



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

INSTITUTO DE HORTICULTURA

**IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE PLANTAS
TRANSGÉNICAS T₁ DE JITOMATE (*Solanum
lycopersicum* L.) CON CAPACIDAD DE
ACUMULAR TREHALOSA**

TESIS

**Que como requisito parcial
para obtener grado de**

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

Presenta:

EDGAR FRANCISCO VIDAL SILES



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES



Instituto de Horticultura

CHAPINGO, ESTADO DE MÉXICO, JUNIO DE 2019.

**IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS T₁ DE
JITOMATE (*Solanum lycopersicum* L.) CON CAPACIDAD DE ACUMULAR
TREHALOSA.**

Tesis realizada por **EDGAR FRANCISCO VIDAL SILES** bajo la supervisión del
Cómite Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito
parcial para obtener el grado de:

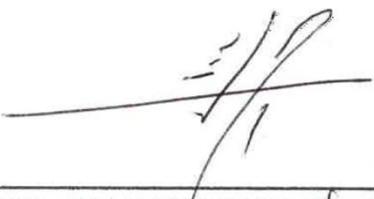
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

DIRECTOR:



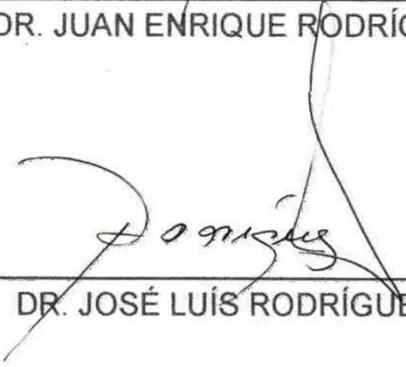
DR. JOSÉ ÓSCAR MASCORRO GALLARDO

ASESOR:



DR. JUAN ENRIQUE RODRÍGUEZ PÉREZ

ASESOR:



DR. JOSÉ LUÍS RODRÍGUEZ DE LA O

INDICE

LISTA DE CUADROS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE APÉNDICES.....	vii
DEDICATORIA.....	viii
AGRADECIMIENTOS	ix
DATOS BIOGRÁFICOS	x
RESUMEN GENERAL	1
GENERAL ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	3
OBJETIVOS	5
Objetivo general	5
Objetivos específicos.....	5
REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
Impacto del cultivo de jitomate	6
Efecto de la sequía en el cultivo del jitomate.....	7
Desarrollo de plantas de jitomate transgénicos tolerantes a sequía.....	8
Importancia de la trehalosa como osmoprotector.....	11
Modificación en la acumulación de trehalosa por ingeniería genética...	12
Detección de plantas transformadas	12
LITERATURA CITADA	14
DETECCIÓN Y SELECCIÓN DE PLANTAS TRANSFORMADAS T ₁ DE JITOMATE CON GENES DE BIOSÍNTESIS DE TREHALOSA.....	18
INTRODUCCIÓN.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
Obtención de progenie (T ₁)	22
Ajuste de temperatura de alineamiento (T _m) en el protocolo de PCR.	23
Detección de plantas T ₁ por PCR.....	25

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
Temperatura de alineamiento óptima	25
Identificación de plantas T₁	27
CONCLUSIONES	32
LITERATURA CITADA	33
COMPARACIÓN DE CINCO MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN DE JITOMATE CON Y SIN NITRÓGENO LÍQUIDO	37
RESUMEN:	37
INTRODUCCIÓN	38
MATERIALES Y MÉTODOS	39
Material vegetal	39
Extracción de ADN	40
Maceración y homogenización del tejido	40
Medición de la concentración y calidad de ADN aislado	43
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
CONCLUSIÓN	49
LITERATURA CITADA	50
APÉNDICES	53

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Desarrollo de jitomates resistentes a sequía mediante ingeniería genética	9
Cuadro 2. Prueba de Ji cuadrada en plantas T ₁ procedentes del evento GUSTIII-3 confirmadas con amplificación en PCR.....	31
Cuadro 3. Comparación de los protocolos de extracción de ADN en plantas T ₁ de jitomate (<i>Solanum Lycopersicum</i> L.)	46
Cuadro 4. Prueba de Ji cuadrada en líneas de plantas confirmadas con amplificación en la PCR.	56
Cuadro 5. Cuadros medios del análisis de varianza para las relaciones de absorbancia 260/280, 260/230 y concentración de ADN	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vector pBin19.....	22
Figura 2. Vector pTF101.1..	23
Figura 3. Amplificación en gradiente de temperaturas para el gen <i>NPTII</i> ..	25
Figura 4. Amplificación en gradiente de temperaturas para el gen <i>BAR</i> ..	26
Figura 5. Identificación de plantas positivas T1 derivadas de los eventos NPTIIRD-5 y NPTIIRD-6.....	27
Figura 6. Identificación de plantas positivas transgénicas T1 derivadas de los eventos BAR35S-1, BAR35S-3, BAR35S-9, BARRD-3, BARRD-7, BARRD-8, BARRD-9 y BARRD-10.....	28
Figura 7. Identificación de plantas positivas T ₁ derivadas del evento GUSTIII-3. Identificación de plantas positivas T ₁ derivadas del evento GUSTIII-3.....	30
Figura 8. Tinción de planta T ₀ GUS 3-3 para detectar la expresión del gen reportero GUSint.....	30
Figura 9. Región ADN-T del vector binario pGUSint con el gen <i>NPTII</i>	39
Figura 10. Equipo alternativo para maceración de tejido vegetal..	41
Figura 11. Gel de agarosa con muestras de ADN extraído de las plantas de jitomate.	48
Figura 12. Amplificación del gen <i>NPTII</i> en las muestras de ADN de Jitomate.....	48
Figura 13. Croquis de localización de plantas de jitomate T ₁ detectadas como transformadas	53
Figura 14. Cultivo de jitomate en el ciclo 2017-2018.....	54
Figura 15. Ciclo de cultivo de jitomate 2018.....	55
Figura 16. Mecanismo de herencia de genes en plantas transgénicas.	59

LISTA DE APÉNDICES

Apéndice 1. Distribución de las plantas T ₁ en el invernadero	53
Apéndice 2. Cultivo de las plantas de jitomate durante el ciclo 2017-201854	
Apéndice 3. Análisis de la segregación de las plantas transformadas	56
<i>et al.</i> , Apéndice 4. Protocolo de aislamiento de ADN vegetal propuesto por Dellaporta et al (1983) modificado.....	57
Apéndice 5. Análisis de varianza en los métodos de extracción de ADN..	58
Apéndice 6. Segregación de genes en plantas transgénicas	59

DEDICATORIA

*El ave sabe que anida
para cuidar la vida,
los padres nos dan la vida,
hecho que hacen día a día*

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo financiero otorgado para llevar a cabo mis estudios de maestría.

Mi profundo agradecimiento a todas las autoridades y personal que constituyen la Universidad Autónoma Chapingo, por confiar en mí, abrirme las puertas y permitirme realizar todo el proceso investigativo dentro de su establecimiento educativo.

Al **Dr. José Óscar Mascorro Gallardo** por su tiempo, paciencia y consejo además de la confianza depositada en mi persona para el inicio, seguimiento y culminación del presente trabajo de investigación.

Al **Dr. Juan Enrique Rodríguez Pérez** por sus observaciones pertinentes durante el desarrollo del presente trabajo.

Al **Dr. José Luis Rodríguez de la O** por las facilidades otorgadas en el uso del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales.

Me van a faltar páginas para agradecer a las personas que se han involucrado en la realización de este trabajo, sin embargo merecen reconocimiento especial mi Madre **Francisca Siles Soria** y mi Padre **Teodoro Vidal Castillo** que con su apoyo moral me ayudaron a culminar este proceso.

Agradecimientos a mis colegas, **M.C Herbert Regules Rivera**, **M.C Leticia Reyes Márquez**, gracias infinitas por toda su amistad y buena voluntad y a la **M.C Araceli Munguía Méndez** por sus consejos, ánimos y compañía.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombre	Vidal Siles Edgar Francisco
Fecha de nacimiento	18 de Abril de 1991
Lugar de Nacimiento	Tlayacapan, Morelos
No. Cartilla militar	D-0650817
CURP	WISE910418HMSDL07
Cedula Profesional	9279856

Desarrollo Académico

Licenciatura	Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, Gen. 2009-2014
Bachillerato	Colegio de Bachilleres del Estado de Morelos, plantel 03, Oacalco, Gen. 2006-2009

RESUMEN GENERAL

Identificación y selección de plantas transgénicas T₁ de jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) con capacidad de acumular trehalosa.

Durante la generación de líneas de plantas transgénicas es necesario detectar a los individuos transformados hasta la generación T₂, para seleccionar las plantas que conservan el gen con la característica de interés y descartar a aquellas que no la posean, como resultado de la segregación originada en el auto cruzamiento de los transformantes originales (T₀). El objetivo del presente trabajo fue identificar y seleccionar plantas de jitomate T₁ con la construcción *ScTPS1-TPS2* que confiere capacidad de acumular trehalosa, mediante la amplificación del gen *BAR* o *NPTII*, a partir de plantas previamente identificadas como transformantes obtenidas con los vectores binarios pBIN y pTF101.1. Sólo se detectaron siete plantas T₁ provenientes de 3 eventos independientes T₀. Habrá que llevar a cabo otros experimentos para determinar si la detección por PCR está dando muchos falsos negativos o si realmente hubo pocos eventos positivos (o muchos falsos positivos) desde T₀. Cabe mencionar dentro de los estudios de biología molecular ejecutados, un elemento muy importante es la extracción del ADN, porque un método optimizado para purificarlo, permite aprovechar tiempo y recursos. Por esta razón se propusieron y evaluaron protocolos de extracción sin nitrógeno líquido (NL), modificando la metodología en la que se utiliza NL. Los métodos analizados fueron: a) sin NL y sin eliminación de ARN; b) sin NL y con eliminación de ARN con cloruro de litio; c) sin NL y con ARNasa para eliminar ARN. Los tres métodos se compararon con otros dos: d) con NL y con ARNasa para eliminar el ARN, y e) con NL y sin ARNasa. La cantidad y pureza de ADN obtenido fue similar en los cinco casos como se vio al analizar los extractos mediante electroforesis en geles de agarosa y al utilizarlos para reacciones de amplificación por PCR.

Palabras Clave: *BAR*, *NPTII*, tomate, transgénicos, trehalosa.

GENERAL ABSTRACT

Identification and selection of transgenic T₁ tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.) with the ability to accumulate trehalose.

During the generation of transgenic plant lines, it is necessary to detect the transformed individuals up to the T₂ generation, to select the plants that conserve the gene with the characteristic of interest and to discard those that do not possess it, as a result of the segregation originated in the auto crossing of the original transformants (T₀). The objective of the present work was to identify and select T₁ tomato plants with the construction *ScTPS1-TPS2* that confers the ability to accumulate trehalose, through the amplification of the *BAR* or *NPTII* gene, from previously identified plants as transformants obtained with the binary vectors pBIN and pTF101.1. Only seven T₁ plants from 3 independent events T₀ were detected. Other experiments should be done to determine if the detection by PCR is giving many false negatives or if there were really few positive events (or many false positives) from T₀. It is worth mentioning that within the executed studies of molecular biology, a very important element is the DNA extraction because an optimized method to purify it allows to take advantage of time and resources. For this reason, extraction protocols without liquid nitrogen (NL) were proposed and evaluated, modifying the methodology in which NL is used. The analyzed methods were: a) without NL and without RNA elimination; b) without NL and with elimination of RNA with lithium chloride; c) without NL and with RNase to eliminate RNA. The three methods were compared with two others: d) with NL and with RNAase to eliminate the RNA, and e) with NL and without RNase. The obtained amount and purity of DNA was similar in the five cases as seen when analyzing the extracts by electrophoresis in agarose gels and when using them for PCR amplification reactions.

Keywords: *BAR*, *NPTII*, tomato, transgenic, trehalose.

Thesis, Universidad Autónoma Chapingo
Author: Edgar Francisco Vidal Siles
Advisor: Dr. José Óscar Mascorro Gallardo

INTRODUCCIÓN GENERAL:

El tomate también conocido como jitomate, es la tercera hortaliza de alto valor económico más difundida en el mundo. China es el principal productor (con una participación de 28.1%), le siguen India (4.9%), Turquía (3.09%) y Estados Unidos (2.58 %). México ocupa el noveno lugar (1%) (FAOSTAT, 2016).

Una limitante para el desarrollo de la agricultura, lo es la disponibilidad de agua. Los ambientes secos o zonas áridas cubren alrededor del 47 % de la superficie de la tierra (FAO, 2013). En México más del 50% del territorio nacional corresponde a zonas áridas y semiáridas (Cervantes-Ramírez, 2006), donde se encuentran las zonas productoras más importantes de esta hortaliza las cuales ocupan 33,278 hectáreas y que aportan 59.7 % (2'124,278 toneladas) del total nacional, donde los sistemas de agricultura protegida dominan la producción con 98 %, mientras que los sistemas de campo abierto producen 1.43% (SIAP, 2019). El jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) es un cultivo que se demanda aproximadamente 143 litros de agua por planta en condiciones de invernadero por ciclo (Flores *et al.*, 2007), requiriendo suministro hídrico consecuente en durante la etapa de crecimiento (Amudha y Balasubramani, 2011).

Por lo tanto, una reducción en el abastecimiento de agua durante los momentos fenológicos importantes, tales como crecimiento y cuajado de frutos, implicaría una pérdida en el rendimiento final y por lo tanto, una reducción de ingresos del cultivo de las unidades de producción que se dedican al cultivo de jitomate en México

La biotecnología y en particular la ingeniería genética proveen de herramientas para dotar de una mayor tolerancia al estrés hídrico a las variedades previamente obtenidas por mejoramiento convencional, destacándose la búsqueda de genes que codifiquen sustancias osmoprotectoras y el uso de genes que codifican factores de transcripción reguladores de la respuesta al estrés abiótico.

Existen tres grupos de osmolitos en plantas: aminoácidos (prolina), azúcares (manitol y la trehalosa) y compuestos cuaternarios de amonio, ya que una respuesta común de los organismos a la sequía, a la salinidad y al estrés por baja temperatura es la acumulación de solutos compatibles que estabilizan biomoléculas bajo condiciones de estrés (Nuccio *et al.*, 1999).

La trehalosa es un disacárido no reductor que juega un papel importante fisiológico como protector de estrés abiótico en gran número de organismos incluyendo bacterias levaduras, invertebrados (Elbein *et al.*, 2003) y organismos anhidrobiontes dentro de los cuales se incluyen algunas plantas como la de resurrección (*Selaginella lepidophylla* Hook. & Grev.) (Zentella *et al.*, 1999). Miranda *et al.* (2007) detectaron efectos de la sobreexpresión en *Arabidopsis thaliana*, al generar líneas con la fusión traduccional quimérica trehalosa-6-Fosfato sintasa /fosfatasa (TPS-TPP) con los genes de levadura (*Saccharomyces cerevisiae* Meyen), mostraron incremento significativo de tolerancia a sequía, heladas, salinidad y calor. Mismos resultados han sido reportados en alfalfa (*Medicago sativa* L.) (Suárez *et al.*, 2009). En el caso de jitomate, se han generado líneas de plantas T₀ con genes de síntesis de trehalosa haciendo uso de las construcciones 35S::ScTPS1TPS2::NOS ó Rd29A::ScTPS1TPS2::NOS, con genes TPS1 y TPS2, procedentes de *Saccharomyces cerevisiae* por Romero-Escobedo (2016).

Sin embargo, dada la heterogenidad de las líneas transgénicas T₀, causado por sitio de inserción aleatorio de los transgenes en el genoma durante proceso de transformación (Praena-Tamayo, 2017) (Apéndice 6), se recomienda obtener entre 10 y 20 eventos independientes para seleccionar al mejor evento que: a) sea igual a la variedad transformada, y b) con el nuevo carácter incorporado en forma homocigota.

Lo anterior implica analizar al menos tres generaciones de plantas transgénicas para poder obtener las líneas transgénicas homocigotas con los genes de acumulación de trehalosa.

OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar plantas T₁, de Jitomate transformados con la construcción bifuncional *ScTPS1-ScTPS2 (BIF)*, mediante la amplificación de los genes de selección *BAR* ó *NPTII*, para seleccionar plantas con la capacidad de acumular trehalosa.

