue callus cultivated in the dark. Cytology. 44 (1): 615-631.

**Narasimhulu, S.B., Kirti, P.B., Mohapatra, T., Prakash, S. And Chopra, V.L.** 1992. Shoot regeneration in stem explants and its amenability to *Agrobacterium tumefaciens* mediated gene transfer in *Brassica carinata*. Plant Cell Rep. 9: 293-298.

**Nitsch, J., Nitsch, C. and Hamon, S.** 1968. Réalisation expérimentale de l'androgénésé chez divers Nicotiana. Paris. C.R. Soc. Biol. 162: 369-372.

**Orlikowska, T., Cranston, H. and Dyer, W.** 1995. Factors influencing *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and regeneration of the safflower cultivar "centennial". Plant Cell Tissue and Organ Culture. 40: 85-91.

**Orozco, M y Narváez, J.** 1994. Genetic transformation techniques in plant biotechnology. Literatura complementari curso – taller internacional de biología molecular en la investigación agropecuaria. Corpoica. Módulo II: Ingeniería genética y fitomejoramiento. Agosto.

**Ovalle, R.** 1995. Organogénesis *in vitro* de *Passiflora mollissima* (H:B:K) Bailey y *Passiflora ligularis* Juss a partir de discos foliares. Tesis de maestría. Biología. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia. 120p.

**Pacheco, J. Blanco, J. Arenas, E.** 1988. Propagación y mejoramiento de frutales de hoja caduca. Fondo colombiano de investigación y proyectos especiales “Francisco José de Caldas”. Colciencias. Tunja. Boyacá. Colombia. 280p.

**Pierick, R.** 1990. Cultivo *in vitro* de plantas superiores. Ed. Mundi prensa. España. 320p.

**Porsch, P., Jahnke, A. and During, K.** 1998. A plant transformation vector with minimal T-DNA. II. Irregular integration patterns of the T-DNA in the plant genome. Plant molecular Biology. 37: 581-585.

**Potrykus, I.** 1991. Gene transfer to plants: Assesment of Published Approaches and Results. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42: 205-225.

**Roca, W.** 1986. Clonaje de células vegetales *in vitro*- Aplicaciones en la agricultura. Ciencia y tecnología. 4 (1): 14-29.

**Roca, W. and Mroginski, L.A.** 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Centro de investigaciones en agricultura tropical (CIAT). Cali. Colombia. 970p.

**Roderick, A.** 1991. *In vitro* culture of adult ad juvenil bud explants of *Passiflora* species .Plant cell tissue and organ culture. 26: 23-27.

**Rodríguez, V. Y De Almeida, F.** 1995. Rompiendo la dormancia en semillas de curuba (*Passiflora mollissima* H.B.K.Bailey). Efecto de la calidad de la luz, tiempo y temperatura de almacenamiento. Comalfi (Sociedad colombiana de control de maleza y fisiología vegetal). 22 (3) Sep-Dic. 16-18.

**Romero, R.** 1991. Frutas silvestres de Colombia. Instituto Colombiano de Cultura Hispana. Talleres gráficos de la Ed. ABC. 2ª edición. Bogotá. Colombia.

- Salazar, A.** 2000. Evaluación del efecto de la procedencia y el grado de madurez de los frutos de dos especies del género *Passiflora*: *Passiflora mollissima* H.B.K y *Passiflora ligularis* Juss. *Tesis de pregrado*. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia.300p.
- Salisbury, F y Ross, C.** 1994. Fisiología vegetal. Grupo editorial Iberoamérica S.A. México.250p.
- Sambrock, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.** 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press. USA.120pp.
- Scorza, R. and Janick, J.** 1980. In vitro flowering of *Passiflora suberosa* L. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 105 (6): 892-897.
- Schetty, K., Ohshima, M., Murakami, T., Oosawa, K. and Ohashi, Y.** 1997. Transgenic melon (*Cucumis melo* L) and potential expression of novel proteins important to food industry. Food Biotechnology. 11 (2): 111-128.
- Sheng, J. and Citovsky, V.** 1996. *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel. The Plant Cell. 8: 1699-1710.
- Shillito, R., Paszkowski, J., Muller, M. and Potrykus, I.** 1985. high efficiency direct transfer to plants. Biotechnology. 3.1099-1103.
- Staden, J. and Crouch, N.** 1996. Benzyladenine and derivatives-their significance and interconversion in plants. Plant Growth Regulation. 19: 153-175.
- Stump, P and Conn, E.** 1989. Genetic manipulation of plant cells. In: Biochemistry of plants. Academic Press. U.K. Chapter 17. 15: 653-682.
- Suarez, J.R.** 1987. Establecimiento de una explotación comercial de curuba en el municipio de Arcabuco. Memorias perfiles agropecuarios de inversión. Primer seminario taller. ICA. Octubre. Bogotá. Colombia.
- Talero, B y Rivas, R.** 1991. Evaluación de métodos de producción clonal *in vitro* de maracuyá ( *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degenere). *Tesis de pregrado*. Facultad de agronomía. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.105p.
- Tinland, B., Shoumacher, F., Gloeckler, V., Bravo, A.M. and Hohn, B.** 1995. The *Agrobacterium tumefaciens* virulence D2 protein is responsible



