



UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS
VERITATE SOLA NOBIS IMPONETUR VIRILIS TOGA. 1948

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LAS PLANTAS



Tesis en opción al título de Master en Biotecnología Vegetal

**ESCISIÓN DE GENES MARCADORES DE SELECCIÓN MEDIANTE
EL PROMOTOR *REG-2* INDUCIBLE DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS
SOMÁTICA EN BANANO CV. 'GRANDE NAINÉ' (*MUSA AAA*)**

Autor: Lic. Adolfo Ramos Marzan

**Tutores: Dr.C. Borys Chong Pérez
Dr.C. Rafael Gómez Kosky**

Santa Clara, 2012

RESUMEN

Un paso importante en la obtención de plantas transgénicas, es eliminar los genes marcadores de selección, ya que son causa de problemas tecnológicos y de rechazo por la opinión pública internacional. En banano se desarrolló un método para escindir estos genes mediante el sistema de recombinación Cre//lox guiado por promotores inducibles por golpe de calor. Sin embargo el golpe de calor trae consigo desventajas durante la obtención de las plantas transgénicas. Este trabajo tuvo como objetivo obtener plantas transgénicas de banano cultivar Grande naine (*Musa AAA*) libres de genes marcadores de selección mediante el sistema de recombinación Cre//lox guiado por el promotor *REG-2*, inducible en el desarrollo de embriones somáticos. Se evaluó la actividad del gen *uidA* guiado por el promotor *REG-2* en diferentes momentos del proceso de obtención de plantas transgénicas. Se observó que el promotor solo se activó en embriones somáticos formados y maduros. Este promotor se clonó en el vector pGW-A para crear el vector de auto-escisión pREG2-A y transformar las suspensiones celulares embriogénicas de banano. Se comparó la eficiencia de transformación en medio selectivo con higromicina o geneticina, y se observó que no ocurrió la escisión prematura de los genes marcadores de selección, la relación de eficiencias en ambos antibióticos fue 1,03. Las plantas regeneradas fueron analizadas mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa, hibridación por Southern y secuenciación para verificar la escisión de dichos genes y de la recombinasa *Cre*. Estos análisis mostraron la escisión del gen *hpt* con una eficiencia de 77.8 %.

ÍNDICE

	Pág.
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Origen del género <i>Musa</i>	5
2.2 Taxonomía.....	5
2.3 Cultivar Grande naine.....	6
2.4 Importancia.....	8
2.5 Mejoramiento Genético.....	8
2.5.1 Mejoramiento Genético Convencional.....	8
2.5.2 Mejoramiento Genético por Mutaciones.....	9
2.5.3 Mejoramiento genético por Biotecnología.....	10
2.6 Cultivo de tejidos en plátanos y bananos.....	11
2.7 Transformación genética.....	12
2.8 Genes Marcadores de Selección.....	14
2.8.1 Generalidades.....	14
2.8.2 Percepción pública de los Organismos Genéticamente Modificados.....	15
2.8.3 Estrategias para obtener plantas transgénicas libres de genes marcadores de selección.....	17
3 MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1 Caracterización de la actividad del promotor <i>REG-2</i>	25
3.2 Determinación de la escisión prematura de los genes marcadores de selección durante el proceso de selección.....	29
3.3 Análisis moleculares.....	30
3.3.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa	30
3.3.2 Análisis de hibridación por Southern	31
3.3.3 Análisis de la secuencia obtenida después de la recombinación.....	32
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
4.1 Caracterización de la actividad del promotor <i>REG2</i>	33
4.2 Determinación de la escisión prematura de los genes marcadores de selección durante el proceso de transformación.....	35
4.3 Análisis moleculares.....	36
4.3.1 Análisis de PCR.....	36

4.3.2	Análisis de hibridación por Southern.....	38
4.3.3	Análisis de la secuencia obtenida después de la recombinación.....	40
	CONCLUSIONES.....	49
	RECOMENDACIONES.....	50
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

1. INTRODUCCIÓN

Los plátanos y bananos (*Musa* spp.) son cultivos perennes, pueden cosecharse durante todo el año y se encuentran entre los principales cultivos en los países tropicales y subtropicales de alta presión demográfica. Son el alimento básico de cerca de 500 millones de personas de todo el mundo (Zambrano *et al.*, 2007).

En el año 2010 la producción mundial de plátanos superó los 36 millones de toneladas, mientras que en bananos más de 102 millones de toneladas (FAOSTAT, 2012). Entre los principales países productores se encuentra la India, Ecuador, Brasil y China, y en menor escala otros países tropicales de América, Asia y África (FHIA, 2007).

Estos cultivos están expuestos a enfermedades, plagas, sequía, salinidad y al agotamiento de los nutrientes del suelo (Mobambo, 2002). Las enfermedades han afectado seriamente la industria dedicada a la producción y la exportación de bananos. Entre ellas se encuentran el Mal de Panamá causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Jain, 2002; Marín *et al.*, 2003) y las manchas foliares de la hoja causadas por varias especies de *Mycosphaerella* (Mourichon y Fullerton, 1990; Carlier *et al.*, 2000).

Los esfuerzos en el mejoramiento de *Musa* sp. para la resistencia a enfermedades con el empleo de métodos tradicionales presentan numerosos problemas, tales como: partenocarpia, esterilidad, poliploidía y largos ciclos de selección (Sweenen *et al.*, 2003). Estos problemas han conllevado al uso de alternativas para desarrollar nuevas variedades resistentes a estrés biótico y abiótico. Los métodos biotecnológicos, y en específico la ingeniería genética, aparecen como una vía para superar estas limitaciones. En efecto, utilizando estas herramientas se pueden introducir cambios genéticos específicos en un corto período de tiempo (Sagi *et al.*, 1994).

Para la transformación genética de bananos se han utilizado principalmente el bombardeo de partículas (Becker *et al.*, 2000; Matsumoto *et al.*, 2005; Vishnevetsky *et al.*, 2011) y la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Ganapathi *et al.*, 2001; Khana *et*

et al., 2004; Remy *et al.*, 2005; Pérez-Hernández *et al.*, 2006; Ghosh *et al.*, 2009; Chong-Pérez *et al.*, 2012b).

El establecimiento de un sistema de transformación genética requiere que la secuencia que se introduce tenga genes marcadores que permitan seleccionar los tejidos transformados. Dentro de estos, los más utilizados en banano son *nptII* y *hpt* que confieren resistencia a los antibióticos kanamicina e higromicina respectivamente y el *gen bar* o *pat* a los herbicidas que tienen como ingrediente activo la Fosfinotricina (Reyes *et al.*, 2010).

Una vez que se ha realizado la selección de los eventos de transformación, generalmente los genes marcadores de selección no son necesarios. Por el contrario, su continua presencia puede crear preocupaciones en la percepción pública y además problemas tecnológicos (Natarajan y Turna, 2007). Entre los problemas tecnológicos se encuentran, la influencia de las secuencias regulatorias (promotores y terminadores) de estos genes en la actividad de otros transgenes o genes propios de la planta. También podrían causar efectos pleiotrópicos, donde la actividad de las enzimas pueden influir sobre la actividad de otras enzimas (Abden y Miki, 2009; Miki *et al.*, 2009). Además para sistemas de transformación donde no se cuenta con otros marcadores de selección, la presencia de estos evitan la re-transformación (Chong-Pérez *et al.*, 2012a).

En banano cv. 'Grande naine' (*Musa* AAA) se ha logrado escindir genes marcadores de selección con el uso del sistema de recombinación Cre/lox guiado por promotores inducibles por golpe térmico (Chong-Pérez *et al.*, 2012a). Sin embargo, el uso del golpe térmico trae consigo un paso más en el proceso tecnológico de obtención de plantas transgénicas y además las células podrían ser afectadas por el golpe térmico.