Objetivos específicos

- 1) Identificar progenies T₁ de plantas transformadas de cuatro construcciones diferentes con el gen *BIF*
- 2) Desarrollar un método de extracción de ADN genómico confiable y reproducible de plantas transformadas de jitomate de manera rápida y económica.

REVISIÓN DE LITERATURA

Impacto del cultivo de jitomate

México, a pesar de considerarse centro de diversificación de esta especie (González, 2013; Rick y Yoder, 1978), tan solo es participe con el 1% de la producción global (4, 243,058 toneladas), ocupando el noveno lugar a nivel mundial (FAOSTAT, 2019). No obstante, a pesar de esta situación, México es uno de los principales exportadores de jitomate a nivel mundial, ocupando el primer lugar, con la exportación de 1.5 millones de toneladas, con un valor económico de 1800 millones de dólares en el mercado internacional hasta el año 2017, de acuerdo con los datos arrojados por UN COMTRADE (2019).

Por lo anterior dicho el jitomate es una hortaliza de exportación cuyo consumo, permite la generación de divisas y por lo tanto una y por lo tanto una fuente de riqueza y de empleo en el sector agrícola agroexportador que beneficia a todos los actores involucrados en su proceso de producción, comercialización e inclusive en su industrialización, concentrándose el 59.75 % de la producción en los estados de Sinaloa, Sonora, San Luis Potosí, Michoacán, Jalisco, Zacatecas y Baja California, teniéndose estimado que alrededor de 51,861 hectáreas se dedican a nivel nacional al cultivo de esta solanácea, donde a pesar de que los sistemas de agricultura protegida apenas ocupan el 28.93 % de la superficie, obtienen el rendimiento de de 69.08 ton/ha, en contraste las zonas productoras a campo abierto mientras ocupan el 71.07 % del área total destinada al jitomate, generan el rendimiento de 24.32 ton/ha (SIAP, 2019).

Sin embargo, existen una gran diversidad de factores, tanto bióticos y abióticos que ejercen efectos negativos para el desarrollo de este cultivo, siendo uno muy importante, la sequía.

Efecto de la sequía en el cultivo del jitomate

Una restricción en la disponibilidad de agua, afecta aspectos relevantes en el crecimiento de la planta, siendo el jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) sensible al estrés hídrico en diferentes fases de desarrollo, desde la germinación hasta el cuajado de los frutos (Hsiao y Xu, 2000) en aspectos tales como anatomía, morfología, fisiología y bioquímica.

La disponibilidad de agua afecta la relación entre el crecimiento de la parte aérea y la raíz; la raíz continúa su desarrollo mientras que la parte aérea deja de crecer por causa del estrés. Así, las plantas son capaces de continuar el desarrollo de sus raíces en búsqueda de agua en zonas más profundas del suelo (Potters *et al.*, 2007). La división celular, aunque resulta afectada por el estrés hídrico, normalmente es menos sensible que la expansión celular; además de una inhibición del crecimiento, el déficit hídrico modifica el desarrollo y la morfología vegetal como cambios en la relación raíz/parte aérea (Bajaj *et al.*, 1999).

De manera general, los efectos más claros del estrés hídrico en jitomate, lo son los fallos en el proceso de germinación así mismo como el nacimiento de plántulas débiles. En consecuencia se presenta una reducción significativa en la altura de la planta y área foliar, (Nahar y Gretzmacher, 2011), disminución en la formación y polinización de flores junto con la formación de frutos, así mismo como en la masa promedio de los frutos y tanto masa fresca como seca de la planta (Wahb-Allah *et al.*, 2011).

Todo lo anterior produce como consecuencia una reducción en la productividad en las zonas productoras enfocadas al cultivo de jitomate, haciendo necesario el desarrollo de variedades que sean capaces de mantener sus funciones vitales y producir aún en deficiencia de agua (Nahar y Gretzmacher, 2011).

El hecho mencionado implicaría una ventaja agronómica en al permitir un uso más eficiente del agua en las unidades de producción de jitomate, lo que también supondría una reducción en los costes de producción en concepto de

riego, ya que el proceso productivo de este cultivo es costoso, más si se consideran los esquemas de exportación y en general las de invernaderos, reportándose costes de producción desde \$ 185,170 hasta \$ 675,000 pesos mexicanos (MXN) por hectárea por ciclo semestral (dependiendo del grado de tecnificación de la unidad y ubicación geográfica), donde los costes de riego ocupan del 15% al 30%, del total (FIRA, 2019).

Desarrollo de plantas de jitomate transgénicos tolerantes a sequía

Variedades de jitomate comercial, tolerantes a sequía se han buscado desarrollar mediante mejoramiento genético tradicional en base con la búsqueda y uso del reservorio genético existente (Foolad, 2007); siendo reportadas especies del género *Solanum* silvestres que otorgan tolerancia a estrés hídrico, tales como *S. pimpinellifolium* y *S. pennelli* Foolad (2007), así como también accesiones derivadas de variedades nativas (Rick y Chetelat, 1995).

Sin embargo, un problema relevante con el mejoramiento genético tradicional es la falta de técnicas de detección de plantas que muestren tolerancia a sequía, que además sean reproducibles y rápidas (Saad *et al.*, 2013), esto se agrava, si se considera que la característica descrita es de carácter poligénico, lo que ocasiona en los programas de mejoramiento genético se lleven una considerable cantidad de tiempo para ejecutarse y muchas ocasiones no permitiendo liberar variedades con la característica de interés descrita, no respondiendo la necesidad de variedades tolerantes a sequía del mercado (Miller *et al.*, 2009).

Recientemente se ha considerado el empleo de la ingeniería genética para la obtención de variedades de jitomate con la capacidad de tolerar estrés hídrico (Pandey *et al.*, 2011).

En lo que respecta a la generación de plantas transgénicas de jitomate tolerantes a sequía, en tiempos recientes se han presentado diversos estudios, con sobreexpresión de genes asociados con la regulación y control osmótico, tal como se muestra en el cuadro 1:

Cuadro 1.Desarrollo de jitomates resistentes a sequía mediante ingeniería genética

Gen	Efecto inducido	Referencia
TAS14	La sobreexpresión de este gen aumentó la acumulación de catión Na en hojas adultas, mientras que en las hojas jóvenes, los solutos acumulados fueron K ⁽⁺⁾ y azúcares, distribuyendo la acumulación de Na ⁽⁺⁾ entre hojas jóvenes y adultas durante un período prolongado en condiciones estresantes. También asoció con un incremento rápido en los niveles de ácido abscísico (ABA) en hojas, fundamental para evitar la deshidratación.	Pineda <i>et al.</i> , 2012
SINCED1	Se induce mayor síntesis de la enzima epicateñodioxigenasa, lo cual permite mayor síntesis de ABA y en consecuencia, mayor control en la pérdida de agua en la hoja.	Tung <i>et al.</i> , 2008
LeERF1	La sobreexpresión de LeERF1 modula positivamente la respuesta mediada por el etileno. Además, mostró mayor actividad de superóxido dismutasa y guaiacol peroxidasa que los tomates no transformados en condiciones de alta salinidad.	Lu, <i>et al.</i> , 2010

Gen	Efecto inducido	Referencia
Osmyb4	La inserción y mayor actividad de este factor de transcripción, confiere tolerancia al frío y la sequía a través del incremento de la biosíntesis de osmolitos compatibles.	Vanini <i>et al.</i> , 2007
ScIMP1	La sobreexpresión de este gen, permite el incremento de la síntesis de myo-inositol, se asocia con la reducción en el potencial osmótico en las plantas transformadas.	Moyano-Solera, 2013.
AVP1	Las plantas que sobreexpresan la H ⁺ - pirofosfatasa vacuolar son más resistentes a altas concentraciones de NaCl y privación de agua que las cepas de tipo salvaje isogénicas, al acumular más Na ⁺ y K ⁺ en el tejido de sus hojas que el tipo salvaje	Gaxiola <i>et al.</i> , 2001

Dentro de los genes que se han sometido a un escrutinio más intenso para explorar su posible utilización en la generación de plantas transgénicas tolerantes a sequía, se encuentran los que codifican para enzimas involucradas en la biosíntesis de osmolitos (Bajaj *et al.*, 1999).

Existen tres grupos de osmolitos en plantas: aminoácidos como la prolina; azúcares; polioles como el manitol y la trehalosa y compuestos cuaternarios de amonio como la glicina betaína y el 3-dimetil sulfonio propanato. Ya que una respuesta común de los organismos a la sequía, a la salinidad, y al estrés por baja temperatura es la acumulación de las azúcares y de otros solutos compatibles. Estos compuestos sirven como osmoprotectores y, en algunos casos, estabilizan biomoléculas bajo condiciones de estrés (Nuccio *et al.*, 1999).

Importancia de la trehalosa como osmoprotector

La trehalosa (α -D-glucopiranosil α -D-glucopiranosido) es un disacárido no reductor de glucosa, el cual juega un importante papel fisiológico como un protector de estrés abiótico en un gran número de organismos incluyendo bacterias levaduras, invertebrados (Elbein *et al.*, 2003), así como en individuos anhidrobiontes (Zentella *et al.*, 1999)

Causa un efecto protector sobre las enzimas y membranas celulares, evitado su desnaturalización, durante la presencia de sequías extremas, adicionalmente, el intermediario trehalosa 6-fosfato y/o la trehalosa misma, inducen genes que contribuyen en la adaptación a diferentes tipos de estrés, tanto biótico como abiótico (Avonce *et al.*, 2004).

Una de sus vías de síntesis es a partir de la unión de glucosa 6-fosfato (G6P) y UDP-glucosa para formar trehalosa 6-fosfato (T6P), en una reacción catalizada por la trehalosa 6-fosfato sintasa (TPS), posteriormente, una trehalosa 6-fosfato fosfatasa (TPP) desfosforila al intermediario para convertirlo en trehalosa (Cabib y Leloir, 1958).

La trehalosa causa un efecto protector sobre las enzimas y membranas celulares, evitado su desnaturalización, durante la presencia de sequías extremas, adicionalmente, el intermediario trehalosa 6-fosfato y/o la trehalosa misma, inducen genes que contribuyen en la adaptación a diferentes tipos de estrés, tanto biótico como abiótico (Avonce *et al.*, 2004).

Por otro lado, Matthew *et al.* (2008) describen que existe un potencial al modificar la ruta bioquímica de la trehalosa en la producción de biomasa, la adaptación al medio ambiente y el rendimiento, lo cual se puede reflejar en una gama de tejidos, incluyendo embriones, hojas e inflorescencias.

Modificación en la acumulación de trehalosa por ingeniería genética

Dadas las cualidades osmoprotectantes de la trehalosa y su potencial como osmolito en la adaptación de especies vegetales en ambientes hostiles, se han generado trabajos que buscan incrementar su concentración endógena como una estrategia para poder generar variedades transgénicas que toleren estrés hídrico.

Miranda *et al.* (2007) construyeron la fusión traduccional quimérica trehalosa-6-Fosfato sintasa /fosfatasa (TPS-TPP) con los genes de levadura y la sobreexpresaron en *Arabidopsis thaliana*, obteniendo líneas con un incremento significativo de tolerancia a sequía, heladas, salinidad y calor, efectos también reportados en alfalfa (Suárez *et al.*, 2009).

Romero-Escobedo (2016) reporta que es posible generar plantas de jitomate usando construcciones 35S::ScTPS1TPS2::NOS ó Rd29A::ScTPS1TPS2::NOS, con genes TPS1 y TPS2, obtenidos de *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo las plantas que reporta son To y requieren caracterización molecular, bioquímica, genética y fisiológica para poder seleccionar algunos de los eventos más prometedores.

Detección de plantas transformadas

En el desarrollo de plantas transgénicas, específicamente en jitomate, el proceso de transformación utilizado es mediado por *Agrobacterium*, como lo han descrito trabajos de Horsch *et al.* (1984), McCormick *et al.* (1986) y Kátia *et al.* (1993), en base al plásmido Ti, el cual es una estructura de DNA circular de doble cadena y de un tamaño aproximado de 200 Kb. Contiene un origen de replicación (ori) que le permite mantenerse de forma estable en la bacteria, el DNA-T o región de transferencia, delimitada por dos bordes de 25 pares de bases (borde derecho y borde izquierdo) y la región de virulencia (vir) necesaria para el procesamiento y transferencia del t-DNA a la célula de la planta.

El t-DNA codifica para las hormonas de crecimiento citoquinina y auxina y para opinas que sirven de fuente de nitrógeno a la bacteria (Hernandez-Esquivel, 2015).

El plásmido de *Agrobacterium tumefaciens* es modificado, donde los genes genes TI (inducción de tumores) son removidos del ADN (ADN-T) y reemplazados por genes dos quimericos: uno para llevar a cabo la selección y otro que sería el gen de interés (GDI) que aporta una nueva característica a la planta. Este primero facilita el desarrollo de sistemas de selección que permiten la regeneración y desarrollo de las células vegetales transformadas (Horsch *et al.*, 1984). Una vez que las plantas se han regenerado y crecido, se lleva a cabo el diagnóstico genotípico mediante PCR para confirmar la presencia del nuevo gen, aunque también puede ser de los genes de selección. Esta detección, no solo es útil para el diagnóstico en las plantas T₀, sino también para sus descendientes dado que al existir una sola integración del transgen de interés, se obtienen inicialmente plantas T₀ hemigóticas (Moreno-Cárdenas, 2013). Así que importante obtener descendientes con copias del gen foráneo en sus dos juegos de cromosomas con la segregación, obtenida al autofecundar los individuos, lo que incrementará la probabilidad de encontrar plantas en condición homocigótica (Fonseca-Rodríguez, 2013).

LITERATURA CITADA

- Amudha, J., & Balasubramani, G. (2011). Recent molecular advances to combat abiotic stress tolerance in crop plants. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 6(2), 31–58.
- Avonce, N., Leyman, B., Mascorro-Gallardo, J. O., Van Dijck, P., Thevelein, J. M., & Iturriaga, G. (2004). The Arabidopsis Trehalose-6-P Synthase AtTPS1 Gene Is a Regulator of Glucose, Abscisic Acid, and Stress Signaling. *Plant Physiology*, 136(3), 3649–3659. <https://doi.org/10.1104/pp.104.052084>
- Bajaj, S., Targolli, J., Liu, L.-F., Ho, T.-H. D., & Wu, R. (1999). Transgenic approaches to increase dehydration-stress tolerance in plants. *Molecular Breeding*, 5(6), 493–503. <http://doi.org/doi:10.1023/a:1009660413133>
- Cabib, E., & Leloir, L. F. (1958). The biosynthesis of trehalose phosphate. *Journal of Biological Chemistry*, 231(1), 259–275.
- Cervantes-Ramírez, M. (2006). *Las zonas áridas y semiaridas de México*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Di Matteo, A., Rigano, M. M., Sacco, A., Frusciante, L., & Barone, A. (2011). Genetic Transformation in Tomato: Novel Tools to Improve Fruit Quality and Pharmaceutical Production. In M. A. Alvarez (Ed.), *GENETIC TRANSFORMATION* (pp. 55–80). Rijeka, Croatia: InTech.
- (FAO), Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación. (2013). *Afrontar la escasez de agua - un marco de acción para la agricultura y la seguridad alimentaria*. Cooperación Italiana para el Desarrollo.
- (FAOSTAT), FAO Statistical Databases .2019. Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación (FAO) [En línea]. Consultado el 30 de Enero de 2019. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>
- (FIRA), Fideicomisos Instituidos en Relación a la Agricultura. Fondo de Garantía y Fomento Agricultura, Ganadería y Avicultura: Agrocostos. [En línea]. Consultado el 01 de junio de 2019. Disponible en: <https://www.fira.gob.mx/Nd/Agrocostos.jsp>
- Flores, J., Ojeda-Bustamante, W., López, I., Rojano, A., & Salazar, I. (2007). Requerimientos de riego para tomate de invernadero. *Terra Latinoamericana*, 25(2), 127–134.
- Foolad, M. R. (2007). Tolerance to Abiotic Stresses. In *Genetic Improvement of Solanaceous Crops: Tomato* (pp. 521–590). Enfield, USA: Science Publishers.