for precise integration of T-DNA into the plant genome. EMBO journal 14: 3585-3595.

**Uribe, J.** 1940. Flora de Antioquia. Ed. IMP. Departamental. Medellín. Colombia. 309 p.

**Van Wordragen, M., De Jong, J., Schornagel, J. and Dons, H.** 1992. Rapid screening for host-bacterium interactions in *Agrobacterium*-mediated gene transfer to chrysanthemum, by using the GUS-intron gene. Plant Science. 81: 207-214.

**Vanderplank, J.** 1996. Pasi3n Flower and Pasi3n Fruti. MIT Press, Cambridge, M.A. USA.

**Venkatachalam, P., Geetha, N., Narayanasamipillai, J., Saravanababu and Sita, L.** 1998. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of groundnut (*Arachis hypogaea* L): An assessment of factors affecting regeneration of transgenic plants. J. Plant. Res. 111: 565-572.

**Vidhyasekaran, P.** 1988. Physiology of disease resistance in plants. Crc press. Boca Rat3n. Florida. 1: 34-76.

**Walker, J. and Gingold, E.** 1997. Biolog3a molecular y biotecnolog3a. Segunda edici3nj. Ed. Acribia. Zaragoza. Espa3a. 320p.

**Weaver, R.** 1982. Reguladores de crecimiento de las plantas en la agricultura. Ed. Trillas. M3xico. 622p.

**Winans, S.C.** 1992. Two-way chemical signaling in *Agrobacterium*- plant interactions. Microbiology Reviews. 56: 12-31.

**Xiang, C.** 1999. A mini binary vector series for plant transformation. Plant Mol. Biol. 40: 711-717.

**Yu, T., Yeh, S. and Yang, J.** 2001. Effects of carbenicillin and cefotaxime on callus growth and somatic embryogenesis from adventitious roots of papaya. Bot. Bull. Acad. Sin.42: 281-286

**Yu, C., Huang, S., Chen, C., Deng, Z., Ling, P. and Gmitter Jr, F.** 2002. Factors affecting *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration of sweet orange and citrage. Plant Cell Tissue and Organ culture. 71: 147-155.

**Zambryski, P.** 1992. Chronicles from *Agrobacterium*- plant cell DNA transfer story. Ann. Rev. Physiol. Plant. Mol. Biol. 43:465-490.

**Zheng, Z., Hayashimoto, A., Li, Z and Murai, N. 1991.** Hygromycin resistance gene cassettes for vector construction and selection of transformed rice protoplasts. *Plant Physiol.* 97: 832-835.

**Zupan, J and Zambryski, P. 1995.** Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Physiol.* 107: 1041-1047.

## ANEXO 1. TRATAMIENTOS

Se realizaron 25 tratamientos combinando BA y KIN , tres repeticiones en el tiempo.

Tratamiento	BA $\mu$ /l	KIN $\mu$ /l
T1	0	0
T2	0	2.32
T3	0	4.65
T4	0	9.29
T5	0	13.94
T6	2.22	0
T7	2.22	2.32
T8	2.22	4.65
T9	2.22	9.29
T10	2.22	13.94
T11	4.44	0
T12	4.44	2.32
T13	4.44	4.65
T14	4.44	9.29
T15	4.44	13.94
T16	8.88	0
T17	8.88	2.32
T18	8.88	4.65
T19	8.88	9.29
T20	8.88	13.94
T21	13.32	0
T22	13.32	2.32
T23	13.32	4.65
T24	13.32	9.29
T25	13.32	13.94