En otras especies se han utilizado promotores inducibles en procesos fisiológicos de la planta para inducir la actividad de la recombinasa del sistema de recombinación Cre/lox. Como ejemplo podemos citar el uso de promotores inducibles en la formación de gametos en *Arabidopsis thaliana* (Verweire *et al.*, 2007); el uso del promotor del gen *cruC* de *Arabidopsis*

thaliana para escindir el gen marcador de selección en semillas de tabaco (Moravčíková *et al.*, 2008); y el uso del promotor del gen *app1* para escindir el marcador de selección durante la embriogénesis somática en soya (*Glycine max* L.) (Li *et al.*, 2007).

En arroz (*Oriza sativa* L.), el gen *REG-2* codifica la proteína 7S-globulina (Sun *et al.*, 1996) y su expresión es muy específica en embriones cigóticos con estados avanzados de desarrollo y en las capas de la aleurona (Miyoshi *et al.*, 1999; Qu y Takaiwa, 2004). Este modelo de expresión podría ser ideal para la escisión de los genes marcadores de selección en los sistemas de transformación genética, para plantas regeneradas vía embriogénesis somática. A pesar de que se han escindido genes marcadores de selección con el uso de promotores inducibles por golpe térmico en *Musa*, no existe una metodología para escindir genes marcadores de selección mediante promotores inducibles en la formación y maduración de embriones somáticos de este género.

Teniendo en cuenta los aspectos anteriormente descritos, se plantea la siguiente hipótesis de trabajo:

Mediante el uso del sistema de recombinación sitio específico Cre/lox guiado por el promotor *REG-2* inducible en la formación y maduración de embriones somáticos, será posible obtener plantas transgénicas de banano cv. 'Grande naine' (*Musa* AAA) libres de genes marcadores de selección.

Para dar respuesta a esta hipótesis se definió el siguiente objetivo general:

- ✓ Obtener plantas transgénicas de banano cv. 'Grande naine' (*Musa* AAA) libres de genes marcadores de selección mediante el uso del sistema de recombinación Cre/lox guiado por el promotor *REG-2* inducible durante la formación y maduración de embriones somáticos.

Para complementar dicho objetivo se propusieron los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterizar la actividad del promotor *REG-2* de arroz en el proceso de obtención de plantas transgénicas de banano cv. 'Grande naine' (*Musa AAA*) utilizando como herramienta la expresión del gen *uidA*,
2. Determinar si hay escisión prematura de los genes marcadores de selección durante el proceso de selección,
3. Demostrar mediante análisis moleculares de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), hibridación de *Southern* y secuenciación, la escisión de los genes marcadores de selección.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Origen del género *Musa*

En cuanto al origen del género *Musa*, se considera que la península Malaya en el continente asiático, es el primer centro de origen de *Musa balbisiana* y *Musa acuminata*, los cuales se cruzaron dando lugar a la formación de todas las variedades comestibles conocidas en América (Belalcázar, 1991; Jones 2000). Respecto a la introducción en América, fue trasladado desde la Gran Canaria a Santo Domingo por Fray de Berlanga en 1516 y luego a Cuba (López 1989).

2.2 Taxonomía

Las musáceas pertenecen a la clase de las monocotiledóneas, al orden *Zingiberales* y a la familia *Musaceae*, la cual incluye los géneros *Musa* y *Ensete* según (Simmonds 1962).

El género *Musa* se divide en cuatro: *Australuminosa*, *Climusa*, *Rhodochlamys* y *Eumusa*. Esta última comprende a las especies *Musa acuminata* y *Musa balbisiana*. Para la sección *Eumusa* el número básico cromosómico es de $n=11$. Las musáceas comestibles se dividen en dos tipos: plátanos y bananos, que tuvieron su origen a partir de dos especies silvestres las cuales son diploides. La ploidía y el genomio de cada cultivar está representado con A para indicar la procedencia de *Musa acuminata* y con B para la de *Musa balbisiana* (Stover y Simmonds, 1987).

Existen cultivares diploides AA y triploides AAA, que son los dos tipos de banano cultivados, sin embargo los plátanos son híbridos entre las dos especies ancestrales, AAB (Simmonds 1962). También existen triploides (ABB, BBB) y tetraploides (AAAA, AAAB y AABB) (Sandoval y Muller, 1999).

2.3 Cultivar 'Grande naine'

Este cultivar pertenece al grupo AAA, subgrupo Cavendish o sea, que es un triploide que solamente tiene genoma *Acuminata*, el cual tiene una gran distribución a nivel mundial (Pérez *et al.*, 2002). Entre sus principales ventajas tiene: la altura de la planta, alrededor de los 2.5 m, que lo hace más fácil de manejar y más estable al daño del viento, presenta un índice de cosecha más alto que otros cultivares y el intervalo de emergencia-floración y floración-madurez fisiológica es de 196 y 122 días respectivamente, lo que hace un ciclo completo de 318 días (Soto 1985).

Descripción Morfotaxonómica (Musalogue, 2001)



Características de la planta

- Color de la savia: lechoso
- Hábito de hoja: intermedia
- Altura del pseudotallo: 2.1-2.9
- Aspecto de pseudotallo (m): normal
- Color del pseudotallo: verde-amarillo
- Color de las manchas: carmelita oscuro
- Apariencia del pseudotallo: brillante (no cremoso)
- Desarrollo de los hijos: más de $\frac{3}{4}$ de la altura de la planta madre
- Posición de los hijos: Cercando a la madre
- Manchas en la base del pecíolo: pequeñas

Características del Fruto:

- Posición del fruto: curvado hacia arriba (oblicuamente, a un ángulo de 45° hacia arriba)
- Ápice del fruto: despuntado-inclinado
- Forma del fruto: curvado
- Número de frutos: ≥ 17
- Largo del fruto (cm): 21-25
- Sección trasversa del fruto: ligeramente aristado

Características de las inflorescencias/brote masculino:

- Largo del pedúnculo (cm): 31-60
- Posición del racimo: cayendo verticalmente
- Tipo de raquis: presente y los brotes masculinos pueden ser degenerados o persistentes.
- Posición del raquis: verticalmente cayendo
- Tipo de brote masculino: normal (presente)
- Forma del brote masculino: intermedio
- Comportamiento de la bráctea antes de caer: enrollado
- Forma del ápice de la bráctea: ligeramente puntiagudo
- Imbricación de las brácteas: brácteas jóvenes ligeramente solapadas
- Color de la parte externa de la bráctea: rosado-púrpura
- Color de la parte interna de la bráctea: rojo naranja
- Color de la cáscara del fruto maduro: amarillo
- Cicatriz de la bráctea en el raquis: muy prominente
- Pulpa en el fruto: con pulpa
- Cera en la bráctea: moderadamente cerosa
- Restos de flores en el ápice del fruto: estilo persistente

2.4 Importancia

Los plátanos y los bananos son un componente importante en la dieta de millones de personas de todo el mundo, que encuentran en ellos una fuente excelente de carbohidratos, minerales y vitaminas para satisfacer parcialmente sus necesidades diarias, y una fuente de divisas para aquellos países que exportan estas frutas frescas (FHIA 2007).

En el mercado internacional, una de las principales frutas que conforman el movimiento diario son los bananos. En términos de volumen, se encuentran entre las primeras frutas de exportación, y ocupan el segundo lugar, después de las cítricas en términos de valor (Espinal *et al.*, 2006; FAO, 2007). Además se consideran como producto de gran impacto económico, social y ambiental, considerándose que esta industria, es un importante recurso de ingreso y empleo para muchos países exportadores, mayormente en Latinoamérica y el Caribe, así como, Asia y África (FAO, 2007).