- Fonseca-Rodríguez, R. (2013). *Caracterización Molecular de Líneas de Silenciamiento Génico en Tomate*. UNIVERSIDAD DE ALMERÍA.
- Gaxiola, R. A., Li, J., Undurraga, S., Dang, L. M., J., A. G., & Alper, S. L. (2001). Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(20), 11444–11449.
<http://doi.org/https://doi.org/10.1073/pnas.191389398>
- González, P. (2013). Geographical distribution of wild tomatoes (*Solanum Lycopersicon* (Mill.) Wettst. Solanaceae). *Arnaldoa*, *20*(2), 301–314.
- Hernandez-Esquivel, A. K. (2015). Modificación genética de plantas mediante cisgénesis e intragénesis ¿Un reto regulatorio? Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Horsch, R. B., Fraley, R. T., Rogers, S. G., Sanders, P. R., Lloyd, A., & Hoffman, N. (1984). Inheritance of Functional Foreign Genes in Plants. *Science*, *223*(4635), 496–498. <http://doi.org/10.1126/science.223.4635.496>
- Hsiao, T. C., & Xu., L.-K. (2000). Sensitivity of growth of roots versus leaves to water stress: biophysical analysis and relation to water transport. *Journal of Experimental Botany*, *51*(350), 1595–1616.
<http://doi.org/https://doi.org/10.1093/jexbot/51.350.1595>
- Káttia, H., Lipp, J., & Brown, T. A. (1993). Enhanced transformation of tomato co-cultivated with *Agrobacterium tumefaciens* C58 C1Rif^r :: pGSFR1161 in the presence of acetosyringone. *Plant Cell Reports*, *12*, 422–425.
- Lu, C., Li, Y., Chen, A., Li, L., Zhuo, J., Tian, H., ... Zu, B. (2010). LeERF1 improves tolerance to drought stress in tomato (*Lycopersicon esculentum*) and activates downstream stress-responsive genes. *African Journal of Biotechnology*, *9*(38), 6294–6300.
- McCormick, S., Niedermeyer, J., Fry, J., Barnason, Horsch, & Fraley. (1986). Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports*, *5*, 81–84.
- Matthew, P., Primavesi, L. F., Jhurrea, D., & Zhang, Y. (2008). Trehalose Metabolism and Signaling. *Annual Review of Plant Biology*, *59*, 417–441.
[http://doi.org/1543-5008/08/0602-0417\\$20.00](http://doi.org/1543-5008/08/0602-0417$20.00)
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., & Mittler, R. (2009). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell & Environment*, *33*(4), 453–467.

- Miranda, J. A., Avonce, N., Suárez, R., Thevelein, J. M., Van Dijck, P., & Iturriaga, G. (2007). A bifunctional TPS-TPP enzyme from yeast confers tolerance to multiple and extreme abiotic-stress conditions in transgenic *Arabidopsis*. *Planta*, 226(6), 1411–1421. <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0579-y>
- Moreno-Cárdenas, A. B. (2013). *Caracterización de líneas transgénicas de Arabidopsis para el estudio de la supresión de silenciamiento transcripcional en geminivirus*. Universidad Internacional de Andalucía.
- Moyano-Solera, E. (2013). *Sobreexpresión de genes en Tomate y Generación de líneas T-DNA en la Especie Silvestre Solanum pennellii para identificar determinantes de la tolerancia al estrés hídrico y la salinidad*. Universidad de Murcia.
- Nahar, K., & Gretzmacher, R. (2011). Response of Shoot and Root Development of Seven Tomato Cultivars in Hydroponic System under Water Stress. *Academir Journal of Plant Sciences*, 2, 57–63.
- Nuccio, M. L., Rhodes, D., McNeil, S. D., & Hanson, A. D. (1999). Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, 2(2), 128–134. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(99\)80026-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(99)80026-0)
- Pandey, S. K., Nookarajua, A., Upadhyaya, C. P., Gururani, M. A., Venkatesh, J., Kim, D. H., & Park, S. W. (2011). An Update on Biotechnological Approaches for Improving Abiotic Stress Tolerance in Tomato. *Crop Science*, 51, 162–171.
- Pineda, B., García-Abellán, J. O., & Antón, T. (2012). Tomato: Genomic Approaches for Salt and Drought Stress Tolerance. *Improving Crop Resistance to Abiotic Stress*, 1&2, 1085–1120.
- Praena-Tamayo, J. (2017). *Identificación y Caracterización de Mutantes Afectados en el Desarrollo Temprano en Líneas T-DNA de Tomate y Solanum pimpinellifolium*. Universidad Politécnica de Valencia.
- Potters, G., Pasternak, T. P., Guisez, Y., Palme, K. J., & Jansen, M. A. . (2007). Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends in Plant Science*, 12(3), 99–105.
- Rick, C., & Yoder, J. (1978). Classical and molecular genetics of the tomato: highlights and prospects. *Annual Review Genetics*, 22, 281–300.
- Rick, C. M., & Chetelat, R. T. (1995). Utilization of related wild species for tomato improvement. *Acta Horticulturae*, 412, 21–38.

- Saad, F. F., El-Mohsen, A. A., El-Shafi, M. A., & Al-Soudan, I. H. (2013). Effective Selection Criteria for Evaluating Some Barley Crosses for Water Stress Tolerance. *Egyptian Journal of Plant Breeding*, 6(79–89). <http://doi.org/10.12816/0011664>
- (SIAP), Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2019. Anuario estadístico de la producción agrícola [En línea]. Consultado el 29 de enero de 2019. Disponible en: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Romero-Escobedo, S. (2017). *TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE TOMATE (Solanum lycopersicum L.) CON GENES DE BIOSÍNTESIS DE TREHALOSA*. Universidad Autónoma Chapingo.
- Suárez, R., Calderón, C., & Iturriaga, G. (2009). Enhanced Tolerance to Multiple Abiotic Stresses in Transgenic Alfalfa Accumulating Trehalose. *Crop Science*, 49(5), 1791–1799. <http://doi.org/doi:10.2135/cropsci2008.09.0573>
- Tung, S., Smeeton, R., White, C. A., Black, C. R., Taylor, I. B., & Thompson, A. J. (2008). Over-expression of LeNCED1 in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) with the rbcS3C promoter allows recovery of lines that accumulate very high levels of abscisic acid and exhibit severe phenotypes. *Plant Cell & Environment*, 31, 968–981.
- (UN COMTRADE), United Nations International Trade Statistics Database. 2019. Department of Economic and Social Affairs of the United Nations [En línea]. Consultado el 27 de Enero de 2019. Disponible en: <https://comtrade.un.org/data/>
- Vanini, C., Campa, M., Iriti, M., Genga, A., F., F., Carravieri, S., & Rossoni, M. (2007). Evaluation of transgenic tomato plants ectopically expressing the rice *Osmyb4* gene. *Plant Science*, 173, 231–239. <http://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.05.007>
- Wahb-Allah, M. A., Alsadon, A. A., & Ibrahim, A. . (2011). Drought Tolerance of Several Tomato Genotypes Under Greenhouse. Conditions World. *Applied Sciences Journal*, 15(7), 933–940.
- Zentella, R., Mascorro-Gallardo, J. O., Van Dijck, P., Folch-Mallol, J., Bonini, B., Van Vaeck, C., Gaxiola, R., Covarrubias, A. A., Nieto-Sotelo, J., Thevelein, J. M., ... Iturriaga, G. (1999). A *Selaginella lepidophylla* trehalose-6-phosphate synthase complements growth and stress-tolerance defects in a yeast *tps1* mutant. *Plant physiology*, 119(4), 1473–82.

DETECCIÓN DE PLANTAS TRANSFORMADAS T₁ DE JITOMATE CON GENES DE BIOSÍNTESIS DE TREHALOSA

Vidal Siles, E.F.; Mascorro-Gallardo, J.O.; Rodríguez-Pérez, J.E.; Rodríguez-De-la-O, J.L.

RESUMEN

El desarrollo de plantas transgénicas no termina con la obtención de individuos transformantes (T₀). debido a que son hemicigóticos, y sus descendientes presentan segregación se requiere de la obtención de líneas homocigóticas. Así, mediante la detección oportuna, será posible descartar aquellas plantas acigóticas (sin genes foráneos) para fijar líneas homocigóticas con el transgén. El proceso de selección se facilita, mediante el manejo de genes de selección, fusionados al constructo con los genes foráneos de interés, por lo cual en el presente trabajo se llevó a cabo la detección en plantas T₁ de jitomate, derivadas de plantas supuestamente transformadas con los vectores pBIN y pTF101.1, que poseen los genes de selección NPTII ó BAR respectivamente, identificados mediante amplificación por PCR. Cabe destacar que dentro de los vectores señalados, se encontraba la construcción *ScTPS-Sc1TPS2*, fusionada tanto con el promotor 35S, como con el promotor Rd29A, los cuales permiten acumular trehalosa, confiriendo tolerancia a sequía (característica que se busca obtener en las plantas transgénicas del presente estudio). Sólo pudieron detectarse siete plantas transformadas T₁ provenientes de tres eventos independientes T₀. Habrá que llevar a cabo más análisis para determinar si la poca frecuencia de plantas positivas se debe a que se obtuvieron muchas plantas T₀ falsas transformantes, o hay fallas en el procedimiento de detección por PCR, ya sea debido a la presencia de contaminantes presentes en el ADN genómico empleado y/o a poca repetibilidad del protocolo de PCR debido a los pares de iniciadores empleados. Para descartar estos factores también podría hacerse una detección de los transgenes por RT-PCR para confirmar la presencia de los transgenes y la expresión de los mismos en los eventos obtenidos.

Palabras clave: *BAR*, *NPTII*, tomato, transgenicas, trehalosa

INTRODUCCIÓN

La ingeniería genética provee con una serie de herramientas para superar las limitaciones que presentan los métodos convencionales de mejoramiento genético en *Solanum lycopersicum*, al permitir la rápida integración de nuevos alelos a líneas de tomate previamente desarrolladas para conferirles nuevos caracteres deseables (Di Matteo *et al.*, 2011), que otorguen tolerancia a sequía, siendo uno de estos, la acumulación de osmolitos dentro de las plantas, que mantienen la estabilidad de estructuras celulares bajo condiciones de estrés hídrico (Nuccio *et al.*, 1999). Dentro de este tipo de sustancias, se encuentra la trehalosa, la cual protege las enzimas y membranas celulares, evitando su desnaturalización, durante la presencia de sequías extremas (Avonce *et al.*, 2004), estudiado previamente por Miranda *et al.*, (2007) quienes observaron los efectos de la sobreexpresión en *Arabidopsis thaliana*, al generar líneas con la fusión traduccional quimérica trehalosa-6-fosfato sintasa /fosfatasa (TPS-TPP) con los genes de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, encontrando incremento significativo de tolerancia a sequía, heladas, salinidad y calor.

Efectos similares se reportan en cultivos forrajeros como la alfalfa, donde la fusión TPS1-TPS2 impulsada por el promotor rd29A, además de inducir la tolerancia a sequía y salinidad, provocó un aumento significativo en la biomasa de la planta a nivel del follaje (Suárez, Calderón, y Iturriaga, 2009). Romero-Escobedo (2016) reporta que es posible generar plantas de jitomate usando construcciones $35S::ScTPS1TPS2::NOS$ y $Rd29A::ScTPS1TPS2::NOS$, donde ScTPS1TPS2 es una fusión traduccional de los genes *TPS1* y *TPS2* de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

El proceso de transformación genética en sí no garantiza el desarrollo exitoso de variedades transgénicas al obtener una primera generación de plantas transformadas (T_0). Es necesario detectar aquellos individuos que sean transformados. Por ello, se requiere que la construcción a introducir contenga genes de selección necesarios durante el proceso de transformación por agroinfección de cultivos *in vitro* donde se espera regenerar plantas

transformadas con eficiencia alta y faciliten la detección de los tejidos con los genes de interés. Para ello se utilizan genes de selección tales como BAR (Gómez-Kosky *et al.*, 2010; Jiménez y Chaparro-Giraldo, 2016; Lebedev *et al.*, 2016), y NPTII (De Vries y Wackernagel, 1998; Smalla *et al.*, 1993).

La fosfonitricina (PPT) es el ingrediente activo de algunos herbicidas comerciales, que actúa como inhibidor competitivo de la enzima glutamina sintasa, la cual interviene en la asimilación del nitrógeno, originando la acumulación de niveles tóxicos de amonio en las plantas (Tachibana *et al.*, 1986). El gen BAR, procedente de *Streptomyces hygrosopus* (Thompson *et al.*, 1987), el cual codifica la proteína fosfinotricina n-acetil transferasa (PAT), que acetila el grupo NH₂ de la PPT, que da lugar a la formación de N-acetil fosfinotricina, de esta forma destoxificando el herbicida en una forma inocua para el tejido vegetal (Dröge *et al.*, 1992).

La kanamicina es un antibiótico descubierto en 1957, englobado dentro de la categoría de aminoglucósidos, que constituyen moléculas hidrofílicas, formadas por dos o más azúcares, unidos por enlaces glucosídicos a un núcleo hexosa con grupos hidroxilo (aminociclitol), (Pancoast, 1988).

Posteriormente y a través de un mecanismo activo oxígeno-dependiente penetran la membrana celular, y provocar alteraciones en sus funciones fisiológicas (induce desequilibrio osmótico al provocar el escape sin control de iones como sodio, potasio, etc.), de acuerdo a Delgado-Rodríguez, (1990). Su sitio de acción es la subunidad pequeña del ribosoma al unírsele irreversiblemente, y provocar errores de traducción, además, indirectamente evita el proceso de traslocación cuando se incorpora un aminoacil ARNt, que provoca la terminación temprana e incorrecta de la síntesis proteica (Davis *et al.*, 1973). Al detenerse la traducción, se forman proteínas con una configuración errónea o enteramente diferente, e inducir muerte celular al no sintetizar las proteínas necesarias para procesos biológicos imprescindibles celulares (Graham *et al.*, 2002).

El gen NPTII fue descubierto inicialmente en el transposón Tn5 de la bacteria gramnegativa *Escherichia coli* (Beck *et al.*, 1982) y codifica la enzima neomicina fosfotransferasa II, que actúa sobre kanamicina y aminoglicósidos análogos como paromomicina, genitamicina, y butirosina (Mella *et al.*, 2004), al transferir el grupo fosfato de un ATP a un grupo 3-hidroxilo de la porción amino-hexosa de los antibióticos antes mencionados, al detoxificar por fosforilación al impedir la unión de la kanamicina a la subunidad menor ribosomal y permitir finalmente la síntesis de proteínas (Goldstein *et al.*, 2005). Esto permite el crecimiento de tejidos transformados con este gen aún en presencia de esta sustancia, lo cual facilita su uso como marcador de selección en medios *in vitro* en trabajos de transformación genética.

Una cuestión importante a describir es el hecho de que en la primera generación de plantas transgénicas (T_0), existe al menos una sola integración del transgen de interés, (junto con los de selección), lo que las hace hemicigóticas (Moreno-Cárdenas, 2013). Por lo cual, es necesario obtener descendientes con ambas copias mediante segregación (apéndice 6) al autofecundar los individuos T_0 , para encontrar plantas en condición homocigótica en la siguiente generación, es decir T_1 (Fonseca-Rodríguez, 2013).

Al transformar plantas, no solo se inserta la construcción bifuncional, sino que además, esta se encuentra estrechamente unida a un gen de marcador de selección, que pueden ser heredados y por tanto, posibles de detectar en el ADN de la descendencia y amplificarlo de forma artificial con el empleo de la Reacción de la Cadena de la Polimerasa (PCR, *Polimerase Chain Reaction*).

Por todo lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue detectar progenies T_1 con el gen BIF *ScTPS1-ScTPS2*, mediante la amplificación de genes de selección (NPTII ó BAR) mediante el uso de PCR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de progenie (T₁)

Se sembraron semillas obtenidas de una primera generación de plantas de jitomate (Apéndice 2) que las cuales fueron consideradas como transformadas (T₀), con el vector pBIN con el gen de selección *NPTII*, con la construcciones *RD29A::ScTPS1TPS2::NOS* y *35S::ScTPS1TPS2::NOS* (Figura 1); así mismo se empleó el vector pTF, con el gen de selección *BAR*, con las construcciones *RD29A::ScTPS1TPS2::NOS* y *35S::ScTPS1TPS2::NOS* (Figura 2), destacándose los eventos: NPTII35S-6, NPTII35S-8, NPTIIRd-5, NPTIIRd-6, NPTIIRd-13, NPTIIRd-20, NPTIIRd-34, NPTIIRd-35, NPTIIRd-37, NPTIIRd-39, BAR35S-1, BAR35S-3, BAR35S-9, BARRD-3, BARRD-7, BARRD-8, BARRD-9 y BARRD-10, BARRD-12, BARRD-15 y BARRD-17. Estos eventos fueron identificados mediante amplificación del gen de selección *NPTII*, *BAR* y *TPS1* o *TPS2* (Romero Escobedo, 2017). Se analizaron un total de 205 plantas.