## ANEXO 2. MEDIOS DE CULTIVO

### 2A. Medios de cultivo Nitsh y Murashige & Skoog (MS).

<b>SOLUCIONES STOCK</b>		
<b>MACRONUTRIENTES</b>		
<b>COMPUESTO</b>	<b>NITSH</b>	<b>MS</b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	720 mg/l	1650 mg/l
KNO <sub>3</sub>	950 mg/l	1900 mg/l
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	185 mg/l	440 mg/l
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	90.37 mg/l	370 mg/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	68 mg/l	170 mg/l
<b>MICRONUTRIENTES</b>		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10 mg/l	6.2 mg/l
MnSO <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	18.9 mg/l	16.9 mg/l
ZnSO <sub>4</sub> . 7SO <sub>4</sub>	10 mg/l	10.6 mg/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25 mg/l	0.25 mg/l
CuSO <sub>4</sub> .5 H <sub>2</sub> O	0.025 mg/l	0.025 mg/l
CoCl <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	0.046 mg/l	0.025 mg/l
KI		0.83 mg/l
<b>FeEDTA</b>		
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	37.3 mg/l	37.3 mg/l
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.8 mg/l	27.8 mg/l
<b>VITAMINAS</b>		
AC. NICOTINICO	5 mg/l	0.5 mg/l
PIRIDOXINA	0.5 mg/l	0.5 mg/l
TIAMINA	0.5 mg/l	0.1 mg/l
GLICINA	2 mg/l	2 mg/l
BIOTINA	0.05 mg/l	
AC.FOLICO	0.5 mg/l	
INOSITOL	100 mg/l	100 mg/l
GLUTAMINA	500 mg/l	
SERINA	30 mg/l	
<b>OTROS</b>		
AGAR	6g/l	0.6%
SACAROSA	30g/l	30g/l

### 2B. Medio de Cultivo Luria Bertani.

<b>COMPUESTO</b>	<b>CONCENTRACION</b>
Hidrolizado de Caseína	1%
NaCl	0,5%
Extracto de Levadura	0,5%
AGAR BACTO-AGAR	1,2%

## ANEXO 3. PROTOCOLOS

### 3A. Establecimiento de células competentes

1. 16 horas previas al procedimiento, sembrar la cepa de *E.coli* DH5 $\alpha$  en 10 ml de medio LB líquido, en agitación constante (125 r.p.m), 32 °C.
2. Tomar 1 ml del cultivo anterior y adicionarla en 100 ml de medio LB en un Erlenmeyer de 1000ml. Mantenerla en agitación constante (125 r.p.m) por 2-4 horas, para obtener crecimiento hasta la fase logarítmica.
3. En la cámara de flujo, dispensar 100ml en 2 tubos de polipropileno de 50 ml. Centrifugar por 20 minutos a 4.000 r.p.m.(centrífuga de ángulo libre) y descargar el sobrenadante.
4. Resuspender en 45ml de CaCl<sub>2</sub> 50mM estéril. Incubar 20 min.a 4°C.
5. Centrifugar 20 min a 4.000 r.p.m., descartar el sobrenadante. Resuspender en 2 ml de CaCl<sub>2</sub> 50mM. Dispensar la solución en tubos crioviales y guardar a -70°C.

### 3B. Transformación con el plásmido pBI 121

6. Adicionar 2 $\mu$ l de la solución stock (concentración de 25 ng/ $\mu$ l del pBI121), a 200  $\mu$ l de células competentes en un tubo Eppendorf. Incubar a 4°C por 45 minutos. Incubar a 42°C por 90 segundos. Incubar a 4°C por 2 minutos.
7. Adicionar 800  $\mu$ l de LB sin antibiótico e incubar a 37°C al baño de María agitando periódicamente por 60 minutos. Centrifugar por 1 min a 1200 r.p.m., descartar el sobrenadante.
8. Resuspender el pellet en 200 $\mu$ l de LB sin antibióticos.
9. Realizar siembra por plating en medio LB sólido con kanamicina. Incubar a 32°C por 16 horas.

Los cambios de temperatura permitirán que el plásmido se inserte y se cierren los poros de la membrana celular.

### 3C. Conjugación triparental

1. Sembrar en 10 $\mu$ l de medio LB líquido: LBA4404, DH5 $\alpha$  pBI121 y PRK2013 con sus antibióticos correspondientes por 16 horas en agitación constante (125 r.p.m.) a 28°C.