2.5 Mejoramiento Genético

2.5.1 Mejoramiento Genético Convencional

Los bananos y plátanos son cultivos difíciles de mejorar genéticamente debido a que la mayoría de los cultivares son estériles, no producen semillas, son partenocárpicos y presentan largos ciclos de selección. A pesar de esto, los programas de mejoramiento genético han progresado en años recientes y como resultado empiezan a aparecer nuevas variedades disponibles para su evaluación (Sweenen *et al.*, 2003).

El trabajo de mejoramiento genético convencional comenzó en los años 20 del siglo pasado, en el *Imperial College of Tropical Agriculture*, en Trinidad y un poco más tarde en Jamaica con un programa paralelo (Leiva-Mora 2006). Estos programas involucran cruzamientos entre plantas con diferentes niveles de ploidía. Debido a que el éxito en estos cruzamientos a menudo se basa en una meiosis alterada, es decir, producción de gametos no reducidos, pueden producirse híbridos con diferentes niveles de ploidía (Ortiz y Vuylsteke, 1996; Vuylsteke *et al.*, 1996).

Con las investigaciones realizadas por la Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA) surgió un grupo de plátanos y bananos híbridos triploides y tetraploides con resistencia a la *Sigatoka negra*, Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum*) y nemátodos (Rowe y Rosales, 1990, 1994). Entre estos se destacan los híbridos tetraploides FHIA 1 (AAAB), FHIA 2 (AAAA), FHIA 3 (AABB), FHIA 18 (AAAB) y FHIA 21 (AAAB), que han mostrado una alta resistencia a la *Sigatoka negra*. Esta resistencia se expresa por un alargamiento del ciclo de la enfermedad, la reducción del tamaño de las lesiones y de la capacidad de producción de esporas (Pérez 1996).

2.5.2 Mejoramiento genético por mutaciones

Los sistemas de mejoramiento por mutaciones inducidas, se basan en que los agentes mutagénicos (físicos o químicos) producen cambios similares a los que se presentan en las mutaciones naturales, en un período de tiempo relativamente corto y en mayor cantidad (Donini y Sonnino, 1998; Perea 1998). Estos son cambios en el ADN nuclear u organelo citoplasmático, dando lugar a mutaciones génicas, cromosómicas o genómicas, pero la limitación del mejoramiento genético por mutación es la no especificidad del carácter cambiado (Maluszynski *et al.*, 1995).

En *Musa*, debido a los problemas de mejora genética convencional anteriormente mencionados, el mejoramiento genético empleando mutaciones cobra un rol importante (Nichterlein, 2000). El quimerismo originado por el tratamiento mutagénico de estructuras multicelulares y la selección diplóntica, representan el mayor obstáculo para el aislamiento de mutantes somáticos inducidos. En banano (triploides) cada locus pudiera presentarse en tres alelos dominantes (AAA), dos dominantes y uno recesivo (AAa), uno dominante y dos recesivos (Aaa) o tres recesivos (aaa). Como las mutaciones son generalmente recesivas la posibilidad de obtener una mutación útil estará restringida a tres configuraciones Aaa, aAa, aaA (Morpurgo *et al.*, 1997). Es por ello que una alternativa ha sido, la inducción de mutaciones con el empleo de técnicas biotecnológicas.

2.5.3 Mejoramiento genético por Biotecnología

Debido a las limitaciones que presenta el mejoramiento genético clásico, la aplicación de las técnicas biotecnológicas ha aumentando en todo el mundo para mejorar el manejo y las propiedades de los plátanos y bananos.

La técnicas biotecnológicas incluyen cultivos de tejidos, cultivo de anteras, fusión de protoplastos, embriogénesis somática, mejoramiento genético por mutación *in vitro*, variación somaclonal, selección *in vitro*, citometría de flujo de ADN, marcadores moleculares y la transformación genética (Arvanitoyannis *et al*, 2008).

La Biotecnología Vegetal tiene tres objetivos básicos de interés para la mejora genética: el incremento de la variabilidad genética sin intervención de la reproducción sexual, la propagación de genotipos normalmente inestables en la reproducción sexual y la disminución en el número o en la duración de los ciclos de selección necesarios para un determinado programa de mejora (Pérez 1998a).

El uso de la biotecnología ofrece un valioso medio de generación y obtención de plantas de banano y plátanos, resistentes a diferentes enfermedades ya que permite trabajar con un elevado número de individuos y aumenta de esta forma la posibilidad de encontrar los caracteres deseados. Además, existe un control del ambiente y el acceso a las plantas libres de la enfermedad (Leiva-Mora 2006).

También se pueden desarrollar técnicas para el rescate de embriones, selección *in vitro* desde etapas muy tempranas a factores bióticos y abióticos, inducción de mutaciones *in vitro* (con el consiguiente incremento de la eficiencia del agente mutagénico), desarrollo de técnicas de transformación genética empleando métodos directos o indirectos (biológicos) y la micropropagación de los somaclones seleccionados para los estudios de extensión (Pérez, 1998b).

El requisito de mayor importancia para utilizar el cultivo de tejido en los programas de mejoramiento genético por Biotecnología, es poder contar con un sistema de regeneración

muy eficiente, para que las células modificadas genéticamente puedan desarrollarse y regenerar plantas que manifiesten las características deseadas (Pérez, 1998a).

Se han desarrollado programas de mejoramiento genético empleando estos métodos para la obtención de plantas resistentes a enfermedades, reducción del porte de las plantas, mejora de la calidad de los frutos, entre otros, en el CIRAD (Centro de Cooperación Internacional en Investigación Agronómica para el Desarrollo) según Bakry y Horry (1994), en el Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT) (Pino *et al.*, 1998), en el Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP) (Pérez, 1998a), además se han desarrollado proyectos nacionales en Sudán, Pakistán, Malaysia y Australia (Roux *et al.*, 1994).

2.6 Cultivo de tejidos en plátanos y bananos.

Existen dos métodos principales de regeneración *in vitro* que han sido utilizados para la propagación, la organogénesis y la embriogénesis somática. La regeneración de plantas por una y otra vía depende de las características genéticas de las plantas y del manejo del cultivo *in vitro*, que tiene en cuenta la manipulación, los medios de cultivo y otras condiciones ambientales (Tisserat, 1991; Gómez, 1998).

La embriogénesis somática, es un proceso que permite que células vegetales no cigóticas incluyendo células haploides, formen embriones somáticos con una estructura bipolar y sin conexión vascular con el tejido original, resultando en plantas completas (Kamle *et al.*, 2011). Es un proceso asexual con expresión de la totipotencia celular, que involucra la dediferenciación de una célula no cigótica y su posterior rediferenciación, resultando en la formación de todas las características celulares de una planta madura (Namasivayam, 2007). En el género *Musa*, el desarrollo de la embriogénesis somática ha tenido dos objetivos principales: disponer de una técnica con alta eficiencia para la micropropagación y de un sistema de regeneración a nivel celular útil para la transformación genética, hibridación somática, inducción de mutaciones y variación somaclonal (Águila *et al.*, 2012).

En *Musa* la embriogénesis somática ha sido obtenida por diferentes vías, mediante el cultivo de embriones cigóticos, tejido foliar y rizoma, meristemos altamente proliferantes, a partir de flores masculinas y femeninas (Aguiar *et al.*, 2008).

La embriogénesis somática en banano fue mejorada mediante la inducción de callos a partir de flores masculinas inmaduras, posteriormente se procede al establecimiento, mantenimiento y multiplicación de las suspensiones celulares embriogénicas que serán el material de partida para la inducción y desarrollo del embrión somático, seguido de la maduración, germinación y conversión de las plántulas (Escalant *et al.*, 1994; Cote *et al.*, 1996; Grapin *et al.*, 1996; Daniels *et al.*, 2002; Khalil *et al.*, 2002; Jalil *et al.*, 2003).

2.7 Transformación genética

La transformación genética es la metodología mediante la cual se inserta ADN foráneo de manera estable dentro de un genoma hospedero, y resulta una técnica de mejoramiento con amplias potencialidades en la ingeniería genética (Gelvin 2003a).