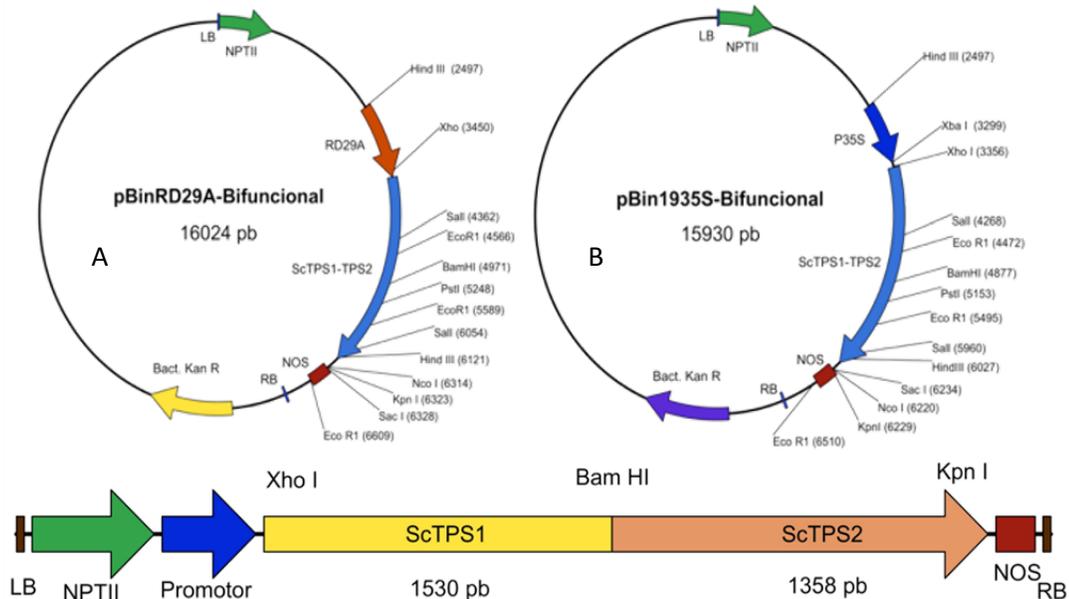


Figura 1. Vector pBin19. Contiene el gen de selección *NPTII* y con el cual se realizaron las construcciones: A) *Rd29A::ScTPS1TPS2::NOS*, donde *RD29* es el promotor inducible y B) *35S::ScTPS1TPS2::NOS*, donde *35S* es el promotor constitutivo. (Romero Escobedo, 2017).

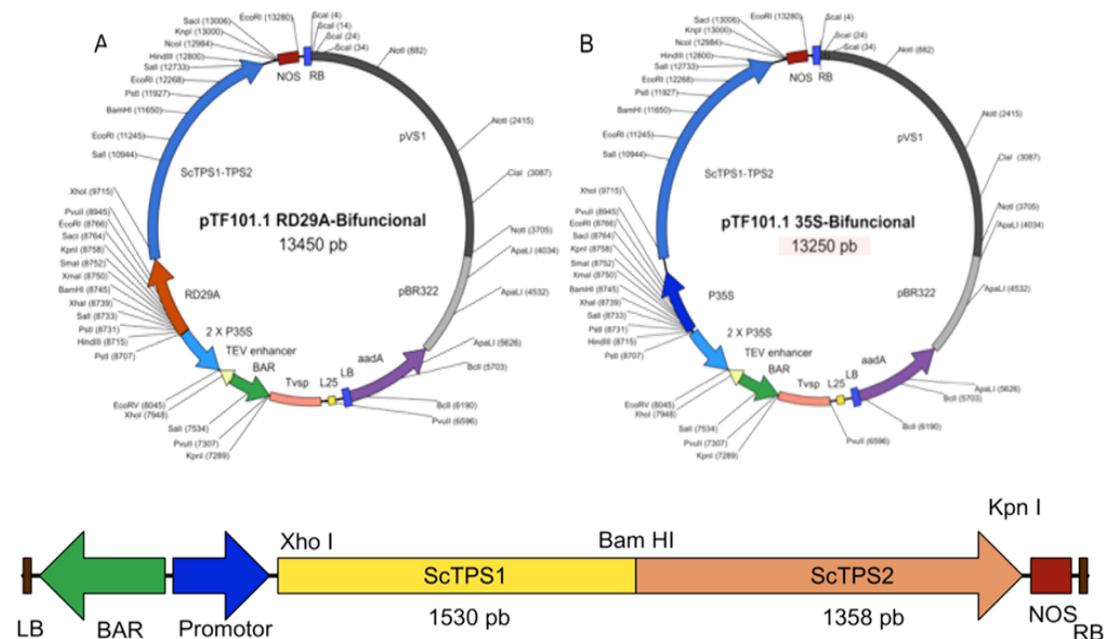


Figura 2. Vector pTF101.1. Contiene el gen de selección *BAR* y con el cual se realizaron las construcciones: A) *Rd29A::ScTPS1TPS2::NOS*, donde *RD29* es el promotor inducible y B) *35S::ScTPS1TPS2::NOS*, donde *35S* es el promotor constitutivo (Romero Escobedo, 2017).

Posteriormente se estableció una muestra de diez individuos descendientes de cada evento mencionado bajo condiciones de invernadero, en la distribución espacial descrita en el Apéndice 3. Este tamaño se debió principalmente por el limitado espacio disponible, considerándose que es lo suficiente representativo para apreciar la segregación esperada en la generación T_1 de 3:1, esperando que la herencia de los marcadores de selección (*BAR* o *NPTII*), se comporten como dominancia simple, así esperándose encontrar siete plantas T_1 con amplificación de los genes de selección y tres plantas sin estos y al encontrarse los genes de síntesis de trehalosa (*ScTPS1-ScTPS2*) fusionados a los marcadores antes descritos se asumiría en consecuencia su presencia en las plantas analizadas.

Ajuste de temperatura de alineamiento (T_m) en el protocolo de PCR

Se ajustaron las condiciones de detección de los genes de selección con PCR, modificando el factor correspondiente a temperatura de alineamiento, contemplando los valores correspondientes de 53, 56, 57 y 59 °C.

Se detectaron las temperaturas óptimas de amplificación para los genes *BAR* y *NPTII*, los cuales generan secuencias con tamaños de 780 y 276 pb respectivamente. Se emplearon los iniciadores: *NPTII*-5': 5'-AGA TGG ATT GCA CGC AGG TTC-3'; *NPTII*-3': 5'-GAA GAA CTC GTC AAG AGG GCG-3'; *BAR*-5': 5'-CGA GAC AAG CAC GGT CAA CTT C-3' y *BAR*-3': 5'-GAA ACC CAC GTC ATG CCA GTT C-3'. La mezcla de cada muestra sometida a la reacción PCR consistió en 2 μ L de dNTPs (a 2 mM), 2 μ L de 10X buffer PCR (con Mg), 2 μ L de cada iniciador (a 10 μ M), 1 U Taq Polimerasa (0.2 μ L) y 2 μ L de ADN a concentración de 100 $\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$. Las reacciones se ajustaron a un volumen final de 20 μ L con agua estéril.

Se emplearon muestras de ADN de eventos T_0 obtenidos y detectados como positivos por Romero-Escobedo (2016). Como control positivo se emplearon los plásmidos pBIN35SBif (para gen *NPTII*) y plásmido pTF35SBif (para gen *BAR*). La PCR se llevó a cabo en el Termociclador de gradiente Axygen® MaxyGene™, modelo Therm-1001, cada programa presentaba la variación respecto a la temperatura de alineamiento a 53, 55, 57 y 59 °C con la duración de 30 segundos, pero coincidiendo con la temperatura de alineamiento a 95°C por 60 segundos; con extensión a 72°C por 60 segundos con la duración de 40 ciclos; con un periodo de pre-desnaturalización de cinco minutos a 95°C y uno de extensión final con duración de cinco minutos a 72°C. Las condiciones establecidas fueron empleadas para ambos genes.

Las muestras procesadas fueron sometidas a electroforesis por una hora a 105 V, en gel de agarosa al 1 %, con tampón TAE 1X (40 mM Tris, 20 mM acetato glacial , 1 mM EDTA) , y se depositaron 10 μ L de ADN procedentes de la reacción y 2 μ L de amortiguador de carga (azul de bromoferol 0.25 %, glicerol 50 % y EDTA 10 Mm). Posteriormente el gel se tiñó en bromuro de etidio (5 $\mu\text{g}\text{mL}^{-1}$), y fotodocumentó con equipo Vilber Lourmant Documentation System®, modelo DP-001.FDC, en transiluminador (High Performance Ultraviolet Transilluminator UVP®, Modelo TFS-20V, Capitol Scientific™, Upland, C.A., USA).

DetECCIÓN DE PLANTAS T₁ POR PCR

Una vez ajustadas las condiciones de PCR, a las plantas de jitomate T₁ se les extrajo ADN genómico sin uso de nitrógeno líquido y sin el uso de ARNasas (de acuerdo a la propuesta descrita en el siguiente capítulo). El ADN extraído se cuantificó con un micro-espectrofotómetro Nano-200® (HANGZHOU ALLSHENG INSTRUMENTS CO.,LTD™, Hangzhou, China). Posteriormente se ajustó su concentración a 100 ngμL⁻¹.

La PCR de las muestras de ADN de las plantas T₁, se llevó a cabo bajo las condiciones descritas anteriormente en el ensayo, el cual permitió conocer la temperatura de alineamiento óptima para la amplificación exitosa de los genes deseados. Se usaron 200 ng de ADN de las muestras, bajo el programa: 95°C durante 60 segundos (desnaturalización), 57°C durante 30 segundos (alineamiento), 72°C durante 60 segundos (extensión) por 40 ciclos; además de un periodo de pre-desnaturalización (95°C) de 5 minutos y uno de extensión final (72°C) de 5 minutos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Temperatura de alineamiento óptima

De acuerdo a las Figuras 3 y 4 la temperatura de alineamiento óptima tanto para el gen *NPTII* como *BAR* resultó ser 57°C, ya que generó una amplificación exitosa, reflejada mediante las bandas obtenidas de los controles positivos. Si bien en algunas muestras de ADN, no hubo señal de amplificación, se asume que fue debido a que eran provenientes de plantas no transformadas.

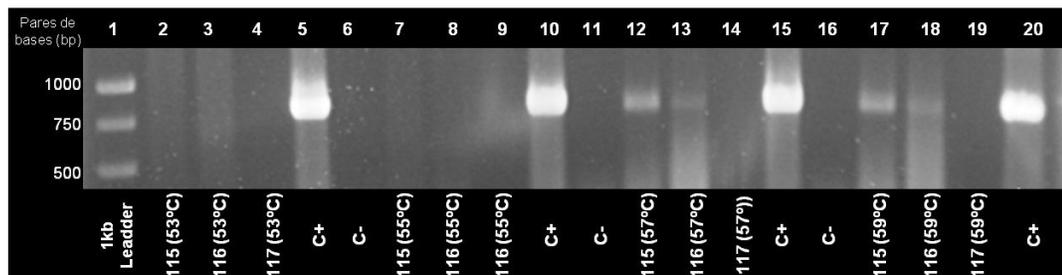


Figura 3. Amplificación en cuatro temperaturas para el gen *NPTII*. Se empleó ADN de plantas T₀: NPTII-Rd-33 (115), NPTII-Rd-34 (116) y NPTII-Rd-35 (117) obtenidas por Romero-Escobedo (2016). El control positivo fue el plásmido pBIN35SBif; el control negativo fue una muestra sin ADN.

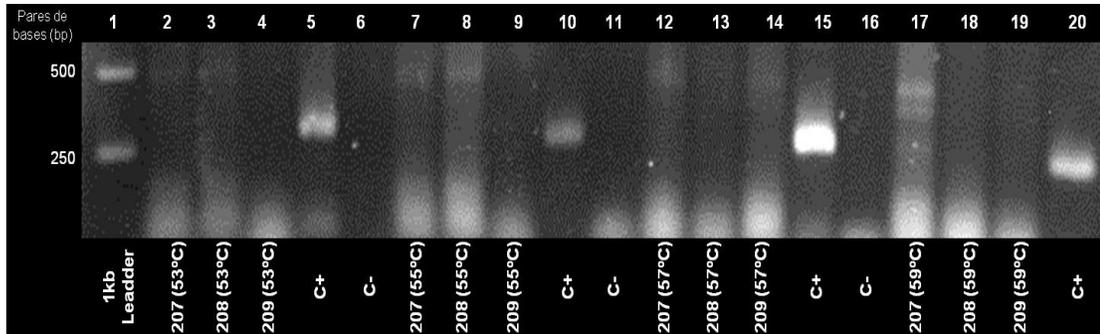


Figura 4. Amplificación en cuatro temperaturas para el gen *BAR*. Se empleó ADN de los eventos T₁: BAR35S-9.1 (207), BAR35S-9.2 (208) y BAR35S-9.3 (209), procedentes de plantas T₁. El control positivo fue el plásmido pTF35SBif y como control negativo una muestra sin ADN.

La hibridación es una etapa de la PCR donde se forman y se rompen constantemente los puentes de hidrógeno entre los iniciadores y el ADN, y aquellas uniones más estables (complementarias) durarán mayor tiempo, quedando los iniciadores “alineados”, formando una pequeña región de doble cadena, que posteriormente permitirá la unión de la polimerasa a la cadena de ADN (Asuar, 2007). Cada iniciador requiere una temperatura específica para la hibridación (Saiki *et al.*, 1988), siendo esta la temperatura de alineamiento (T_m).

La variabilidad de este factor influye en la consecuente alineación y amplificación de las secuencias de interés porque un aumento en la temperatura favorece la especificidad al disminuir las uniones incorrectas de los iniciadores con la cadena molde de ADN (Aoyaki, 2001; Praena-Tamayo, 2017).

Con los iniciadores *NPTII-5'* y *NPTII-3'*, al observarse que a pesar de la variación de la temperatura de alineamiento en la PCR, mantenían el mismo nivel de amplificación del gen *NPTII*, se asume que la afinidad de los cebadores mencionados se mantiene constante a pesar de la variación del factor antes mencionado, lo cual es demostrado por múltiples autores que reportan la amplificación del gen *NPTII* con cebadores similares, usando T_m de 50 °C (Smalla *et al.*, 1993), 54 °C (Suratman y Ughude, 2013), e incluso 58°C (De Vries y Wackernagel, 1998).

Los iniciadores *BAR-5'* y *BAR-3'*, al igual que en el caso anterior, funcionaron bajo los gradientes empleados, lo que implicaría que estos mantienen su capacidad de alineamiento dentro del rango establecido, siendo la T_m óptima a 57°C, valor cercano, a los mencionados por Esparza-Soltero *et al.*, (2015) y Lebedev *et al.* (2016), quienes manejaron T_m de 56 °C y 59 °C respectivamente con iniciadores del mismo tipo. Por esta razón, el valor de 57 °C para T_m , fue utilizado para efectos del presente trabajo de investigación.

Identificación de plantas T_1

En las Figuras 5 y 6, donde se muestran las bandas que revelan la presencia, tanto del gen *NPTII*, como del gen *BAR*, se encontró que de la gran mayoría de las plantas de jitomate T_1 obtenidas, solo se detectó el gen en unas pocas plantas, siendo que los descendientes del evento NPTIIRD-6, con el promotor RD29A, se presentó un caso positivo, por otro lado, la progenie de los eventos BAR35S-3 y BAR35S-9 (ambos con el promotor constitutivo 35S) presentaron tres casos cada uno.