2. Dispensar en un tubo Eppendorf de 250µl de cada una de las cepas antes mencionadas.
3. Centrifugar por 20 segundos. Descartar el sobrenadante y se resuspender en 50 µl de MgSO<sub>4</sub> (concentración 10 mM) estéril.
4. Tomar los 50µl y sembrar en caja de Petri con LB sin antibiótico. Incubar a 28°C por 16 horas.
5. Servir en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, 1 ml de MgSO<sub>4</sub> estéril.
6. Tomar con una cuchilla el crecimiento bacteriano, cuidando de no dañar el medio de cultivo. Depositar lo arrastrado con la cuchilla en el tubo eppendorf y resuspender cuidadosamente.
7. Tomar una alícuota y realizar plateo en cajas de petri con medio sólido y antibióticos (50 mg/l de kanamicina y 200 mg/l de cloranfenicol), incubar a 28°C durante 48 horas.
8. Para la purificación, tomar una colonia de las crecidas en el medio antes descrito y sembrarla por agotamiento.

### 3D. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

SOLUCIONES	CONCENTRACION	REACCION DE 25µl
DNA (stock 10 ng/µl)	20 ng	2 µl
DNTP	400 µM	1.0 µl
MgCl <sub>2</sub> (stock 25mM)	2.5mM	2.5 µl
Taq polimerasa	1.25 unidades	0.25 µl
Primer A (stock 100 µM)	1 µM	0.25 µl
Primer B (stock 100 µM)	1 µM	0.25 µl
Buffer 10X		2.5 µl
Tris-HCl pH 8.4	20mM	
KCl	50mM	
H <sub>2</sub> O calidad PCR		16.25 µl
		Total 25 µl

1. Adicionar en un tubo nuevo: H<sub>2</sub>O destilada, desionizada, estéril, buffer 10X, MgCl<sub>2</sub>, dNTP, Primer A y Primer B, DNA genómico y Taq polimerasa, en las cantidades determinadas.
2. Adicionar una gota de aceite mineral para PCR.
3. Tapar y hacer una centrifugación corta.
4. Colocar las muestras en el termociclador, luego que el bloque de calentamiento alcance los 80°C y antes de que llegue a 94°C.
5. Los productos de la amplificación se analizan por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y detectados por tinción con bromuro de etidio (Sambrock *et al*, 1982).

### **3E. Aislamiento de DNA genómico:**

Previo a la realización del PCR, se requiere DNA genómico extraído del tejido vegetal a muestrear.

*Elaboración de soluciones:*

❖ EBP:

Tris-HCl pH7.5	150mM
Acetato de amonio	2.5mM
EDTA	50Mm
SDS	0.5%
Mercaptoetanol	0.1-0.5%

❖ TE:

Tris-HCl (pH 8.0)	10mM
EDTA	1mM

*Protocolo:*

1. Colectar la muestra (100-200 mg) en un tubo eppendorf, rápidamente taparlo y colocarlo sobre hielo.

2. Macerar el tejido con una varilla de vidrio por 15 s en 100  $\mu$ l de EBP.
3. Adicionar 300  $\mu$ l más de EBP y terminar rápidamente de macerar.
4. Llevar al vortex por 5 s.
5. Centrifugar por 10 min a 4000 r.p.m.
6. Transferir 300  $\mu$ l del sobrenadante a otro tubo y adicionar 300  $\mu$ l de isopropanol y mezclar.
7. Incubar de 5-7 min a temperatura ambiente.
8. Centrifugar por 5 min a 4.000 r.p.m.
9. Lavar con 500  $\mu$ l de etanol 70% y centrifugar 5 min a 4.000 r.p.m. Eliminar el sobrenadante y dejar evaporar el exceso de etanol en baño de maría durante 10min.
10. Resuspender en 50  $\mu$ l de TE ó H<sub>2</sub>O destilada, desionizada estéril.

### **3F. Reacción histoquímica**

#### ***Elaboración de las soluciones:***

❖ *Solución de fijación:*

Formaldehido 0,3%, MES pH 5,6 10  $\mu$ M y Manitol 0,3 M.

❖ *Buffer fosfato:*

Stocks de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Para utilizarse en una solución de 50  $\mu$ M de NaPO<sub>4</sub> a pH 7.

❖ *Solución de reacción:*

Se disuelven 10 mg de X-GLUC en 100  $\mu$ l de dimetilformamida y luego se llevan a 10 ml con NaPO<sub>4</sub>.