Existen diferentes metodologías para la transformación genética de plantas, siendo la biobalística y la mediada por *Agrobacterium tumefaciens* las más utilizadas. Las bacterias del género *Agrobacterium* son componentes ubicuos de la microbiota del suelo, siendo la mayoría de estas saprofíticas cuyo hábitat es la materia orgánica en descomposición (Escobar y Dandekar 2003).

Sin embargo, algunas de estas especies causan enfermedades neoplásicas en plantas. Por ejemplo, *A. rhizogenes*, causante de la formación de raíces adventicias; *A. rubi* (enfermedad de la agalla de la caña), *A. vitis* (agalla de la corona de uva) y *A. tumefaciens* (enfermedad de la agalla de la corona (Gelvin 2003b). Estas enfermedades han sido descritas como una forma de colonización genética, debido a que se caracteriza por la transferencia y expresión de un conjunto de genes hacia las células de las planta causando un crecimiento celular incontrolado y la producción de estas células de sustancias nutritivas para la bacteria. Estas

sustancias, conocidas como opinas, son aminoácidos de bajo peso molecular y derivados fosfatados de azúcares (Schell *et al.*, 1979).

Desde el primer evento de transformación genética en banano descrito por Sagi *et al.* (1994) varios protocolos de transformación genética han sido desarrollados, los cuales difieren en el método de transferir el ADN, tipo de explante y cultivares empleados (Becker *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000; Matsumoto *et al.*, 2002).

Entre los métodos de transformación genética disponibles, el mediado por *Agrobacterium tumefaciens* es el más empleado en *Musa*. A través de este método se han obtenido plantas transgénicas empleando la cepa LBA4404 y tejido meristemático como fuente de explante (May *et al.*, 1995). Los explantes ideales para la transformación genética son las suspensiones celulares embriogénica, debido a que los embriones somáticos formados pueden tener un origen unicelular o pluricelular pero a partir de pocas células. Por lo tanto la posibilidad de obtener plantas quiméricas es baja (Grapin *et al.*, 1996).

El primer protocolo de transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens* de suspensiones celulares, fue desarrollado por Ganapathi *et al.*, (2001) en el cultivar de banano Rasthali (*Musa* AAB). En otras investigaciones se ha logrado una eficiencia de 10 a 50 plantas transgénicas por 50 mg de células embriogénicas (Khana *et al.*, 2004; Pérez-Hernández *et al.*, 2006; Ghosh *et al.*, 2009). También, se ha descrito la producción de plantas transgénicas a partir de tejido meristemático (Tripathi *et al.*, 2008; Subramanyam *et al.*, 2011).

El establecimiento de un protocolo de transformación genética requiere que la secuencia que se introduce tenga genes marcadores de selección que permitan seleccionar los tejidos transformados, en plátanos y bananos los más empleados han sido *nptII* (Herrera-Estrella *et al.*, 1983), *hpt* (Herrera-Estrella *et al.*, 1983) y el *als* (Ganapathi *et al.*, 2001).

2.8 Genes Marcadores de Selección

2.8.1 Generalidades

Los genes marcadores de selección (GMS) son una herramienta indispensable en la transformación genética puesto que permiten diferenciar aquellas células, tejidos y plantas que han sido transformados de los que no se transformaron. Los GSM pueden clasificarse en dependencia de si permite el desarrollo del tejido transformado (selección positiva) o causan la muerte de este (selección negativa). Además, si la selección requiere la presencia de sustratos externos es condicional o si no la requiere no condicional (Miki y Mchugh, 2004). Los marcadores de selección de tipos positivos y condicionales necesitan de la presencia de antibióticos (kanamicina e higromicina), herbicidas (fosfinotricina) o compuestos químicos, como sustratos normalmente tóxicos para las plantas sin transformar (Miki y Mchungh, 2004).

También se han desarrollado marcadores de selección positivos condicionales, donde se utilizan agentes no tóxicos, que pueden ser sustratos que permiten el crecimiento y diferenciación de las células o tejidos transformados (Fernández, 2006; Sundar y Sakthivel, 2008). Por ejemplo, la manosa no puede ser usada en muchas plantas como fuente de carbono, pero la enzima fosfomanosa isomerasa, codificada por el gen *manA*, que convierte la Manosa-6-fosfato a Fructuosa-6-fosfato, siendo esta última metabolizada rápidamente por la planta para emplearla como fuente de carbono, por lo que en este caso la manosa sería el agente selectivo (Reed *et al.*, 2001).

El gen que codifica para la *Neomicina fosfotransferasa* (*neo* o *nptII*) fue aislado a partir del transposon Tn5 en *Klebsiella pneumoniae*. Este confiere resistencia a los aminoglucósidos tales como kanamicina, neomicina, paronomicina y geneticina (G418) (Bevan *et al.*, 1983; Fraley *et al.*, 1983; Herrera-Estrella *et al.*, 1983). Por su parte, el gen de la *higromicina fosfotransferasa* (*hpt*) confiere resistencia a higromicina B, un aminoglucósido tóxico a la célula vegetal debido a que inhibe la síntesis protéica (Blochlinger y Diggelmann, 1984).

Ambos antibióticos han sido empleados en la obtención de plantas transgénicas de plátanos y bananos (Pérez-Hernández *et al.*, 2006; Ghosh *et al.* 2009; Vishnevetsky *et al.*, 2011; Subramanyam *et al.*, 2011).

Otro ejemplo de selección positiva condicional es el uso de herbicidas. Este sistema tiene la ventaja que las plantas pueden ser asperjadas para la selección en casa de cultivo o en campo y a su vez puede ser el gen de interés. La L-fosfinotricina es un análogo estructural del ácido L-glutámico y actúa como inhibidor de la enzima glutamina sintetasa provocando la acumulación de amonio a niveles tóxicos para la planta. Para la resistencia a este herbicida se han identificado dos genes que codifican para la *Fosfinotricina N-acetiltransferasa* (PAT), estos son el gen *pat* de *Streptomyces viridochromogenes* (Wohlleben *et al.*, 1988) y el gen *bar* (de resistencia a biolafos) de *Streptomyces hygrosopicus* (Thompson *et al.*, 1987).

2.8.2 Percepción pública de los Organismos Genéticamente Modificados

En años recientes el uso y liberación de Organismos Genéticamente Modificados (OGM), ha provocado un intenso debate público con respecto a los alimentos y productos que contienen estos organismos y el riesgo de su consumo. La Organización Mundial de la Salud (OMS), define los OGM, como aquellos organismos en los cuales el material genético ha sido alterado por una vía que no ocurre de forma natural (Domingo y Bordonaba, 2011).

Las evaluaciones para cada cultivo genéticamente modificado (GM) han sido realizadas usando diferentes parámetros, el resultado más común es que tanto los cultivos GM como los convencionales tienen una respuesta similar (Magaña-Gómez y de la Barca, 2009).

En este sentido los estudios de riesgos de los OGM reflejan la complejidad de este tema. Sin embargo, el público en general desconoce las ventajas o desventajas que ofrece esta tecnología y el amplio rango de aplicaciones que estas pueden tener. Desde la primera generación de los OGM las discusiones se han centrado en el riesgo al ambiente y a la salud humana (Key *et al.*, 2008).

En la actualidad no existe un consenso en el debate sobre los posibles riesgos que puedan ocasionar los cultivos transgénicos y como minimizar estos riesgos (Hills *et al.*, 2007). En este sentido, el debate se ha enfocado a la posible transferencia de los genes de resistencia a antibióticos, presentes en las plantas transgénicas hacia microorganismos del suelo y las plantas aledañas, mediante transferencia horizontal de genes.