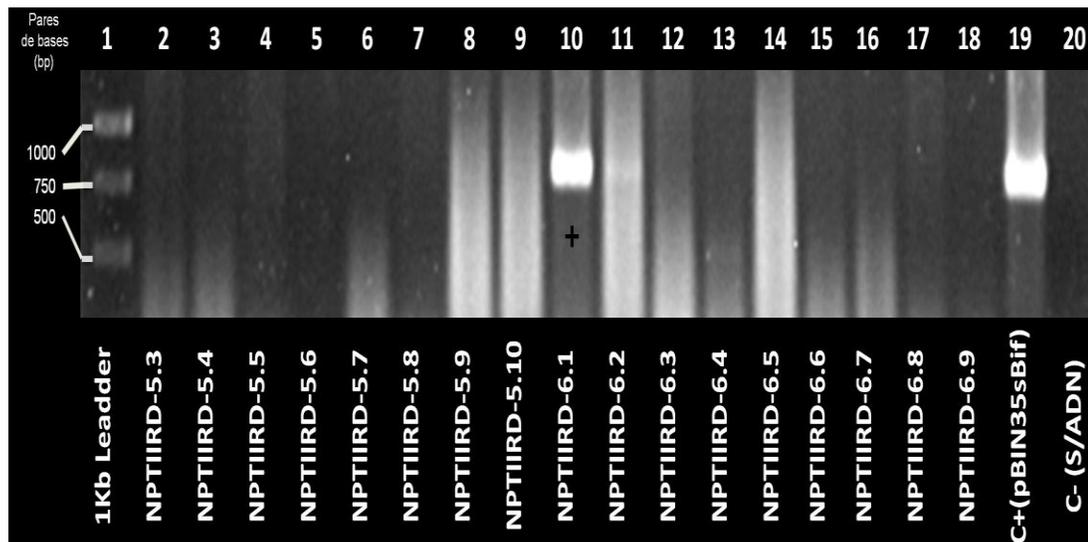


Figura 5. Identificación de plantas positivas T_1 derivadas de los eventos NPTIIRD-5 y NPTIIRD-6. Se manifestó la amplificación del gen *NPTII*, con formación de una banda con tamaño esperado de 780 pb. Nótese que la muestra detectada como positiva se encuentra marcada con el símbolo +.

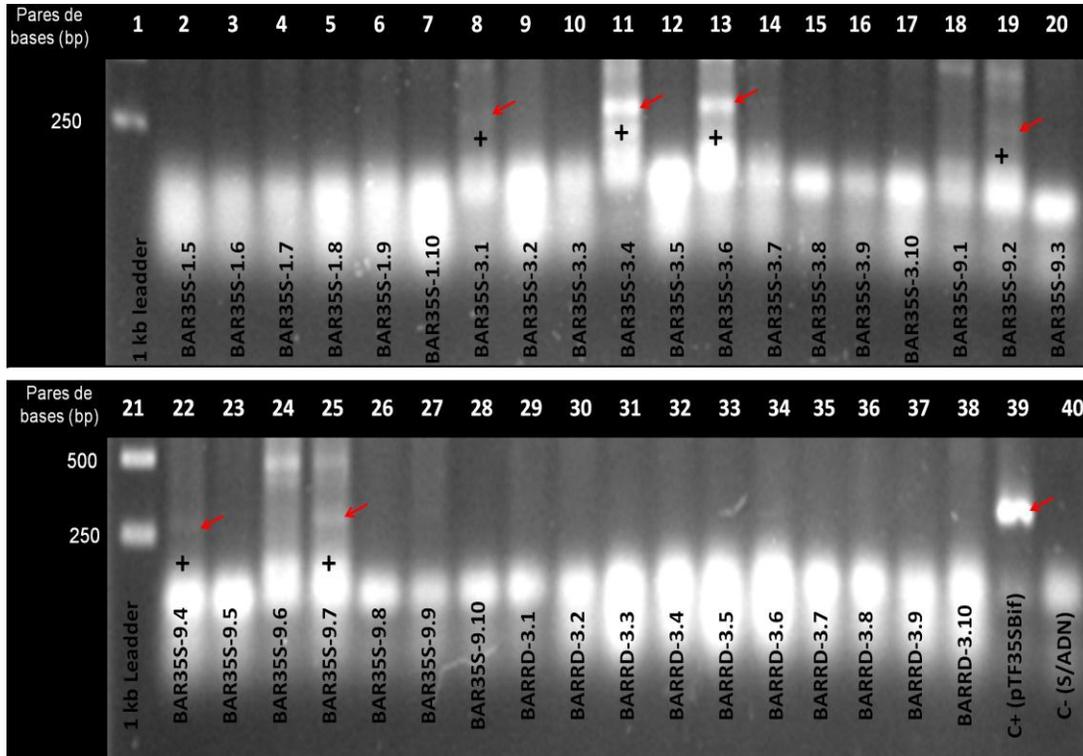


Figura 6. Identificación de plantas positivas transgénicas T1 derivadas de los eventos BAR35S-1, BAR35S-3, BAR35S-9, BARRD-3, BARRD-7, BARRD-8, BARRD-9 y BARRD-10. Se manifestó la amplificación del gen BAR, con formación de bandas con tamaño esperado de 276 pb. Nótese que la muestras detectadas como positivas se encuentran marcadas con el símbolo +.

Las plantas transformadas con el gen BAR, no manifestaron el mismo nivel de amplificación, expresado en las respectivas bandas de 279 kb tenues y en algunos casos difíciles de visualizar en cada muestra de ADN analizada.

En aquellas plantas donde no se amplificaron los genes deseados, se deduciría que no son transformadas, al considerar que los eventos To NPTIIRd-5, NPTIIRd-13, NPTIIRd-20, NPTIIRd-34, NPTIIRd-35, NPTIIRd-37, NPTIIRd-39, BAR35S-1, BARRD-3, BARRD-7, BARRD-8, BARRD-9 y BARRD-10 al no generar descendientes transgénicos, fueron falsos transformantes.

Estos transgenes en la siguiente generación segregan como si fuesen genes dominantes de herencia mendeliana (Kaulen, Schell y Kreuzaler, 1986), con la la relación genotípica 1:2:1, donde se presentaría una planta con dos copias del trasgen (homocigota, *BIF/BIF*), dos plantas con solo una copia del gen

(manteniendo el estado hemicingótico, *BIF/+*) y una planta completamente acigota (que al no tener los genes insertados se comportaría completamente como una planta silvestre, *+/+*), de acuerdo a Fonseca-Rodríguez, (2013). La segregación de genes transgénicos se ilustra en el apéndice 6.

Los genes amplificados en el presente estudio, al estar fusionados con la construcción bifuncional *ScTPS1-TPS2*, permiten deducir que los individuos T_1 encontrados como transformados tienen la capacidad de sobreexpresar trehalosa y que en la prueba de PCR, al observarse la expresión del gen mediante bandas, se esperaría por lo tanto, obtener la relación fenotípica 3:1 (Plasencia-Martínez, 2015).

Para comprobar este hecho a la segregación observada, se le realizó una prueba de Bondad de Ajuste de Chi cuadrado con 1 grado de libertad, con un valor de $\chi^2=3.841$ y $p=0.05$, con la finalidad de verificar la relación fenotípica 3:1.

Sin embargo, esta condición no se apreció cumplirse para los casos expuestos anteriormente de acuerdo a la prueba descrita, tal como lo reportan Fonseca-Rodríguez (2013); Plasencia-Martínez (2015) y Praena-Tamayo (2017) para la detección del gen *NPTII*, y también como se esperaría para la detección del gen *BAR*, tal como lo descrito por Mihály *et al.* (2002) y Miller *et al.* (2002), esperándose que al menos la mitad dieran positivos si hubiera una inserción, y todas si hubiera dos inserciones independientes.

De manera contrastante en el análisis realizado a plantas transformadas con el gen reportero *GUS* con el gen *NPTII*, se obtuvo la proporción esperada, detectándose dentro de la progenie T_1 , siete plantas (Figura 7) confirmadas por PCR, así como también mediante tinción histoquímica con X-gluc (Figura 8) y con la prueba de Bondad de Ajuste de Chi cuadrado (cuadro 2).

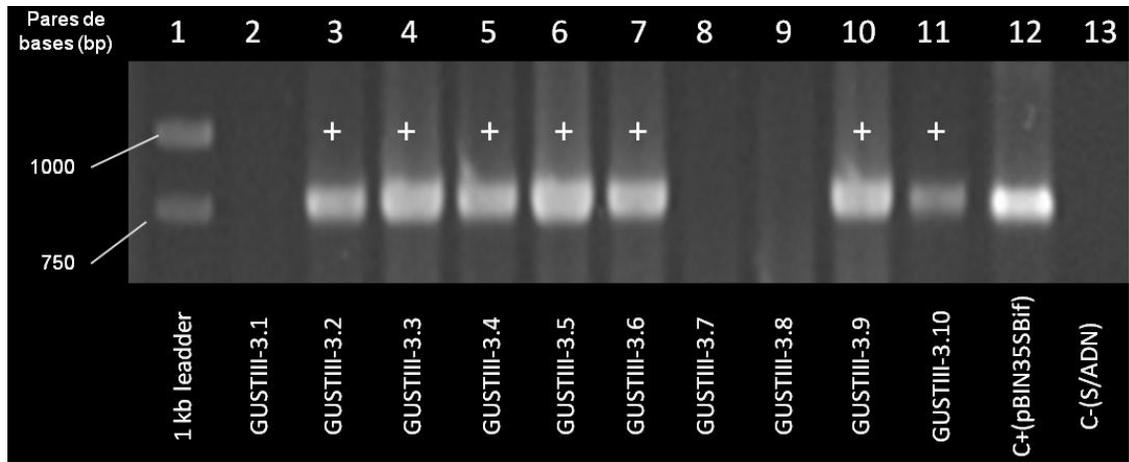


Figura 7. Identificación de plantas positivas T₁ derivadas del evento GUSTIII-3. Se manifestó la amplificación del gen *NPTII*, con formación de una banda con tamaño esperado de 780 pb. Nótese que la muestra detectada como positiva se encuentra marcada con el símbolo +.



Figura 8. Tinción de planta T₀ GUS 3-3 para detectar la expresión del gen reportero GUSint. Se analizó la progenie T₁ de esta planta y segregó en una relación 3:1 (1/4 GUS/GUS ½ GUS/+ y ¼ +/+).

Cuadro 2. Prueba de Ji cuadrada en plantas T₁ procedentes del evento GUSTIII-3 confirmadas con amplificación en PCR.

Fenotipo	Obs.	Esp.	(Obs-Esp)	(Obs-Esp) ²	$\frac{(Obs-Esp)^2}{Esp}$	χ^2 Calculada
NPTII+	7	6.66	0.33	0.1089	0.0163	0.049
NPTII-	3	3.33	-0.33	0.1089	0.0327	

Test de Bondad de Ajuste de Chi-cuadrado a 1 grado libertad, $\chi^2=3.841$ y $p=0.05$. Si el valor χ^2 es mayor al correspondiente al de probabilidad del 5 %, se rechaza la hipótesis.

Una posible razón, es la naturaleza del ADN extraído, con la probabilidad de que el material genético de las muestras, se encuentre contaminado con sustancias que interfieran en algunos extractos con la PCR al impedir el acople de la Taq polimerasa de la cadena molde de ADN (Peterson *et al.*, 1997), tales como compuestos fenólicos y taninos (Loomis, 1974), pudiendo provocar de esta manera falsos negativos (Singh *et al.*, 2002).

Por lo tanto, se deduciría que: o las plantas no están transformadas, o hay deficiencias en la detección a partir del ADN genómico por lo cual habría que probar otros iniciadores para la misma secuencia, o emplear otros mecanismos alternativos de detección, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa (RT-PCR), resultando ser esta una variante de la PCR.

La RT-PCR se lleva a cabo a partir de un extracto de ARN total que se utiliza para hacer una reacción de transcripción reversa con una enzima transcriptasa reversa, con lo cual se sintetiza una cadena de ADNc, que luego sirve como templado para la reacción de PCR con el mismo par de iniciadores empleados para la reacción de PCR con ADN genómico (Río, 2014).

Esta cualidad si bien permite llevar a cabo la detección y diagnóstico de actividad vírica (Kawasaki, 1990), podría ser utilizada para la detección de actividad de transgenes de una forma más reproducible al utilizar ARNm, libre de los contaminantes que pudiesen encontrarse presentes en ADN genómico, evitando sus respectivos inconvenientes, resultando factible de acuerdo con Miranda *et al.* (2007) quienes analizaron líneas de plantas de *Arabidopsis*

thaliana, transformadas con las construcciones *35S::TPS1-TPS2* y *RD29A::TPS1-TPS2*, tanto con PCR como RT-PCR, encontrando que no hay diferencias al momento de observar la amplificación de la fusión traduccional *ScTPS1TPS2* con las dos metodologías. En jitomate, la RT-PCR se implementó con éxito con la medición de la actividad del gen *FALSIFLORA* (promotor de floración) (Fernández- Montes, 2011).

Por lo cual esto podría en futuros trabajos conveniría contemplar el manejo de la RT-PCR para genotipar plantas transformadas dentro del desarrollo de variedades transgénicas de jitomate. Aunque esto sería deseable hacerlo desde la T_0 , cuando es importante identificar fehacientemente a los verdaderos transformantes, así como eventos que estén expresando el transgén y descartar los que no tengan el transgén o que si lo tengan pero presenten algún tipo de silenciamiento genético.

CONCLUSIONES

Sólo se detectaron siete plantas transformadas T_1 , descendientes de tres eventos independientes T_0 con la construcción bifuncional *ScTPS1-TPS2*, pero las proporciones obtenidas no coinciden con la segregación esperada de 3:1, con y sin el gen de selección *NPTII* o *BAR*. Se deben re-analizar los ADN genómicos de las plantas T_0 y sus progenies T_1 para descartar que la falta de plantas positivas se deba a que hubo muchos falsos transformantes T_0 o que hubo fallas en la detección tanto en T_0 como en T_1 . Como prueba adicional se debe analizar también la expresión de los transgenes por RT-PCR, pero esto de preferencia desde la T_0 , para poder detectar a las posibles plantas falsos transformantes, así como aquellas que presenten silenciamiento genético o falta de expresión de los transgenes introducidos.

LITERATURA CITADA

- Asuar, L. E. (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR. En L. E. Eguiarte, V. Souza, & X. Aguirre (Eds.), *Ecología Molecular* (pp. 517–540). Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Comisión Nacional para el conocimiento y Uso de la Biodiversidad. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6584>
- Aoyaki, K. (2001). PCR. En A. S. Gerstein (Ed.), *Molecular biology problems solver: A laboratory guide* (pp. 292–328). Wiley-Liss, Inc. Electronic.
- Avonce, N., Leyman, B., Mascorro-Gallardo, J. O., Van Dijck, P., Thevelein, J. M., & Iturriaga, G. (2004). The Arabidopsis Trehalose-6-P Synthase AtTPS1 Gene Is a Regulator of Glucose, Abscisic Acid, and Stress Signaling. *Plant Physiology*, 136(3), 3649–3659. <https://doi.org/10.1104/pp.104.052084>
- Beck, E., Ludwig, G., Auerswald, E. A., Reiss, B., & Schaller, H. (1982). Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Elsevier Biomedical Press*, 19, 327–336. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(82\)90023-3](https://doi.org/10.1016/0378-1119(82)90023-3)
- Cervantes-Ramírez, M. (2006). *Las zonas aridas y semiaridas de México*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Davis, B. D., Dulbecco, R., & Eisen, N. (1973). Proteín Syntesis. In *Microbiology* (2nd ed., pp. 300–303). Hagerstown, Maryland: Harper and Row.
- De Vries, J., & Wackernagel, W. (1998). Detection of nptII (kanamycin resistance) genes in genomes of transgenic plants by marker-rescue transformation. *Molecular and General Genetics*, 257(6), 606–613. <https://doi.org/10.1007/s004380050688>
- Di Matteo, A., Rigano, M. M., Sacco, A., Frusciantè, L., & Barone, A. (2011). Genetic Transformation in Tomato: Novel Tools to Improve Fruit Quality and Pharmaceutical Production. In M. A. Alvarez (Ed.), *GENETIC TRANSFORMATION* (pp. 55–80). Rijeka, Croatia: InTech.
- Dröge, W., Broer, I., & Pühler, A. (1992). Transgenic plants containing the phosphinothricin-N-acetyltransferase gene metabolize the herbicide L-phosphinothricin (glufosinate) differently from untransformed plants. *Planta*, 187(1), 142–151. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1080/0266736970130207>
- Esparza-Soltero, M. F., Santacruz-Ruvalcaba, F., Gutiérrez-Ortega, A., Cabrera-Ponce, J. L., & Sánchez Hernández, C. (2015). Silenciamiento del gen de la

prosistemina en callos de *Physalis philadelphica*. *E-CUCBA*, (3), 19–30. <https://doi.org/https://doi.org/10.32870/e-cucba.v0i3.24>

Fernández-Montes, A. (2011). *Transformación genética de tomate con el gen FALSIFLORA: caracterización fenotípica y molecular de un mutante insercional*. Universidad de Almería.