#### ***Procedimiento***

1. Se colocan los explantes en la solución de fijación, al vacío, por 2 minutos.



2. Incubar de 4-5 minutos a temperatura ambiente, realizar 3 lavados con buffer fosfato.
3. Adicionar la solución de reacción y poner en vacío por 10 minutos.
4. Incubar a 37°C toda la noche.

Hacer un lavado con hipoclorito de sodio al 1,2% por 20 minutos, observar en el estereoscopio, para verificar la tinción de los explantes.

#### ANEXO 4. FORMATO PARA LA TOMA DE DATOS.

Fecha de infección\_\_\_\_\_ Tratamiento\_\_\_\_\_ Fecha toma de datos\_\_\_\_\_

No. Frasco	No. Expl	No. Brotes	No. Raíces	Callos	% Oxid.	C. Hongo	C. Bact.

## ANEXO 5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

### 5A. Análisis de varianza para el número de brotes\*

Fuente de variación	GL	Tipo III SC	Cuadrado medio	Valor F	Pr > F
TRAT	24	1.24778439	0.05199102	1.96	0.0079
TIEMPO	1	0.03125	0.03125	1.18	0.2793
PBACTE	1	0.00161218	0.00161218	0.06	0.8055
REPLICA	2	0.14990188	0.07495094	2.83	0.0623
TRAT*TIEMPO	23	0.21875	0.00951087	0.36	0.9972
TRAT*INFECCION	24	0.26315392	0.01096475	0.41	0.9932
TRAT*TIEMPO	48	1.65483598	0.03447575	1.3	0.118
TRAT*TIEMPO*INF	24	0.25	0.01041667	0.39	0.9953

\* Obtenida en el programa SAS. Datos transformados usando raíz cuadrada + 0.5.

### 5B. Análisis de varianza para presencia de callos\*

Fuente de variación	GL	Tipo III SC	Cuadrado medio	Valor F	Pr > F
TRAT	24	71.8452613	2.99355255	17	<.0001
TIEMPO	1	1.43077337	1.43077337	8.12	0.005
INFECCION	1	1.77568771	1.77568771	10.08	0.0018
REPLICA	2	0.61925418	0.30962709	1.76	0.1759
TRAT*TIEMPO	23	11.8338646	0.51451585	2.92	<.0001
TRAT*INFECCION	24	6.31834394	0.26326433	1.49	0.0767
TRAT*REPLICA	48	17.7334737	0.36944737	2.1	0.0004
TRAT*TIEMPO*INF	24	7.91003106	0.32958463	1.87	0.0126

\* Obtenida en el programa SAS. Datos transformados usando raíz cuadrada + 0.5.

### 5C. Análisis de varianza para número de raíces\*

Fuente de variación	GL	Tipo III SC	Cuadrado medio	Valor F	Pr > F
TRAT	24	1.24778439	0.05199102	1.96	0.0079
TIEMPO	1	0.03125	0.03125	1.18	0.2793
INFECCION	1	0.00161218	0.00161218	0.06	0.8055
REPLICA	2	0.14990188	0.07495094	2.83	0.0623
TRAT*TIEMPO	23	0.21875	0.00951087	0.36	0.9972
TRAT*INFECCION	24	0.26315392	0.01096475	0.41	0.9932
TRAT*REPLICA	48	1.65483598	0.03447575	1.3	0.118
TRAT*TIEMPO*INF	24	0.25	0.01041667	0.39	0.9953

\* Obtenida en el programa SAS. Datos transformados usando raíz cuadrada + 0.5

#### 4D. Análisis de varianza para la Oxidación\*

Fuente de variación	GL	Tipo III SC	Cuadrado medio	Valor F	Pr > F
TRAT	24	15.7594664	0.65664443	7.87	<.0001
TIEMPO	1	2.52475485	2.52475485	30.27	<.0001
INFECCION	1	0.00372052	0.00372052	0.04	0.833
REPLICA	2	0.36234242	0.18117121	2.17	0.1175
TRAT*TIEMPO	23	2.98691659	0.12986594	1.56	0.0609
TRAT*INFECCION	24	6.49383416	0.27057642	3.24	<.0001
TRAT*REPLICA	48	4.86946176	0.10144712	1.22	0.1873
TRAT*TIEMPO*INF	24	1.44502889	0.06020954	0.72	0.8236

\* Obtenida en el programa SAS. Datos transformados usando raíz cuadrada + 0.5.