Por otro lado, se encuentra la transformación de bacterias en la cadena alimenticia. El ADN libre persiste en algunos materiales por semanas y en otros casos algunas bacterias desarrollan una competencia química natural para tomar este ADN del medio. Además, en el tracto gastrointestinal de los humanos y animales, el ADN puede permanecer estable durante un tiempo determinado, fundamentalmente en el colon (van den Eede *et al.*, 2004).

La transformación natural constituye el principal mecanismo de transferencia de genes en procariotas. Este consiste en la captación del ADN extracelular y su integración al genoma (de Vries y Wackernagel, 2002). El ADN cromosomal transferido dentro una especie puede ser integrado mediante recombinación homóloga. Sin embargo, el ADN foráneo con baja o ninguna secuencia idéntica, puede ser integrado en bacterias por dos mecanismos diferentes. Uno, consiste en pequeñas secuencias nucleotídicas específicas, reconocidas por enzimas tales como transposasas o integrasas, que pueden “cortar y pegar” el ADN en estos sitios. El otro mecanismo, está determinado por la recombinación no homóloga que une moléculas de ADN, donde existen pocos pares de nucleótidos idénticos (de Vries y Wackernagel, 2002). En bacterias presentes en la flora intestinal de humanos y animales podría ocurrir transferencia horizontal de genes. Este fenómeno podría ocurrir con genes de resistencia a antibióticos, los cuales se pueden transferir hacia bacterias patógenas y estas a su vez podrían manifestar una determinada resistencia a antibióticos empleados en la práctica clínica. Sin embargo, el riesgo de que esto ocurra es mínimo debido a los procesos de degradación del ADN que ocurren durante la digestión. Por otro lado varios estudios han demostrado en el caso específico del gen marcador *nptII*, que la transferencia horizontal de

este gen entre plantas transgénicas y microorganismos no es significativo al ser comparada con la transferencia del gen *nptII* entre bacterias (Miki y McHugh, 2004; Ramessar *et al.*, 2007).

Otra de las consecuencias de la continua presencia de los genes marcadores de selección y sus elementos regulatorios son los efectos pleiotrópicos, donde la actividad de las enzimas pueden influir sobre la actividad de otras enzimas (Miki *et al.*, 2009). Las secuencias regulatorias de los genes marcadores de selección puede tener influencia sobre los transgénos o genes endógenos que se encuentran cerca de los sitios de inserción (Yoo *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2007).

Por otro lado el escape de genes de resistencia a herbicidas a plantas más cercanas es una preocupación. Muchos cultivos transgénicos son compatibles sexualmente con plantas silvestres o arvenses que se encuentran relativamente cerca a estos cultivos, por lo que podría ocurrir un flujo genético (Ellstrand, 2003). Pero este proceso consta con varias barreras, ya que ambos tienen que crecer en estrecha proximidad, coincidir con la etapa de floración y la progenia debe ser suficientemente fuerte para propagarse (Mallory-Smith y Zapiola, 2008). En este sentido las preocupaciones se han centrado en impedir que esto ocurra, una vía es colocando barreras aledañas a las zonas con los cultivos transgénicos (Lemaux, 2009). Otra estrategia consiste en impedir la transferencia del polen a plantas presentes en áreas cercanas mediante un retardo o disminución de la floración (Kwit *et al.*, 2011).

Debido a lo planteado anteriormente existe una tendencia mundial a la eliminación de los genes marcadores de selección en plantas transgénicas.

2.8.3 Estrategias para obtener plantas transgénicas libres de genes marcadores de selección

Aunque los genes marcadores de selección (GMS) son indispensables en casi todos los protocolos de transformación genética, estos generalmente no son necesarios una vez

obtenida la planta transgénica. Por el contrario, su permanencia puede causar ciertos problemas los cuales pueden ser solucionados con la eliminación de los GMS. Aunque la mayoría de los GMS empleados son seguros para la salud humana, el ambiente y han sido aprobados por agencias regulatorias (Ramessar *et al.*, 2007), una parte importante del público se opone al uso generalizado de los genes de resistencia a antibióticos y herbicidas. La eliminación de los genes marcadores de selección de las plantas transgénicas permite la retransformación con el mismo marcador de selección. Por ejemplo en soya esta estrategia ha sido usada para introducir consecutivamente dos genes involucrados en la biosíntesis del ácido fático (Eckert *et al.*, 2006).

Existen diferentes estrategias para la eliminación de los genes marcadores de selección, entre los que se encuentran, el empleo de los elementos transponibles, por ejemplo el Ac/Ds de maíz, el cual ha sido usado para la reubicación y eliminación del gen marcador de selección en tomate (*Solanun esculentum*) (Yoder y Goldsbrough, 1994) y arroz. Estos elementos transponibles pueden ser eliminados del genoma después de la expresión de la transposasa; los cuales pueden reinsertarse o no. Si ocurre una reinserción del transposón, el gen de interés es colocado en el elemento transponible, así el gen de interés será reinsertado en un locus diferente al que se encuentra el gen marcador de selección y serán segregados en la descendencia (Cotsaftis *et al.*, 2002).

Otro método desarrollado para eliminar el gen marcador, es el que tiene en cuenta la maquinaria de reparación del ADN de la célula vegetal. De esta forma, la reparación de la ruptura en la doble cadena de ADN, puede ser mediante recombinación homóloga o por no homología en la unión final de la cadena, lo cual es importante para la supervivencia de todos los organismos (Orel *et al.*, 2003). La proporción de recombinación homóloga, con respecto a los eventos de no homología en la unión final aumenta, si las secuencias homólogas cercanas a la rotura están disponibles (Siebert y Puchta, 2002). Durante el proceso de reparación el gen marcador de selección puede ser convertido o eliminado

(Fishman-Lobell *et al.*, 1992). Orel *et al.* (2003) mostraron que la vía asociada a la delección fue cinco veces más que la vía de conversión de genes.

Sin embargo, las dos estrategias más usadas son la cotransformación y los sistemas de recombinación sitio específica (Darbani *et al.*, 2007).

En la cotransformación el gen marcador de selección y el gen de interés están presentes en dos plásmidos diferentes o en dos ADN-T diferentes. Las células vegetales seleccionadas con frecuencia contienen el gen marcador de selección y el gen de interés no selectivo. Si el gen marcador de selección y el gen de interés están integrados en loci diferentes, estos pueden segregarse independientemente y se puede lograr una descendencia libre de genes marcadores de selección. Esta estrategia se emplea para la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* o biobalística (Darbani *et al.*, 2007).

Existen tres vías diferentes para lograr la co-transformación: (ia) introducción de dos ADN-T, en cepas de *Agrobacterium* independientes o (ib) introducción vía biobalística de dos plasmidios en el mismo tejido; (ii) introducción de dos ADN-T transportados por replicones diferentes dentro de la misma cepa de *Agrobacterium*; y (iii) introducción de dos ADN-T localizados en el mismo replicón de una cepa de *Agrobacterium* (Afolabi *et al.*, 2005).

Con el empleo de esta estrategia se han logrado obtener plantas transgénica libres de marcadores de selección, en soya (*Glicine max* L.) (Sato *et al.*, 2004; Behrens *et al.*, 2007) y garbanzo (*Cicer arietinum*) (Acharjee *et al.*, 2010). Pero este método no puede ser aplicado a plantas estériles, especies propagadas vegetativamente y en plantas con un ciclo de vida prolongado como los forestales (Matsunaga *et al.*, 2002).

En la estrategia de recombinación sitio específica el gen marcador de selección es flanqueado por los sitios de reconocimientos de la recombinasa en repeticiones directas. Una vez que se haya seleccionado el evento transgénico será posible escindir el GMS por la actividad de la recombinasa, la cual actuará sobre los sitios de reconocimiento escindiendo toda secuencia que esté entre estos dos sitios (Darbani *et al.*, 2007).