Fonseca-Rodríguez, R. (2013). *Caracterización Molecular de Líneas de Silenciamiento Génico en Tomate*. UNIVERSIDAD DE ALMERÍA.

Gómez-Kosky, R., Reyes-Vega, M., Bermúdez-Caraballosa, I., Chong-Pérez, B., & Alvarado-Capo, Y. (2010). Nuevo método para la selección rápida de plantas de banano (*Musa* spp. AAA cv. Grande naine) transformadas con gen bar procedentes de campo, empleando glufosinato de amonio. *Revista Colombiana de Biotecnología*, XII (2), 248–258.

Goldstein, D. A., Tinland, B., Gilbertson, L. A., Staub, J. M., Bannon, G. A., Goodman, R. E., Silvanovich, A. (2005). Human safety and genetically modified plants: a review of antibiotic resistance markers and future transformation selection technologies. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 7–23. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02595.x>

Jiménez, J. P., & Chaparro-Giraldo, A. (2016). Diseño in silico y evaluación funcional de genes semisintéticos que confieran tolerancia a fosfonitrina. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(2), 90.

Kaulen, H., Schell, J., & Kreuzaler, F. (1986). Light-induced expression of the chimerical chalcone Synthase-NPTII gene in tobacco cells. *The EMBO Journal*, 5(1), 1–8. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1986.tb04169.x>

Kawasaki, E. S. (1990). Amplification of RNA. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. Sninsky, & T. White (Eds.), *PCR protocols: A guide to methods and applications* (pp. 21–22). San Diego, USA: Academic Press.

Lebedev, V. G., Faskhiev, V. N., Kovalenko, N. P., Shestibratov, K. A., & Miroshnikov, A. I. (2016). Testing transgenic aspen plants with bar gene for herbicide resistance under semi-natural conditions. *Acta Naturae*, 8(2), 92–101.

Mella, S., Sepúlveda, M., González, G., Bello, H., Domínguez, M., Zemelman, R., & Ramírez, C. (2004). Aminoglucósidos-aminociclitolos: Características estructurales y nuevos aspectos sobre su resistencia. *Revista Chilena de Infectología*, 21(4), 330–338. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182004000400007>

- Mihály, R., Kótai, E., Kiss, O., & Pauk, J. (2002). In vitro selection of transformed foreign gene (bar) in wheat anther culture. *Acta Biologica Szegediensis*, *46*, 9–10.
- Miller, M., Tagliani, L., Wang, N., Berka, B., Bidney, D., & Zhao, Z. Y. (2002). High efficiency transgene segregation in co-transformed maize plants using an *Agrobacterium tumefaciens* 2 T-DNA binary system. *Transgenic Research*, *11*(4), 381–396. <https://doi.org/10.1023/A:1016390621482>
- Miranda, J. A., Avonce, N., Suárez, R., Thevelein, J. M., Van Dijck, P., & Iturriaga, G. (2007). A bifunctional TPS-TPP enzyme from yeast confers tolerance to multiple and extreme abiotic-stress conditions in transgenic *Arabidopsis*. *Planta*, *226*(6), 1411–1421. <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0579-y>
- Moreno-Cárdenas, A. B. (2013). *Caracterización de líneas transgénicas de Arabidopsis para el estudio de la supresión de silenciamiento transcripcional en geminivirus*. Universidad Internacional de Andalucía.
- Nuccio, M. L., Rhodes, D., McNeil, S. D., & Hanson, A. D. (1999). Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, *2*(2), 128–134. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(99\)80026-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(99)80026-0)
- Pancoast, S. J. (1988). Aminoglycoside antibiotics in clinical use. *Med. Clin. North Am.*, *72*, 581–612.
- Plasencia-Martínez, F. A. (2015). *Identificación y Caracterización de Mutantes Alterados en la Tolerancia a la Salinidad en Especies de Tomate. Papel del Gen SICBL 10 en los Mecanismos de Respuesta a Salinidad Señalizados por Ca⁺² en Tomate*. UNIVERSIDAD DE MURCIA. Disponible en: <http://nadir.uc3m.es/alejandro/phd/thesisFinal.pdf>
- Praena-Tamayo, J. (2017). *Identificación y Caracterización de Mutantes Afectados en el Desarrollo Temprano en Líneas T-DNA de Tomate y Solanum pimpinellifolium*. Universidad Politécnica de Valencia.
- Rio, D. C. (2014). Reverse transcription-polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Protocols*, *3*(11), 1207–1216. <http://doi.org/10.1101/pdb.prot080887>
- Romero-Escobedo, S. (2017). *TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE TOMATE (Solanum lycopersicum L.) CON GENES DE BIOSÍNTESIS DE TREHALOSA*. Universidad Autónoma Chapingo.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Mullis, K. B., & Erlinch, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, (239), 487–491.

- Singh, R., Nie, X., Singh, M., Coffin, R., & Duplessis, P. (2002). Sodium sulphite inhibition of potato and cherry polyphenolics in nucleic acid extraction for virus detection by RT-PCR. *Journal of Virology Methods*, *99*, 123–131.
- Smalla, K., Overbeek, L. S., Pukall, R., & Elsas, J. D. (1993). Prevalence of npt II and Tn 5 in kanamycin-resistant bacteria from different environments. *FEMS Microbiology Ecology*, *13*, 47–58.
- Suárez, R., Calderón, C., & Iturriaga, G. (2009). Enhanced tolerance to multiple abiotic stresses in transgenic alfalfa accumulating trehalose. *Crop Science*, *49*(5), 1791–1799. <https://doi.org/10.2135/cropsci2008.09.0573>
- Suratman, A., & Ughude, J. O. (2013). Detection of nptII Gene and 35SCaMV Promoter in Tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of Food and Pharmaceutical Sciences*, *1*, 10–1.
- Tachibana, K., Watanabe, T., Sekizawa, Y., & Takematsu, T. (1986). Inhibition of Glutamine Synthetase and Quantitative Changes of Free Amino Acids in Shoots of Bialaphos-treated Japanese Barnyard Millet. *J. Pesticide Sci*, *11*, 27–31. <https://doi.org/10.1584/jpestics.11.27>
- Thompson, C. J., Moval, N. R., Tizard, R., Cramer, R., Davies, J. E., Lauwereys, M., & Botterman, J. (1987). Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygrosopicus*. *The EMBO Journal*, *6*(9), 2519–2523. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2015.05.00>

COMPARACIÓN DE CINCO MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN DE JITOMATE CON Y SIN NITRÓGENO LÍQUIDO

Vidal Siles, E.F.; Mascorro-Gallardo, J.O.; Rodríguez-Pérez, J.E.; Rodríguez-De-la O, J.L.

RESUMEN:

La extracción de ADN genómico es uno de los pasos más importantes en estudios de ingeniería genética de plantas, por esta razón es relevante el desarrollo y manejo de protocolos optimizados que permitan la extracción de forma rápida, económica y confiable. Sin embargo una limitante para este proceso lo es en muchas ocasiones la falta de nitrógeno líquido cuyo uso y manejo encarecen los costes de obtención de ADN. Actualmente se han propuesto protocolos donde se prescinde el reactivo antes descrito, no obstante, no existen estudios para especies comerciales, tales como el jitomate (*Solanum lycopersicum* L.). Con la finalidad de obtener ADN de calidad y viable para estudios de Biología Molecular en jitomate, se evaluaron tres protocolos de extracción para el presente cultivo, siendo estos modificaciones a la metodología propuesta por Dellaporta. En la primera modificación no se elimina ARN; en el segundo además de lo anterior descrito, se emplea cloruro de litio para eliminar RNA y en el tercero se maneja la enzima ARNasa al 1%. Los tres métodos se compararon con otros dos métodos en los que si se utiliza N líquido. Se caracterizó el ADN en cuanto al rendimiento obtenido, su pureza, integridad y uso para la PCR durante la detección de eventos transformados. Se determinó que posible obtener ADN en suficiente cantidad y calidad independientemente de cada protocolo utilizado en el presente estudio.

Palabras clave: gen *NPTII*, extracción ADN, ARN, ARNasa, LiCl.

INTRODUCCIÓN

En cualquier prueba de análisis molecular, desde estudios de diversidad biológica, hasta detección de plantas transgénicas, es importante la extracción rápida, a bajo costo, con alta concentración y pureza de ADN como primer paso para llevar a cabo dichas pruebas de manera exitosa. Por ello es de suma importancia para investigadores la ejecución de un protocolo de obtención de ADN optimizado para este propósito. Los protocolos de extracción de ADN empleados en las diversas especies vegetales, comprenden por general cuatro etapas (Golberg, 2008), las cuales son homogeneización del tejido y lisis celular, separación de proteínas y lípidos, precipitación y disolución del ADN. En este primer paso generalmente se describe la inmersión del tejido vegetal en nitrógeno líquido como parte del proceso, necesario por el hecho de que el nitrógeno líquido (NL), que se encuentra a una temperatura de -196°C evita la degradación instantánea del material genético al inactivar nucleasas que se liberan al romper las estructuras celulares (Buckingham y Flaws, 2007) y facilita la ruptura mecánica del tejido vegetal (Golberg, 2008).

Sin embargo un problema habitual con el empleo de este reactivo es que en muchas ocasiones no se encuentra disponible en lugares remotos y siendo difícil conseguirlo, además de que requiere equipo especializado para su almacenamiento, lo cual encarece el proceso de extracción de ADN, representando una limitante. En respuesta, diversos autores recientemente han descrito que es posible prescindir del nitrógeno líquido para llevar a cabo la extracción de ADN. Esto se ha logrado mediante la modificación del Método CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio), reportándose en especies tales como *Artemisia Annua* L. (Agrawal *et al.*, 2017), *Oryza sativa* (Shamim *et al.*, 2016), en plantas del género *Stylosanthes* (Chandra y Tewari 2007), *Cuminum cyminum*, *Vigna aconitifolia*, *Pennisetum typhoides*, *Teco mastans*, *Lycium barbarum*, *Anogeis susacuminata*, *Teco mellaundulata*, *Zizy phumauritiana*, *Phoenix dactylifera* y *Eruca sativa* (Sharma *et al.*, 2003), etc.

Esto representa una ventaja potencial si se aplica en especies de cultivos comerciales, como jitomate (*Solanum lycopersicum* L.), donde no se ha reportado trabajos que describan el desarrollo de metodologías de extracción de ADN sin nitrógeno líquido, que representarían una aportación para aplicaciones diversas en biología molecular enfocados a esta especie hortícola en particular cuando es necesario genotipar por PCR u otras técnicas moleculares, cientos y a veces miles de individuos.

El objetivo del presente trabajo de investigación fue comparar técnicas de extracción de ADN sin nitrógeno líquido en jitomate para determinar el más indicado para llevar a cabo estudios moleculares en esta especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Para el presente trabajo se emplearon muestras de hojas jóvenes de cinco ejemplares de jitomate, descendientes (T_1) de plantas transformadas de la línea experimental L3 (T_0), con el vector 35SGUS-INT (Vancannet *et al.*, 1990, citado por Romero-Escobedo, 2017), que el cual contiene el gen reportero *GUS* y el gen de selección *NPTII*, que confiere resistencia a Kanamicina (Figura 9).

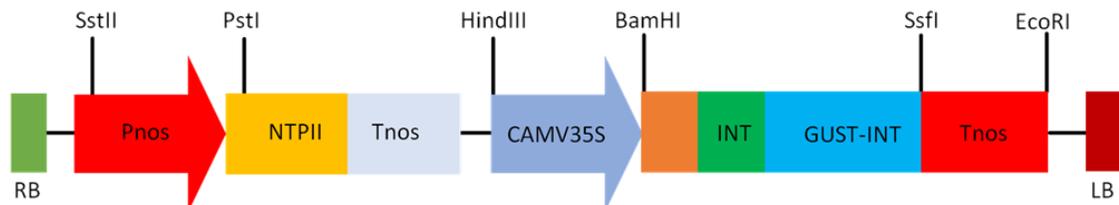


Figura 9. Región ADN-T del vector binario pGUSint con el gen *NPTII*. Modificado de Vancanney *et al.* (1990).

Extracción de ADN

Las metodologías expuestas en el presente trabajo, se proponen a partir de modificaciones del protocolo desarrollado por Dellaporta *et al.* (1983), en el cual se manejaron los siguientes buffers y reactivos:

Buffer de extracción de ADN genómico: NaCl (500 mM), EDTA (50 mM), Tris-HCl (100 mM a pH 8.0), SDS (1.3 %), β -mercaptoetanol (0.2 %).

Buffer de dilución: Tris-HCl (50 mM a pH 8.0), EDTA (10 mM)

Buffer TE: Tris-HCl (100 mM a pH 8.0), EDTA (1 mM)

Acetato de Sodio, 3M, pH 8.0

Acetato de potasio a 5 M

Isopropanol al 99.5 %

Etanol al 70% en agua

Maceración y homogenización del tejido

Se adaptó un método de maceración del tejido que también prescindiera del mortero, utilizando una espiga de acero inoxidable ranurada, de tamaño y forma adaptada a tubos eppendorf de 1.5 ml. Este dispositivo se hizo rotar dentro del tubo eppendorf en ambas direcciones al acoplarlo a un destornillador de giro lento (Figura 10). La maceración del tejido se hizo enfriando los tubos y el tejido en NL y luego se agregó el buffer de extracción, o en presencia del amortiguador de extracción cuando se prescindió del NL. Esto para permitir que el SDS del amortiguador pudiera inactivar las nucleasas del extracto. Después de cada extracción, la espiga metálica se lavó cuidadosamente y se colocó por unos minutos en una solución de NaOH 0.1 N, para luego enjuagar con agua destilada estéril, antes de volverlo a usar.

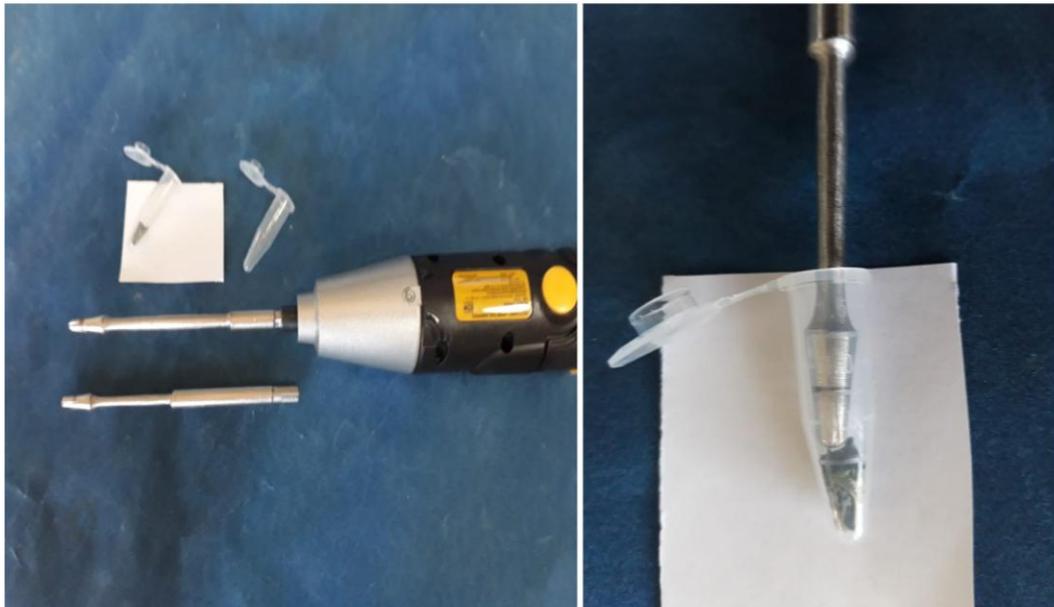


Figura 10. Equipo alternativo para maceración de tejido vegetal. La flecha se encuentra hecha a medida para encajar dentro del tubo eppendorf que al conectarse a un atornillador eléctrico, permite llevar a cabo la trituración del material vegetativo más rápidamente y con menor pérdida de tejido que se suele desechar con los comúnmente utilizados mortero y pistilo.