#### 5E. Rango estudentizado de Tukey para la variable tratamientos: Brotes\*

Alfa = 0.05 GL =152 MSE =0.112087

Valor crítico de rango estudentizado = 2.774

Diferencia significativa mínima = 0.7335

Grupos Tukey			Media	N	Tratamiento
	A		21.162	12	21
	B		15.468	12	22
	B		15.018	12	14
C	B		14.081	12	11
C	B		13.974	12	7
C	B	D	12.912	12	16
C	B	D	12.517	12	8
C	B	D	12.438	12	6
C	B	D	12.294	12	13
C	E	B	11.135	12	20
C	E	B	10.629	12	24
C	E	B	10.459	12	17
C	E	B	10.416	12	10
C	E		0.9651	12	19
C	E		0.9525	12	23
C	E		0.9525	12	12
C	E		0.9335	12	15
C	E		0.9094	12	9
C	E		0.9094	12	25
C	E		0.9011	12	18
	E		0.8365	12	3
	E		0.7934	12	4
	E		0.7071	12	5
	E		0.7071	12	2
	E		0.7071	12	1

\*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

**5F. Rango estudentizado de Tukey para la variable tratamientos: Callos\***

Alfa = 0.05 GL =152 MSE= 0.17612

Valor crítico de rango estudentizado =5.27095

Diferencia significativa mínima = 0.6386

Grupos Tukey			Media	N	Tratamiento
	A		1.5690	12	16
B	A		1.3862	12	21
B	A		1.2196	12	14
B	A		1.1889	12	22
B	A	C	0.9797	12	6
B	A	C	0.9309	12	8
B	D	C	0.8738	12	7
E	D	C	0.5244	12	15
E	D	C	0.4714	12	13
E	D	C	0.4714	12	13
E	D	C	0.3536	12	17
E	D		0.2622	12	20
E	D		0.25	12	23
E	D		0.2357	12	25
E			0.2277	12	11
E			0.2012	12	12
E			0.1443	12	18
E			0.0833	12	24
E			0	12	1
E			0	12	3
E			0	12	10
E			0	12	5
E			0	12	2
E			0	12	19
E			0	12	4
E			0	12	9

\*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

**5G. Rango estudentizado de Tukey para la variable tratamientos: Raíces\***

Alfa =0.05 GL =152 MSE=0.0265

Valor crítico de rango estudentizado =5.27095

Diferencia significativa mínima =0.2477

Grupos Tukey	Media	N	Tratamiento
	A	0.25000	12
			16
B	A	0.20118	12
			19
B	A	0.08333	12
			13
B	A	0.08333	12
			8
B		0.00000	12
			1
B		0.00000	12
			2
B		0.00000	12
			7
B		0.00000	12
			6
B		0.00000	12
			9
B		0.00000	12
			10
B		0.00000	12
			11
B		0.00000	12
			4
B		0.00000	12
			5
B		0.00000	12
			14
B		0.00000	12
			15
B		0.00000	12
			12
B		0.00000	12
			17
B		0.00000	12
			3
B		0.00000	12
			20
B		0.00000	12
			21
B		0.00000	12
			22
B		0.00000	12
			23
B		0.00000	12
			24
B		0.00000	12
			25

\*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes

**5H. Rango estudentizado de Tukey para la variable tratamientos: Oxidación\***

Alfa = 0.05 GL =152 MSE =0.083419  
 Valor crítico de rango estudentizado =5.27095  
 Diferencia significativa mínima = 0.4395

Grupos Tukey						Media	N	Tratamiento	
				A		1.5708	12	1	
				A		1.5708	12	2	
				A		1.5708	12	3	
				A		1.5708	12	5	
				A		1.5708	12	17	
	B			A		1.5272	12	10	
	B			A	C	1.5053	12	15	
	B	D		A	C	1.4835	12	12	
	B	D		A	C	1.4835	12	13	
E	B	D		A	C	1.4399	12	18	
E	B	D		A	C F	1.4181	12	16	
E	B	D		A	C F	1.3744	12	24	
E	B	D		A	C F	1.3308	12	25	
E	B	D		A	G C F	1.309	12	9	
E	B	D	H	A	G C F	1.2217	12	4	
E	B	D	H	A	G C F	1.2217	12	14	
E	B	D	H	A	G C F	1.1999	12	21	
E	B	D	H	A	G C F	1.1563	12	11	
E	B	D	H		G C F	1.0908	12	6	
E		D	H		G C F	1.069	12	22	
E		D	H		G	F	1.0472	12	19
E			H		G	F	1.0254	12	8
			H		G	F	0.9817	12	23
			H		G		0.8727	12	20
			H				0.829	12	7