Varias vías han sido desarrolladas para proporcionar la actividad de la recombinasa, estas incluyen: (i) la retransformación con una construcción que contenga el gen de la recombinasa, (ii) cruzamiento con plantas que expresen la recombinasa, (iii) expresión de la recombinasa mediante vectores virales y (vi) activación inducida de la actividad de la recombinasa (Darbani *et al.*, 2007).

Los sistemas de recombinación más empleados son el CRE/lox del bacteriófago P1 (Hoess *et al.*, 1982; Hoess y Abremski, 1985), FLP/*frt* de *Saccharomyces cerevisiae*, (Cox, 1983; Senecoff *et al.* 1985) y *R/RS* de *Zygosaccharomyces rouxii* (Araki *et al.*, 1985). Estos sistemas son derivados de la familia de recombinasas relacionada con la tirosina. Estas están definidas por un residuo catalítico de tirosina utilizado para cortar el ADN blanco durante el proceso de recombinación (Gidoni *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2012).

La recombinación sitio específica se divide en dos categorías fundamentales teniendo en cuenta la posición del gen de la recombinasa. En la primera ambos transgenes y el gen marcador de selección están en vectores diferentes, en la cual la recombinasa puede ser liberada a la planta transgénica por retransformación o por cruzamiento sexual (Russel *et al.*, 1992; Hoa *et al.*, 2002; Kerbach *et al.*, 2005). La primera planta transgénica libre de genes marcadores de selección comercialmente viable, se obtuvo por este método, al crear la línea de maíz (*Zea mays*) LY038, donde el gen marcador de selección *nptII*, que se encontraba entre los sitios *lox* fue eliminado mediante la introducción del gen *cre* por cruzamiento sexual (Ow, 2007). Pero la principal limitación de ambos sistemas es que requieren de más tiempo y de una labor más intensa durante el mejoramiento genético y solo son aplicables a especies con reproducción sexual.

Sin embargo en la segunda categoría que emplea la recombinación sitio-específica, el gen marcador de selección y el gen de la recombinasa están en el mismo vector entre los sitios de recombinación, y se le suele denominar como vectores de auto-escisión. Estos contienen solo los genes marcador de selección y recombinasa, flanqueados por los sitios de

reconocimiento de la recombinasa, y el gen de interés fuera del sitio de reconocimiento (Verweire *et al.*, 2007).

Como en los casos anteriores, en los métodos de auto-escisión, el gen de la recombinasa no debe ser expresado hasta después de la selección. La expresión de la recombinasa puede ser inducida por una señal externa o una señal intrínseca, dando lugar a la auto-escisión de los genes marcadores y de la recombinasa, localizados dentro de los sitios de reconocimiento por la enzima. Un ejemplo es el empleo de promotores inducibles por golpe térmico guiando la expresión de la recombinasa, logrando escindir el gen marcador en *Arabidopsis* (Hoff *et al.*, 2001; Thomson *et al.*, 2009), maíz (Zhang *et al.*, 2003), papa (*Solanum tuberosum*) (Cuellar *et al.*, 2006), arroz (*Oryza sativa*) (Akbulak y Srivastava, 2011; Khattri *et al.*, 2011), banano (Chong-Pérez *et al.*, 2012a). La recombinasa además puede estar bajo el control de un promotor inducible químicamente, como es el caso del promotor *GST-II-27* de maíz el cual es inducido por el antídoto de herbicida Safener, mediante el control del sistema *R/RS* en tabaco (Sugita *et al.*, 2000), con la inducción por β -estradiol con el sistema *Cre/lox* en *Arabidopsis* (Zuo *et al.*, 2001), en arroz (Sreekala *et al.*, 2005) y en tomate (Zhang *et al.*, 2006). También puede ser mediante el control de promotores inducibles por una señal endógena, formando parte del ciclo de vida de la planta. Por ejemplo Mlynárová *et al.*, (2006) usaron el promotor *NTM19* específico de esporas para dirigir la expresión del gen *cre*, logrando escindir el gen marcador de selección en tabaco (*Nicotiana tabacum*) durante la formación de microsporas. Se ha logrado obtener plantas transgénicas de soya, libre de genes marcadores de selección usando el gen *cre* de la recombinasa, bajo el control de un promotor inducible durante la embriogénesis somática (Li *et al.*, 2007). Moravčíková *et al.*, (2008) usaron el promotor *CruC* de *Arabidopsis* inducible en semillas para el control de la expresión del gen *cre* en semillas de tabaco. Con una estrategia similar se obtuvieron plantas de *Brassica napus* libres de genes marcadores de

selección mediante un promotor de *Brassica napus* específico de semilla (Kopertekh *et al.*, 2009; 2010).

La escisión del gen marcador de selección mediado por la recombinasa tiene la ventaja que este puede convertir loci de transgenes complejos a menos complejos o la integración de copias simples (Verweire *et al.*, 2007).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó en los laboratorios de Biología Molecular, Embriogénesis Somática y Transformación Genética del Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), perteneciente a la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, en el período comprendido desde febrero del 2011 hasta septiembre del 2012.

TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS GENERALES DE TRABAJO

Los medios y frascos de cultivo utilizados en este trabajo fueron esterilizados en autoclave a 121 °C y 1.2 kg.cm⁻² de presión, por tiempos que variaron en dependencia del volumen de medio de cultivo a esterilizar, según información técnica de la firma SIGMA (1991). Los platos metálicos para el manejo de los explantes, los tamices para filtrado, placas de Petri y pipetas, fueron esterilizados en la estufa a 180 °C durante dos horas.

Los medios de cultivo en estado semisólido se dosificaron en frascos de vidrio con capacidad total de 250 ml, a los que se les adicionaron 30 ml de medio de cultivo, en placas de Petri de 5,0 y 10,0 cm de diámetro con capacidad de 10,0 y 20,0 ml de medio de cultivo y en tubos de vidrio de 25 ml de capacidad, con 10 ml de medio de cultivo.

El instrumental (pinzas y espátulas) se desinfectó en un esterilizador eléctrico modelo *DENT-EQ* que permaneció dentro de la cámara de flujo laminar, donde se realizó el manejo de los materiales biológicos (establecimiento, subcultivos y cambios de medios de cultivo). En los trabajos con suspensiones celulares embriogénicas, se utilizaron pipetas cortas de vidrio de 15.0 ml de volumen y un *PIPETBOY* (Drummond). El manejo de los cultivos en medio de cultivo semisólido y de las suspensiones celulares, se realizó en condiciones de esterilidad empleando una cámara de flujo laminar horizontal. El pH fue ajustado con NaOH 0,5 N y HCl 0,5 N, antes de la esterilización en autoclave.

Establecimiento y mantenimiento de suspensiones celulares embriogénicas del cultivar 'Grande naine'.

Para el establecimiento de las suspensiones celulares embriogénicas, se emplearon masas de embriones somáticos obtenidos de callos embriogénicos de alta frecuencia. Se colocaron 150-200 mg de masa fresca (mgMF) de embriones obtenidos de los callos formados de las flores masculinas inmaduras en frascos Erlenmeyers de 25 mL de capacidad y se añadió 3 mL de medio de cultivo líquido propuesto Bieberach (1995) (sales MS 100%, biotina 1 mg/L, vitaminas MS 10mg/L, L-glutamina 100 mg/L, extracto de malta 100 mg/L, sacarosa 45 g/L, 2.4 D 1 mg/L).

Los Erlenmeyers fueron colocados en un agitador orbital modelo *INFORS* (HT), bajo condiciones de oscuridad, a una velocidad de 90 rpm y temperatura controlada a 27 ± 2 °C. Después de 15 días de cultivo se filtró la suspensión celular que se formó a partir de los embriones somáticos, usando una malla metálica con un tamaño de poro de 500 µm. Las suspensiones se multiplicaron en frascos de 50, 100 y 250 mL. Posteriormente las suspensiones en fase de multiplicación cultivadas en frascos Erlenmeyers de 250 mL fueron utilizadas para los experimentos de transformación.