A. Con NL y sin ARNasa

Se tomaron 100-150 mg de tejido vegetal, macerándolo en tubos eppendorf, con 350 μ L de buffer de extracción de ADN genómico, después calentando las muestras a 65°C por 10 minutos, mezclando por inversión ocasionalmente. Posteriormente, se añadieron 100 μ L de acetato de potasio a 5 M, mezclando por inversión e incubando a 4°C por 15 minutos. Después, se centrifugaron las muestras a 14K por 20 minutos, transfiriendo 350 μ L de sobrenadante a un tubo nuevo, así como 350 μ L de isopropanol incubando a -20°C por 20 minutos. Posteriormente, se centrifugó por 5 minutos a 14K, lavando pellet resultante con 200 μ L de etanol al 70 %, para después secarlo y resuspenderlo en 50 μ L de buffer TE. En este y los demás casos, el extracto obtenido se conservó a 4 °C y se empleó para la PCR en el lapso de unos 7 días, después de lo cual se guardó de manera permanente a -20 °C.

B. Sin NL y con ARNasa

Se usaron 100-150 mg de tejido vegetal, macerándolo en tubos eppendorf, con 350 μ L de buffer de extracción de ADN genómico. Posteriormente se sometieron las muestras a 65°C por 10 minutos, mezclando por inversión ocasionalmente. Transcurriendo ese tiempo, se agregaron 100 μ L de acetato de potasio a 5 M, mezclando por inversión y enfriando a 4°C por 15 minutos, para después centrifugar a 14K (15 000 G) en centrífuga eppendorf por 20 minutos. Se transfirió la cantidad de 350 μ L del sobrenadante a los tubos, agregado la cantidad directamente proporcional de isopropanol, sometiéndolos a -20°C por 20 minutos, para posteriormente centrifugar 5 minutos a 14K, decantando y secando la pastilla obtenida, para resuspenderla en 200 μ L de buffer de dilución de ADN. Se añadió ARNasa al 1%, y se incubó una hora a 37 °C. Pasado este tiempo, se agregaron 20 μ L de acetato de sodio 3 M y 200 μ L de isopropanol, incubando a -20°C por 20 minutos. Se centrifugó a 14K por cinco minutos, decantando y lavando la pastilla con etanol al 70%; después de secarla, se resuspendió en 50 μ L de buffer TE.

C. Extracción de ADN con eliminación de ARN con cloruro de litio

Se pesaron 100-150 mg de tejido vegetal, macerándolo en tubos eppendorf, con 350 μL de buffer de extracción de ADN genómico y se calentaron las muestras a 65°C por 10 minutos, mezclando por inversión ocasionalmente. Se les añadió 100 μL de acetato de potasio a 5 M, mezclando por inversión y enfriando a 4°C por 15 minutos, se centrifugó a 14K por 20 minutos. Se transfirieron 350 μL el sobrenadante a un tubo nuevo, agregando 350 μL de isopropanol y se enfrió a -20°C por 20 minutos. Se centrifugó por 5 minutos a 14K, decantando y secando la pastilla para resuspenderla en 200 μL de buffer de dilución de ADN. Luego se añadieron 200 μL de cloruro de litio a 6 M, incubando a 4°C por 10 minutos. Después, se centrifugó a 14K por cinco minutos, recuperando el sobrenadante que se transfirió a un segundo tubo. Se agregaron 20 μL de acetato de sodio 3 M y 400 μL de isopropanol. Se centrifugó a 14K por cinco minutos, decantando y lavando la pastilla con 200 μL de etanol al 70% y secándola para luego resuspenderla en 50 μL de buffer TE.

D. Con NL y con ARNasa

Este protocolo con NL es el utilizado más frecuentemente en el laboratorio. Es una modificación del protocolo de Dellaporta et al. (1983), con la excepción que el amortiguador de extracción tiene SDS al 1.3% en lugar de CTAB. Se ejecutó como se describe en el protocolo B, pero en presencia de NL.

E. Con NL y sin ARNasa

Protocolo igual que A, pero en presencia de NL.

Medición de la concentración y calidad y pureza de ADN aislado

Para medir la concentración de ADN, se tomaron lecturas en un micro-espectrofotómetro Nano-200 ® (HANGZHOU ALLSHENG INSTRUMENTS CO.,LTD™, Hangzhou, China), donde a partir de muestras de 2 μL del extracto, se registró el contenido de ADN en $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$, además de las relaciones de Absorbancia de 260/280 y 260/230.

La verificación de la calidad del ADN se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de Agarosa al 1 %, depositando 15 μL (1.5 μg) de ADN a concentración de 100 $\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$ y 3 μL de amortiguador de carga (azul de bromoferol) . La electroforesis se llevó a cabo en un periodo de una hora a 105 V, tiñendo posteriormente el gel con bromuro de etidio, fotodocumentando con el equipo Vilber Lourmant Documentation System ®, modelo DP-001.FDC, en transiluminador (High Performance Ultraviolet Transilluminator UVP®, Modelo TFS-20V, Capitol Scientific™, Upland, C.A., USA).

Finalmente, para verificar la pureza del ADN extraído en pruebas moleculares, se amplificó el gen *NPTII*, el cual produce secuencias de 780 pb. Los iniciadores utilizados fueron el *NPTII-5'*: 5'-AGA TGG ATT GCA CGC AGG TTC-3' y el *NPTII-3'*: 3'-GAA GAA CTC GTC AAG AGG GCG-5', que se amplificaron bajo un ciclo de precalentamiento de 95°C por cinco minutos, seguido por 40 ciclos con el programa: 95°C, 60 segundos; 56°C, 30 segundos; 72 °C, 60 segundos y finalmente un ciclo de elongación final a 72°C por cinco minutos en el Termociclador de gradiente Axygen ® MaxyGene™, modelo Therm-1001.

Una vez que la reacción terminó, se sometieron las muestras procesadas a electroforesis por aproximadamente una hora a 105 V, en gel de agarosa al 1%, esta vez, depositando 10 μL de ADN procedentes de la reacción y 2 μL de amortiguador de carga (azul de bromofenol). Para el análisis estadístico se procedió a utilizar un Diseño de Bloques al Azar, donde cada metodología de extracción fue manejada como tratamiento y cada una de las plantas GUSTIII consistió en bloques. Se llevó a cabo el análisis de varianza para cada medida, empleado el Sistema de Análisis Estadístico (SAS), Versión 9.0, con una prueba de comparación de medias de Tukey con un nivel de significancia de 5%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el caso del jitomate, un problema para la extracción de ADN genómico resulta ser contenido de compuestos taninos y compuestos fenólicos que se liberan durante la destrucción y rompimiento de membranas celulares (Loomis, 1974), sustancias que al entrar en unión química con el ADN se unen covalentemente (Guillemaut y Maréshall-Drouard, 1992; Katterman y Shattuck, 1983; Peterson *et al.*, 1997), en muchos casos, reduciendo el rendimiento final, así como inutilizándolo para estudios básicos de biología Molecular, tales como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Con la congelación de los tejidos en esta especie mediante nitrógeno líquido este problema es evitado al mantener estos compuestos contaminantes inactivados químicamente y evitando así su contacto con el material genético (Peterson *et al.*, 1997). Así se esperaría obtener bajos rendimientos de ADN en un proceso de extracción sin uso de Nitrógeno líquido.

No obstante, se ha reportado la extracción de ADN útil y con buenos rendimientos sin la necesidad de emplear nitrógeno líquido, en plantas con altos contenidos de metabolitos secundarios como en el caso de plantas de forraje del género *Stylosanthes* (Chandra y Tewari 2007), condimentos como *Artemisia Annuua* (Agrawal *et al.*, 2017), cereales como *Oryza sativa* (Shamim *et al.*, 2016), inclusive en plantas halófilas provenientes de manglares (Sharma *et al.*, 2010).

Por la información arrojada por el cuadro 3, se asume que de manera general, se obtuvo un buen rendimiento de ADN, donde no se encontraron diferencias significativas en la concentración final obtenida por todos los protocolos, tal como lo reporta Sharma *et al.* (2010) en extracción de ADN sin nitrógeno líquido con plantas medicinales utilizando también el protocolo de Dellaporta *et al.* (1983) utilizando CTAB en vez de SDS tal como se realizó en el presente trabajo. Esto señalaría que es posible usar cualquier metodología para extraer ADN en jitomate. Siendo que los tratamientos A, B y E se obtuvieron aparentemente mayores concentraciones medias de ADN.

Pero hay que considerar que en estos tratamientos no se contempló el uso de ARNasa, por lo cual al llevar a cabo las mediciones con el espectrofotómetro se midió la concentración combinada de ADN y del ARN, obteniéndose datos considerablemente elevados. En el caso del tratamiento D, este presentó la concentración de ADN más baja de todos, explicándose esto por su misma naturaleza donde al usar nitrógeno líquido y ARNasas, se esperaba que fuesen eliminadas mayor cantidad de impurezas respecto a los demás tratamientos, reflejándose este comportamiento en la medición con el espectrofotómetro.

Cuadro 3. Comparación de los protocolos de extracción de ADN en plantas T₁ de jitomate (*Solanum Lycopersicum* L.)

PROTOCOLO	Absorbancia		Concentración (ng/uL)
	280/260	260/230	
A (-NL, sin ARNasa)	1.77 A	1.23 B	1407.5 A
B (-NL, con LiCl)	1.85 A	2.03 A	953.3 A
C (-NL, con ARNasa)	1.85 A	2.00 A	889.2 A
D (+NL, con ARNasa)	1.84 A	1.79 AB	735.5 A
E (+NL, sin ARNasa)	1.58 A	1.42 AB	1216.0 A

Medias con letras iguales en las columnas no son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$),

Por otro lado, en lo que respecta a la calidad de ADN, este debe estar en los rangos 1.8 a 2.0 y 2.0 a 2.2 para las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230 respectivamente (Betancurt-Olvera, *et al*, 2018).

De acuerdo a Sambrock *et al.* (1989) describen que valores menores a 1.8 en la relación A 260/280 indican presencia de proteínas y fenoles residuales, mientras que menores a 2.0 en la relación 260/230, indican la contaminación por compuestos orgánicos (azúcares) así como diversos reactivos empleados en el proceso de purificación como Guanidina residual (a menudo utilizada en kits basados en columnas) (Wilfinger *et al.*, 1997). En los protocolos sin uso de nitrógeno líquido que hacen uso del cloruro de litio (B) y ARNasa (C), al tener relaciones 260/230 con valores mayores a 2.0 se asume que se encuentran con pocos contaminantes.

Por su parte el tratamiento A contiene las relaciones 260/230 más bajas, indicando la posible presencia de compuestos aromáticos, carbohidratos e inclusive proteínas, como describe Del Valle *et al.* (2004).

Vale la pena describir que cloruro de litio es un reactivo que asocia directamente con el ARN al ser un catión que se asocia con los grupos fosfato de este ácido nucleico, al ser este una cadena estructuralmente abierta a diferencia del ADN, lo cual permite capturarlo y sedimentarlo (Michel-López *et al.*, 2018; Walker y Lorsh, 2013) y por lo tanto es empleado específicamente en el aislamiento de ARN (Barlow *et al.*, 1963; Kister y Matamoros; 2005; Viennois *et al.*, 2018). En el presente trabajo, se aprovecho esta cualidad para poder separarlo del ADN mediante centrifugación. Así que el cloruro de litio parece ser sustituto económico y casi con la misma fiabilidad que la ARNasa, como parte de un protocolo de aislamiento de ADN (Ahmad *et al.*, 2004; Barnwell *et al.*, 1998; Varma *et al.*, 2007).

Se esperaba que por los resultados obtenidos en la mayor parte de los protocolos se encontrarían problemas con la visualización del material genético y amplificación del mismo en la etapa de análisis molecular por la supuesta presencia de contaminantes de acuerdo a Varma *et al.*, (2007). Sin embargo se encontró que en el gel de agarosa, el material genético obtenido se mostró integro (no degradado) y en cantidades similares para los cinco métodos, encontrándose esto reflejado en el gel de agarosa, al apreciarse bandas de alrededor de 20 kb, que es lo esperado cuando el ADN genómico no ha sufrido degradación, siendo una clara muestra de la presencia de ADN genómico tal como se muestra en la Figura 11, inclusive en las muestra sometidas bajo el tratamiento sin eliminación de ARN. Además, al llevar a cabo la amplificación del gen *NPTII* en el ADN con la técnica PCR de las muestras, se obtuvieron bandas de aproximadamente 780 pb en algunas plantas, este hecho implicando la amplificación esperada gen para los protocolos ejecutados en el presente trabajo, como se nota en la Figura 12.

Esto indica claramente que el ADN de las muestras no contiene contaminantes que pudieran interferir en la reacción de amplificación, resultado también encontrado por Sharma *et al.* (2010) quien aisló ADN de diversas plantas medicinales, prescindiendo del Nitrógeno líquido pero mediante la metodología CTAB, siendo el material genético apto para análisis con marcadores RAPDS.

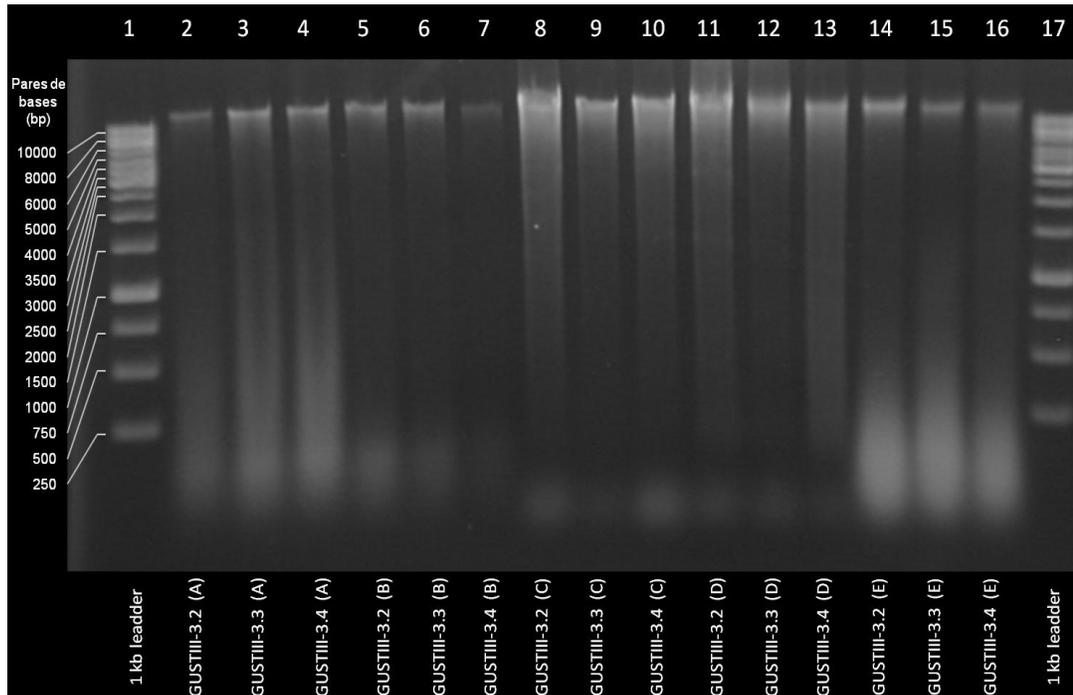


Figura 11. Gel de agarosa con muestras de ADN extraído (1.5 µg) de las plantas de jitomate. Los tratamientos se señalan mediante las letras: (A), -NL - ARNasa; (B) -NL+ LiCl, (C) -NL+ARNasa; (D) +NL+ ARNasa; (E) +NL- ARNasa. Carriles 1 y 17, escalera 1 kb Plus Fermentas®

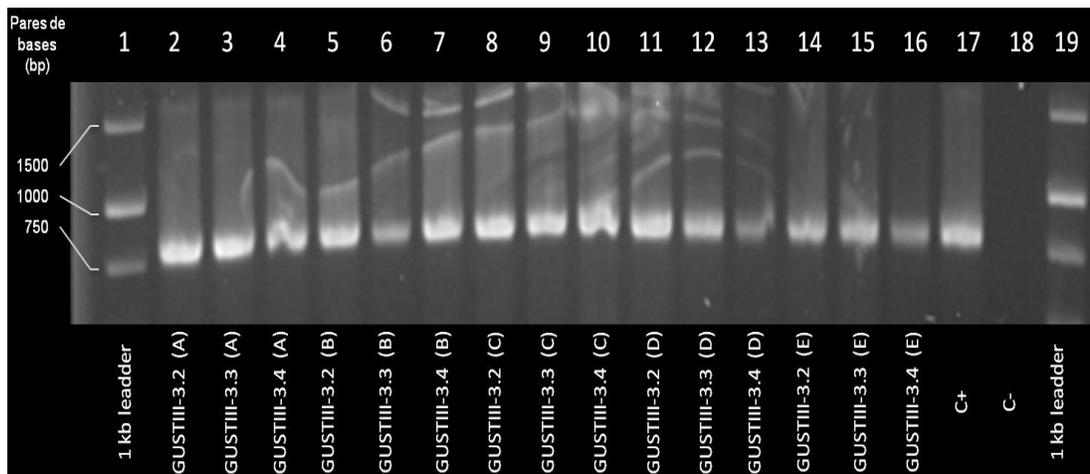


Figura 12. Amplificación del gen *NPTII* en las muestras de ADN de Jitomate. Los tratamientos se señalan mediante las letras: (A) -NL-ARNasa; (B) -NL + LiCl, (C) -NL + ARNasa; (D) +NL + ARNasa; (E) +NL - ARNasa.. El carril 17 corresponde a un control positivo, conteniendo ADN del vector pBIN35SBif, con el gen *NPTII*; mientras que el carril 18, pertenece a un control negativo sin ADN. Carriles 1 y 19, escalera 100 pb Fermentas®

Si se busca hacer un análisis rápido y sobre todo económico de ADN de plantas, es posible y funcional emplear ADN extraído sin eliminar ARN en jitomate, aunque si se busca hacer otro tipo de análisis más complejos, tales como en caracterización empleando marcadores moleculares (RADPs, AFLPs, SNPs, dCAPs, etcétera) es recomendable eliminar ARN con el uso de reactivos alternativos a ARNasa, tal como el cloruro de litio, el cual ofrece resultados similares y sobretodo más económicos respecto a la enzima antes mencionada. Esto último es con fines técnicos, para evitar que el ARN al interfiera con la visión de bandas de bajos pesos moleculares en el gel de agarosa al momento de la tinción.