\*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

**5I. Rango estudentizado de Tukey para la variable tiempo: Brotes\***

Alfa = 0.05 GL =152 MSE= 0.112087  
 Valor crítico de rango estudentizado= 2.79405  
 Diferencia significativa mínima= 0.0764

Grupos Tukey	Media	N	TIEMPO
A	1.24562	144	30
B	0.96749	156	15

\*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

**5J. Rango estudentizado de Tukey para la variable tiempo: Raíces\***

Alfa = 0.05 GL =152 MSE =0.0265  
Valor crítico de rango estudentizado = 2.79405  
Diferencia significativa mínima =0.0372

Grupos Tukey	Media	N	TIEMPO
A	0.02778	144	30
A	0.02189	156	15

\*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

**5K. Rango estudentizado de Tukey para la variable tiempo: callos\***

Alfa= 0.05 df=152 MSE=0.17612  
Valor crítico de rango estudentizado=2.79405  
Diferencia significativa mínima=0.0958

Grupos Tukey	Media	N	TIEMPO
A	0,52473	144	30
B	0,35424	156	15

\*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

**5L. Rango estudentizado de Tukey para la variable tiempo: Oxidación\***

Alfa= 0.05 df=152 MSE=0.083419  
Valor crítico de rango estudentizado=2.79405  
Diferencia significativa mínima=0.0659

Grupos Tukey	Media	N	TIEMPO
A	1,40172	144	30
B	1,20159	156	15

\*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

**5M. Rango estudentizado de Tukey para la variable réplica: Brotes\***

Alfa= 0.05 df=152 MSE=0.112087  
Valor crítico de rango estudentizado=3.34736  
Diferencia significativa mínima=0.1121

Grupos Tukey	Media	N	REPLICA
A	1,19278	100	1
A	1,13779	100	2
B	0,97241	100	3

\*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.



**5N. Rango estudentizado de Tukey para la variable réplica: Callos\***

Alfa= 0.05 df=152 MSE=0.17612

Valor crítico de rango estudentizado=3.34736

Diferencia significativa mínima=0.1405

Grupos Tukey	Media	N	REPLICA
A	0,49462	100	1
A	0,42973	100	2
A	0,38387	100	3

\*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

**5O. Rango estudentizado de Tukey para la variable réplica: Raíces\***

Alfa= 0.05 df=152 MSE=0.026504

Valor crítico de rango estudentizado=3.34736

Diferencia significativa mínima=0.0545

Grupos Tukey	Media	N	REPLICA
A	0,05414	100	1
A	0,02000	100	2
A	0,00000	100	3

\*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

**5P. Rango estudentizado de Tukey para la variable réplica: Oxidación\***

Alfa= 0.05 df=152 MSE=0.083419

Valor crítico de rango estudentizado=3.34736

Diferencia significativa mínima=0.0967

Grupos Tukey	Media	N	REPLICA
A	1,34565	100	1
A	1,28282	100	2
A	1,26449	100	3

\*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes

**ANEXO 6. PROMEDIOS DE REGENERACIÓN PARA CADA UNA DE LAS  
VARIABLES**

**6 A. Promedio de brotes según tratamiento**

TRAT	media	D. estándar	Mínimo	Máximo
1	0.00	0.000	0	0
2	0.00	0.000	0	0
3	0.25	0.452	0	1
4	0.17	0.389	0	1
5	0.00	0.000	0	0
6	1.17	0.835	0	2
7	1.50	0.674	1	3
8	1.17	0.835	0	3
9	0.42	0.669	0	2
10	0.75	0.965	0	2
11	1.58	0.900	0	3
12	0.50	0.674	0	2
13	1.17	1.115	0	4
14	1.83	0.937	1	4
15	0.50	0.905	0	3
16	1.50	1.883	0	6
17	0.83	1.467	0	5
18	0.50	1.168	0	3
19	0.67	1.371	0	4
20	0.92	1.165	0	4
21	5.17	7.732	1	29
22	2.00	1.128	1	4
23	0.50	0.674	0	2
24	0.75	0.866	0	3
25	0.42	0.669	0	2