Para la multiplicación de las suspensiones se utilizó una densidad celular de cultivo inicial de 3,0 % del volumen de células sedimentadas, siguiendo la metodología propuesta por Gómez *et al.*, (1999).

Análisis estadístico

Se empleó un diseño completo al azar y para la comparación de medias relacionadas con el número de colonias vivas se aplicó la prueba de hipótesis t-student para un nivel de significancia de $p \leq 0.05$, con ayuda del paquete estadístico SPSS versión 18 para Windows.

3.1 Caracterización de la actividad del promotor *REG-2*

Clonación del promotor *REG-2* en los vectores pGW-A y pCAMBIA1301

Un fragmento de 1252 pb de la región promotora del gen *REG-2* (del inglés Rice Embryo Globulin 2) fue amplificado a partir de ADN genómico de arroz cv. Nipponbare (*Oryza sativa* grupo japónica) usando cebadores que contenían los sitios de entrada *attB1* y *attB2* del sistema Gateway (Invitrogen) y los sitios *EcoRI* y *NcoI* para la clonación clásica mediante enzimas de restricción. Los cebadores usados para clonar el promotor *REG-2* fueron: *REG-2* FW sense (*EcoRI*), 5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTG AGA ATT CGT CGA CGA GCG AGT CAT TAG-3' y *REG-2* RV antisense (*NcoI*), 5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GT CCA TGG AGG TGT TCG ATC GAT CCT AGC-3'. En negrita se señala la secuencia específica del promotor y subrayada está la secuencia de reconocimiento de las enzimas de restricción.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*) se realizó usando 0.625 µL de la Taq polimerasa PrimeSTAR® HS (Takara, Japón) en 50 µl de la mezcla de reacción que contenía 1 µl de ADN total (200 ng), 10 µl del tampón PrimeSTAR para PCR a 5X, 400 µM de cada dNTP y 5 pM de cada cebador. La reacción fue llevada a cabo en un termociclador Mastercycler (Eppendorf, Alemania) con las siguientes condiciones: 98°C por 1 min, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 98°C por 10 segundos, 55°C de hibridación por 10 segundos, síntesis a 72°C por 90 segundos, y una extensión final a 72°C por 10 minutos.

El producto del PCR se introdujo en el vector pDONR-Zeo® a través de la reacción BP durante toda la noche, siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen), dando como resultado el vector *REG-2* Entry clone. A continuación el fragmento *EcoRI-NcoI* del *REG-2* Entry clone se usó para sustituir la región del promotor 35S en los sitios *EcoRI-NcoI* del plasmidio pCAMBIA1301 (CAMBIA, Canberra, Australia), formando el plasmidio

pREG2::uidA. Este vector permitió caracterizar la expresión del promotor *REG-2* en cuanto a tiempo y especificidad del tejido. El plasmidio pCAMBIA1301 fue usado como control.

Posteriormente el promotor se introdujo en el vector de destino pGW-A (Verweire *et al.*, 2007) a través de la reacción LR para formar el plasmidio pREG2-A. Ambos plasmidios (pREG2::uidA y pREG2-A) fueron transformados en las células competentes de *E. coli* cepa DH5 α (Invitrogen) y crecieron en medio de cultivo semisólido LB, que contenía 50 mg/L de kanamicina a 37°C, durante toda la noche. De 10 a 20 colonias se seleccionaron y crecieron en medio líquido LB. El ADN fue aislado usando el kit GenElute™ Plasmid DNA (Sigma, Alemania), chequeado por análisis de restricción enzimática seguido de una corrida electroforética. Los plasmidios binarios fueron transformados en la cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens* (Hood *et al.*, 1993) por el método de congelación y descongelación (Holsters *et al.*, 1978). Este protocolo se describe a continuación: La transformación se realizó a partir de células competentes preparadas según la metodología de (Hofgen y Willmitzer 1988). A 500 μ L de cultivo de células competentes se añadieron 10 μ L del plasmidio (1 μ g). Luego de homogenizar con cuidado se sometió la mezcla a la siguiente secuencia de golpes térmicos: 5 minutos en hielo, 5 minutos en N₂ (líquido) y 5 minutos a 37 °C. Este procedimiento se realizó por duplicado.

Posteriormente el cultivo se dejó enfriar por 10 minutos en hielo, se le añadió 1,0 mL de medio de cultivo Luria Bertani (LB, 10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de NaCl) y se incubó a 28 °C por 4 horas. Luego se inocularon de 100 a 600 μ L del cultivo en placas con medio de cultivo semisólido LB en presencia de los antibióticos adecuados (rifampicina y kanamicina). Se incubaron toda la noche y se seleccionaron colonias aisladas al azar para chequear la transformación, mediante el aislamiento de ADN plasmídico y la digestión con enzimas de restricción.

Transformación genética de suspensiones celulares embriogénicas del cultivar 'Grande naine' (*Musa AAA*) mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

Para la transformación genética se utilizó la cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens*, en la cual se introdujeron los plásmidos pREG2::uidA y pCAMBIA1301 como vectores de transformación.

Infección y Co-cultivo.

Antes de la transformación, se aisló una colonia de la cepa EHA105 que contenía por separado cada uno de los plásmidos anteriormente mencionados, las cuales crecieron en medio de cultivo sólido LB que contenía 50 mg/L de kanamicina y rifampicina y se inocularon cada una en 3 mL de medio de cultivo LB líquido en presencia de los antibióticos anteriormente mencionados (precultivo). Los precultivos se incubaron por 24 horas a 28 °C y 200 rpm. Luego se inocularon (50 µL) por separados en 50 mL de medio de cultivo YEP (10 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de bactopectona, 5 g/L de NaCl, pH 7,0) con las mismas concentraciones de antibióticos y se mantuvieron toda la noche en zaranda orbital (Retomed) a 150 revoluciones por minuto (rpm). Luego las células fueron colectadas por centrifugación a 5000 rpm por 10 minutos y el precipitado fue resuspendido en medio de cultivo líquido ZZ (sales MS al 50%; vitaminas MS; ácido ascórbico 10 mg/L; sacarosa 30 g/L; 2,4-D 1 mg/L; pH 6.12 antes de la esterilización por autoclave), libre de antibióticos, ajustándose la densidad óptica (DO₆₀₀) entre 0,4 y 0,5. Posteriormente se le añadió a la suspensión bacteriana acetosiringona para una concentración final de 200 µM y espermidina a 1,0 mM.

Las suspensiones celulares embriogénicas se emplearon con nueve días posteriores al último subcultivo. Estas se ajustaron a una concentración de 33% del volumen de células sedimentadas en un tubo cónico de vidrio graduado de 15 mL de capacidad. Con la ayuda de la micropipeta (SOCOREX) de 1000 µL y puntas azules (con las puntas cortadas), se homogenizó la suspensión celular embriogénica y luego se mezclaron 200 µL de esta

(aproximadamente 50 mg de peso fresco) con 1 mL del cultivo de la suspensión bacteriana. La infección se realizó en placas multipozos (Nalgene) con 24 capacidades que luego fueron colocadas en la oscuridad a 25 °C en un agitador orbital a 25 rpm por 6 horas.

Subsiguientemente las células vegetales se transfirieron a una malla de poliestireno (50 µm) colocadas encima de papel de filtro para eliminar el exceso de la suspensión de *Agrobacterium tumefaciens*. Las mallas fueron transferidas a placa de Petri de 5 cm de diámetro que contenían 10 mL de medio de cultivo semisólido ZZ con 3 g/L Gelrite y 200 µM de acetosiringona a pH ajustado a 6.3 antes de la esterilización por autoclave. El co-cultivo se realizó por 6 días en la oscuridad a una temperatura de 21°C.