Independientemente de la metodología empleada, se obtiene ADN genómico útil para realizar pruebas moleculares, en este caso la detección de un gen foráneo, al ofrecer resultados similares y sobretodo fiables.

CONCLUSIÓN

Es posible obtener ADN genómico de jitomate en cantidad y calidad suficientes para ser empleados en reacciones de PCR, sin el uso de NL.

LITERATURA CITADA

- Agrawal, A., Sharma, A., & Shukla, N. P. (2017). Genomic DNA Extraction Protocol for *Artemisia Annu* L. Without Using Liquid Nitrogen and Phenol. *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology*, 4(4), 448. <https://doi.org/10.3126/ijasbt.v4i4.15788>
- Ahmad, S., Ganaie, M. M., Qazi, P. H., & Verma, V. (2004). Rapid DNA isolation protocol for angiospermic plants. *Plant Physiology*, 30, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2008.07.001>
- Barlow, J. J., Mathias, A. P., & Williamson, R. (1963). A SIMPLE METHOD FOR THE QUANTITATIVE ISOLATION OF UNDEGRADED HIGH MOLECULAR WEIGHT RIBONUCLEIC ACID. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 13(1), 61–66. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(63\)90163-3](https://doi.org/10.1016/0006-291X(63)90163-3)
- Barnwell, P., Blanchart, A. N., & Smirnoff, N. (1998). Isolation of DNA from the highly mucilagenous succulent plant *Sedum telephium*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 16(2), 133.138. <https://doi.org/10.1023/A:1007473302551>
- Betancurt-Olvera, M., Perez-Lainez, M. D., Nieto-Angel, R., Barrientos-Priego, A. F., García-Mateos, M. D. R., & Corona-Torres, T. (2018). COMPARACIÓN DE SEIS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN EN TEJOCOTE (*Crataegus mexicana* Moc. & Sessé). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 41(1), 75–79. Recuperado de <https://www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/41-1/9a.pdf>
- Buckingham, L., & Flaws, M. L. (2007). Isolation of DNA. In F. A. Davis (Ed.), *Molecular Diagnostics: Fundamentals, Methods, & Clinical Applications* (pp. 69–76). Philadelphia.
- Chandra, A., & Tewari, S. (2007). Isolation of Genomic DNA from Stylo Species without Liquid Nitrogen Suitable for RAPD and STS Analyses. *Cytologia*, 72(3). Recuperado de https://www.istage.ist.go.jp/article/cytologia/72/3/72_3_287/pdf
- Dellaporta, S. L., Wood, J., & Hicks, J. B. (1983). A plant DNA miniprep. Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1, 19–21. <https://doi.org/10.1007/BF02712670>
- Del Valle, C., Rodríguez, A., & Espinoza, M. (2004). Comparación de tres métodos de extracción de ADN a partir de restos óseos. *Revista Biología Tropical*, 52(3), 717–725. Recuperado de: <https://pdfs.semanticscholar.org/92a9/2d1d4c8c2e2ca8a23ad2aafc4dcccdf98a0de.pdf>

- Golberg, S. (2008). Mechanical/physical methods of cell distribution and tissue homogenization. *Methods in Molecular Biology*, 1(424), 3–22. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2550-6_1
- Guillemaut, P., & Maréshall-Drouard. (1992). Isolation of plant DNA: A fast, inexpensive, and reliable method. *Plant Molecular Biology Reporter*, 10, 60–65. <https://doi.org/10.1007/BF02669265>
- Katterman, F. R. H., & Shattuck, V. I. (1983). An effective method of DNA isolation from the mature leaves of *Gossypium* species that contain large amounts of phenolic terpenoids and tannins. *Preparative Biochemistry*, 13(4), 347–359. <https://doi.org/10.1080/00327488308068177>
- Kister, C., & Matamoros, M. (2005). RNA Isolation using phase extraction and LiCl precipitation. In *Lotus Japonicus Handbook* . (pp. 123–124). https://doi.org/10.1007/1-4020-3735-X_9
- Loomis, W. D. (1974). Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. *Methods in Enzymology*, 31, 528–544. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(74\)31057-9](https://doi.org/10.1016/0076-6879(74)31057-9)
- Michel-López, C. Y., González-Mendoza, D., Zapata-Pérez, O., Rubio-Piña, J., Cervantes-Díaz, L., & Bermúdez-Guzmán, M. D. J. (2018). Evaluación de tres protocolos para la extracción rápida de ARN total de tejidos de *Prosopis juliflora* (SW). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9(6), 1259–1267. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i6.788>
- Peterson, D. G., Boehm, K. S., & Stack, S. M. (1997). Isolation of Milligram Quantities of Nuclear DNA from Tomato. *Plant Molecular Biology Reporter*, 15(2), 148–153. <https://doi.org/10.1007/BF02812265>
- Romero-Escobedo, S. (2017). *TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE TOMATE (Solanum lycopersicum L.) CON GENES DE BIOSÍNTESIS DE TREHALOSA*. Universidad Autónoma Chapingo.
- Sambrook, J., Fritshc, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (2nd ed.). CSH, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Recuperado de <https://www.cshlpress.com/pdf/sample/2013/MC4/MC4FM.pdf>
- Shamim, M. Z., Manzar, H., & Sharma, V. K. (2016). A RAPID METHOD FOR RICE GENOMIC DNA EXTRACTION WITHOUT LIQUID NITROGEN AND PHENOL. *International Journal of Agriculture Sciences*, 8(52), 2528–2530. Recuperado de https://bioinfopublication.org/files/articles/8_52_40_IJAS.pdf

- Sharma, R., Mahla, H. R., Bhargava, S. C., & Sharma, M. M. (2003). Isolating Plant Genomic DNA Without Liquid Nitrogen. *International Society for Plant Molecular Biology*, 21(March), 43–50. <https://doi.org/10.1007/BF02773395>
- Sharma, P., Joshi, N., & Sharma, A. (2010). Isolation of genomic DNA from medicinal plants without liquid nitrogen. *Indian Journal of Experimental Biology*, 48(June), 610–614. Recuperado de <http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/9078/1/IJEB%2048%286%29%20610-614.pdf>
- Vancanney, G., Schmidt, R., O'Connor-Sanchez, A., Willmitzer, L., Rocha, & Sosa, M. (1990). Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in Agrobacterium-mediated plant transformation. *Molecular and General Genetics MGG*, 220(2), 245–250. <https://doi.org/10.1007/BF00260489>
- Varma, A., Padh, H., & Shrivastava, N. (2007). Plant genomic DNA isolation: An art or a science. *Biotechnology Journal*. <https://doi.org/10.1002/biot.200600195>
- Viennois, E., Tahsin, A., & Merlin, D. (2018). Purification of Total RNA from DSS-treated Murine Tissue via Lithium Chloride Precipitation. *Bio Protocol*, 8(9). <https://doi.org/doi:10.21769/BioProtoc.2829>
- Walker, S. E., & Lorsch, J. (2013). *RNA purification - Precipitation methods. Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 530). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420037-1.00019-1>
- Wilfinger, W. W., Mackey, K., & Chomczynski, P. (1997). Effect of pH and Ionic Strength on the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity. *BioTechniques*, 22, 474–481. <https://doi.org/10.2144/97223st01>

Apéndice 2. Cultivo de las plantas de jitomate durante el ciclo 2017-2018

Se emplearon semillas provenientes de la línea experimental denominada L3 generadas del Programa de Mejoramiento Genético de Tomate para Invernadero de la Universidad Autónoma Chapingo. Consiste en una línea homocogótica de alto rendimiento, de crecimiento indeterminado y que producen frutos tipo saladette: **Origen de plántulas:** Las semillas fueron germinadas en charola de Polipropileno de 200 cavidades, usando como sustrato turba estéril y tratadas en una solución con fungicida (Captan® 1 gL⁻¹). Posteriormente las plántulas se dejaron crecer por un periodo de tres semanas previo al establecimiento en el invernadero; **Trasplante:** posteriormente las plántulas fueron establecidas en macetas con tezontle, tratado con sales cuaternarias para prevenir infestaciones posteriores; Riegos: Los riegos se realizaron con solución nutritiva Cadahía al 100 % (Cadahía, 1995), Durante todo el ciclo de cultivo se realizaron cuatro riegos por día de 4 minutos cada uno. El proceso de cultivo de la presente especie, se ilustran en las Figuras 14 y 15.



Figura 14. Cultivo de jitomate en el ciclo 2017-2018. Plantas transgénicas T₀ (A –C, ciclo 2017) y T₁ (D –F, ciclo 2018) de la línea L3 de jitomate



Figura 15. Ciclo de cultivo de jitomate 2018. A) establecimiento de la plántula en el invernadero; B) inicio de crecimiento vegetativo a dos semanas después del trasplante; C) máximo desarrollo vegetativo e inicio de floración; D) floración; E) fructificación.

Apéndice 3. Análisis de la segregación de las plantas transformadas

Cuadro 4. Prueba de Ji cuadrada en líneas de plantas confirmadas con amplificación en la PCR.

Línea analizada	Gen a detectar	Fenotipo	Observadas	Esperadas	(Obs-Esp)	(Obs-Esp) ²	$\frac{(Obs-Esp)^2}{Esp}$	χ^2 Calculada
NPTIIRD-6	NPTII	NPTII+	1	6.66	-5.66	32.0356	4.810	+14.43
		NPTII -	9	3.33	5.66	32.0356	9.620	
BAR35S-3	BAR	BAR+	3	6.66	-3.66	13.395	2.461	+8.483
		BAR-	7	3.33	3.66	13.395	4.022	
BAR35S-9	BAR	BAR+	3	6.66	-3.66	13.395	2.461	+8.483
		BAR-	7	3.33	3.66	13.395	4.022	

Test de Bondad de Ajuste de Chi-cuadrado a 1 grado libertad, $\chi^2=3.841$ y $p=0.05$. Si el valor χ^2 es mayor al correspondiente al de probabilidad del 5%, se rechaza la hipótesis. Si el valor calculado es mayor al encontrado en la tabla correspondiente, no se acepta la hipótesis de que los datos se ajustan a una distribución 3:1. *No cumple la segregación mendeliana 3:1 ($p \leq 0.05$).

Apéndice 4. Protocolo de aislamiento de ADN vegetal propuesto por Dellaporta et al (1983) modificado.

1. Tomar 100-150 mg de tejido vegetal y moler el tejido con nitrógeno líquido en tubo eppendorf o en un mortero pre-enfriado.
2. Adicionar 750 µl del buffer de extracción, mezclar suavemente y calentar a 65 °C por 10 minutos invirtiendo los tubos ocasionalmente.
3. Añadir 200 µl de una solución 5 M de acetato de potasio, mezclar por inversión y mantener los tubos en hielo por 30 minutos
4. Centrifugar a 15 000 G a por 20 minutos en centrífuga eppendorf.
5. Transferir el sobrenadante (450 µl por tubo) a dos tubos eppendorf nuevos con 500 µl de isopropanol (del congelador) cada uno. Enfriar por 30 minutos a – 20°C.
6. Centrifugar por 5 minutos a 15 000 G en centrífuga eppendorf y resuspender el pellet en 200 µl de solución de dilución del ADN.
7. Añadir 2 µl de una solución de ARNasa e incubar por una hora a 37 °C.
8. Añadir 20 µl de acetato de sodio 3M y 200 µl de isopropanol frío (del congelador) e incubar a –20 °C por 30 a 120 minutos.
9. Centrifugar a 15 000 G por cinco minutos y eliminar el sobrenadante.
10. Decantar el sobrenadante y lavar la pastilla con etanol al 70%, dos veces.
11. Secar la pastilla y resuspenderla en 50 µL de buffer TE.
12. Determinar la concentración en un espectrofotómetro Nanodrop® y almacenar el extracto 4 °C si se va a utilizar pronto, o a -20 °C y se va a utilizar en semanas o meses.

Apéndice 5. Análisis de varianza en los métodos de extracción de ADN

Cuadro 5. Cuadrados medios del análisis de varianza para las relaciones de absorbancia 260/280, 260/230 y concentración de ADN

FV	GL	CM		
		A 260/280	A 260/230	Concentración (ng/uL)
BLOQUES	4	0.097376	0.159904	161126.288
TRATAMIENTO	4	0.125086	0.614224 *	626155.043
BLOQUE x	8	0.889848	0.387064	393640.665
TRATAMIENTO				
ERROR	16	0942096	0.095376	402834.031
TOTAL	24			
CV		14.30	18.96	64.21
MEDIA		1.6968	1.6284	988.4442

**P≤0.01, CV: coeficiente de variación.

Apéndice 6. Segregación de genes en plantas transgénicas

a) T₀ NPTII-TPS1TPS2/+ x NPTII-TPS1TPS2/+

		NPTII-TPS1TPS2	+
T ₁	NPTII-TPS1TPS2	NPTII-TPS1TPS2 NPTII-TPS1TPS2	+ NPTII-TPS1TPS2
	+	NPTII-TPS1TPS2+	++

b) T₀ NPTII/+ TPS1TPS2/+ x NPTII/+ TPS1TPS2/+

		NPTII TPS1TPS2	NPTII +	+ TPSTPS2	++
T ₁	NPTII TPS1TPS2	NPTII TPS1TPS2 NPTII TPS1TPS2	NPTII + NPTII TPS1TPS2	+ TPSTPS2 NPTII TPS1TPS2	++ NPTII TPS1TPS2
	NPTII +	NPTII TPS1TPS2 NPTII +	NPTII + NPTII +	+ TPSTPS2 NPTII +	++ NPTII +
	+ TPS1TPS2	NPTII TPS1TPS2 + TPSTPS2	NPTII + + TPSTPS2	+ TPSTPS2 + TPS1TPS2	++ TPS1TPS2
	++	NPTII TPS1TPS2 ++	NPTII + ++	+ TPSTPS2 ++	++ ++

Figura 16. Mecanismo de herencia de genes en plantas transgénicas: a) segregación de una inserción; b) segregación de dos inserciones independientes. Nótese la similitud con los mecanismos de herencia mendeliana con genes independiente y la variabilidad obtenida de genotipos con los genes de interés.