**6B. Promedio de Raíces según tratamiento**

TRAT	media	D. estándar	Mínimo	Máximo
1	0.00	0.00	0	0
2	0.00	0.00	0	0
3	0.00	0.00	0	0
4	0.00	0.00	0	0
5	0.00	0.00	0	0
6	0.00	0.00	0	0
7	0.00	0.00	0	0
8	0.08	0.29	0	1
9	0.00	0.00	0	0
10	0.00	0.00	0	0
11	0.00	0.00	0	0
12	0.00	0.00	0	0
13	0.08	0.29	0	1
14	0.00	0.00	0	0
15	0.00	0.00	0	0
16	0.25	0.45	0	1
17	0.00	0.00	0	0
18	0.00	0.00	0	0
19	0.15	0.62	0	2
20	0.00	0.00	0	0
21	0.00	0.00	0	0
22	0.00	0.00	0	0
23	0.00	0.00	0	0
24	0.00	0.00	0	0
25	0.00	0.00	0	0

### 6C. Promedio de callos según tratamiento

TRAT	media	D. estándar	Mínimo	Máximo
1	0.00	0.00	0	0
2	0.00	0.00	0	0
3	0.00	0.00	0	0
4	0.00	0.00	0	0
5	0.00	0.00	0	0
6	1.67	1.56	0	4
7	1.17	0.94	0	2
8	1.50	1.38	0	3
9	0.00	0.00	0	0
10	0.00	0.00	0	0
11	0.33	0.89	0	3
12	0.25	0.62	0	2
13	0.67	0.98	0	2
14	1.60	1.28	0	3
15	0.83	1.27	0	3
16	2.50	0.67	2	4
17	2.20	0.90	0	2
18	2.23	0.87	0	3
19	0.00	0.00	0	0
20	0.42	1.00	0	3
21	1.80	1.23	0	4
22	1.92	1.31	0	4
23	0.25	0.45	0	1
24	0.08	0.29	0	1
25	0.33	0.78	0	2

### 6D. Promedio de Oxidación según tratamiento

TRAT	media	D. estándar	Mínimo	Máximo
1	100.0	0.00	100	100
2	100.0	0.00	100	100
3	100.0	0.00	100	100
4	77.1	36.08	0	100
5	100.0	0.00	100	100
6	70.8	25.75	25	100
7	52.1	31.00	0	100
8	66.7	26.83	25	100
9	83.3	26.83	25	100
10	97.9	7.22	75	100
11	75.0	28.20	25	100
12	95.8	9.73	75	100
13	95.8	9.73	75	100
14	81.3	28.45	0	100
15	95.8	14.43	50	100
16	91.7	16.28	50	100
17	100.0	0.00	100	100
18	93.8	11.31	75	100
19	66.7	35.89	0	100
20	56.3	24.13	25	100
21	79.2	23.44	25	100
22	68.8	26.38	25	100
23	60.4	34.47	25	100
24	87.5	25.00	25	100
25	83.3	30.77	25	100

### 6E. Promedios para las diferentes variables según réplica

REPLICA	Variable	media	D.estándar	Mínimo	Máximo
1	NBROTOS	1.15	1.3056	0	6
2	NBROTOS	1.2	3.0977	0	29
3	NBROTOS	0.56	0.7696	0	3
1	NRAICES	0.02	0.1407	0	1
2	NRAICES	0.06	0.2778	0	2
3	NRAICES	0	0.0000	0	0
1	PCALLOS	0.76	1.1557	0	3
2	PCALLOS	0.58	1.0365	0	3
3	PCALLOS	0.7	1.2268	0	4
1	OXIDACION	80.5	29.6401	0	100
2	OXIDACION	82.25	26.4229	0	100
3	OXIDACION	86.75	22.0350	25	100

### 6F. Promedios para las diferentes variables según lectura

LECT		media	D.estándar	Mínimo	Máximo
15	NBROTOS	0.57	0.8733	0	4
30	NBROTOS	1.40	2.6872	0	29
15	NRAICES	0.03	0.1951	0	2
30	NRAICES	0.03	0.1649	0	1
15	OXIDACION	77.08	29.3695	0	100
30	OXIDACION	89.76	20.5716	25	100
15	PCALLOS	0.53	0.9735	0	3
30	PCALLOS	0.85	1.2809	0	4