Selección y regeneración

Después del co-cultivo, las células fueron transferidas a medio de cultivo semisólido ZZ en presencia del agente selectivo higromicina (50 mg/L) y 200 mg/L de timentina para eliminar la bacteria. Estas se mantuvieron en este medio de cultivo durante ocho semanas con subcultivos a medio fresco cada dos semanas, en condiciones de oscuridad y a una temperatura de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Posteriormente, estas fueron transferidas para un medio de cultivo de formación de embriones sin agente selectivo RD1 (medio de cultivo MS al 50% de las sales; con ácido ascórbico 100 mg/L; mioinositol 100 mg/L; Gelrite 2,5 g/L, sacarosa 3% (m/V) y pH 5.8 antes de ser esterilizado por autoclave) y fueron colocados durante cuatro semanas a la oscuridad a una temperatura de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Luego los embriones somáticos se colocaron en tubos de vidrio de 25 mL de capacidad, con 10 mL de medio de cultivo de germinación (sales y vitaminas MS al 100%; 6-BAP (6-bencilaminopurina) 0,5 mg/L; AIA (ácido indolacético) 2,0 mg/L; 30 g/L de sacarosa; 2,5 g/L Gelrite; y el pH 5.8). El cultivo se realizó en condiciones de luz natural a $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Después de un mes en estas condiciones, las plantas regeneradas fueron subcultivadas en tubos de

vidrio de 25 mL de capacidad, con 10 mL de medio de cultivo MS suplementado con sacarosa al 3%. Los que no germinaron fueron transferidos a un medio de cultivo de germinación fresco durante otro mes.

Determinación histoquímica de la β -glucuronidasa (Ensayo GUS)

El ensayo histoquímico se llevó a cabo en diferentes muestras transformadas genéticamente con el plasmidio pREG2:uidA, en diferentes períodos de tiempos posterior a la inoculación con *A. tumefaciens* (1, 4, 8, 12 y 16 semanas). Células embriogénicas, masas proembriogénicas, embriones somáticos y plántulas se incubaron en una solución tampón que contenía 1 mM de la sal ciclohexilamonio del ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónico (sustrato de la enzima comercialmente X-Gluc (Duchefa, Haarlem, Países Bajos), 100 mM de tampón fosfato (pH 7.0, 50 mM Na₂HPO₄ y 50 mM KH₂PO₄), 10 mM EDTA, 5 mM de ferricianuro de potasio, 5 mM de ferrocianuro de potasio, 0.1% de Triton X-100, 1 mM X-Gluc (Jefferson *et al.* 1987). En todos los casos las muestras fueron incubadas a 37°C y oscuridad durante la noche. Se evaluó de manera cualitativa la expresión de la β -glucuronidasa a través de la presencia de los puntos o manchas de color azul en las muestras anteriormente mencionadas.

3.2 Determinación de la escisión prematura de los genes marcadores de selección durante el proceso de selección

Suspensiones celulares embriogénicas de banano cv. 'Grande naine' (Musa AAA), fueron inoculadas con *A. tumefaciens* que contenía el plasmidio pREG2-A, el proceso de transformación y regeneración se realizó como se explica en el acápite 3.1. Después de las ocho semanas en medios selectivos con higromicina (50 mg/L) o geneticina (50 mg/L), se evaluó la posible escisión de los genes marcadores de selección mediante la comparación del número de colonias embriogénicas crecidas en ambos medios selectivos.

3.3 Análisis moleculares

3.3.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

El ADN genómico se extrajo de hojas de plantas de banano transformadas con el plasmidio pREG2-A, a partir del kit de extracción de ADN Genómico de Plant GenElute™ (Sigma, Alemania). Para la PCR se usaron alrededor de 100 ng de ADN genómico, se utilizó como enzima de polimerización ExTaq (Takara, Japón). Para determinar la eficiencia de escisión del gen marcador de selección, se emplearon dos combinaciones de tres cebadores. La secuencia de dichos cebadores es la siguiente: C-3300-F, 5'-GCG GAC GTT TTT AAT GTA CTG AAT TAA CG-3'; nptII-SR, 5'-CCG CAT TGC ATC AGC CAT GAT GG-3'; y codA-1, 5'-GTC GCC AAC CCG CTG GTC AAT ATT C-3'.

En el caso de que ocurra la escisión, el PCR con la combinación de los cebadores C3300-F/nptII-SR debe amplificar un fragmento de 724 pb (pares de bases). Si esta no ocurre, entonces el resultado debe ser una banda de 8.3 kb (kilobases). Para evitar los resultados falsos negativos debido a la dificultad de amplificar el fragmento de 8.3 kb, el PCR también fue realizado con la combinación de los cebadores codA-1/nptII-SR. En este caso, si no ocurre la escisión se debe obtener un fragmento de 1,441 kb.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen total de 25 µL, que contenía, 1.0 µL de ADN genómico a 100 ng/µL, 5 µL de cada cebador a 5 pmol/µL, 200 µM de dNTP, buffer de reacción de la Taq polimerasa a 1X, 1 U ExTaq polimerasa (TaKaRa), a la mezcla de PCR se adicionó 0.1% (w/v) de albúmina de suero bovina (BSA) y 1.0% (w/v) de polivinil pirrolidona (PVP) para aumentar la especificidad de la reacción (Zin *et al.*, 2003). Se empleó un Termociclador (Eppendorf, Alemania), iniciando el proceso de desnaturalización a 95 °C durante 1 minuto, seguido por 30 ciclos a 94 °C durante 30 segundos, 60 °C durante 30 segundos y 72 °C por 8 o 1.5 minutos, con una extensión final a 72 °C por 15 minutos.

3.3.2 Análisis de hibridación por Southern

El ADN genómico se extrajo a partir de hojas de plantas *in vitro* de banano cv. 'Grande naine' (*Musa* AAA) empleando el kit de extracción de ADN Nucleon Phytopure (RPN8511, GE Healthcare) según las instrucciones del fabricante. Posteriormente 20 µg de ADN fueron digeridos durante 3 horas con las enzimas *MvaI/VspI* (Fast digest, Fermentas, Alemania).

Luego los fragmentos de ADN fueron separados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % (p/V) durante 14 horas a 25 V. Posteriormente el gel fue teñido en una solución de bromuro de etidio (5 µg/l) para corroborar la digestión del ADN. Se utilizaron 40 ng de marcador de peso molecular marcado con digoxigenina (Molecular Weight Marker VII, Roche, Vilvoorde, Belgium), para realizar una estimación del tamaño de las bandas. Después de los tratamientos de desnaturalización (0.5 M NaOH; 1.5 M NaCl) y neutralización (1.5 M NaCl; 1.0 M Tris-HCl; pH 7.0), el ADN fue transferido desde el gel hacia una membrana de nylon Hybond (RPN203B; GE Healthcare) por fuerzas de capilaridad ascendente, usando el tampón SSC 20X (NaCl 3 M, citrato de sodio 0,3 M, pH 7.0) toda la noche a temperatura ambiente.

La incorporación de la digoxigenina dentro de la sonda *nptII* se hizo mediante una reacción de PCR con la enzima Taq ADN polimerasa, los cebadores utilizados tenían la siguiente secuencia: S-*nptII*-F 5' –ATG ATT GAA CAA GAT GGA TTG CAC GC-3' y S-*nptII*-R2 5'-TGA TGC TCT TCG TCC AGA TCA TC-3'. El procedimiento de hibridación se realizó siguiendo las instrucciones del proveedor (Roche, Vilvoorde, Belgium), a 50°C durante toda la noche. Los lavados de estringencia se realizaron según indica el proveedor. Posteriormente se aplicó el sustrato CSPD® (Roche) acorde con las instrucciones del fabricante, para detectar la señales por inmuno-quimioluminiscencia en películas de rayos X.

3.3.3 Análisis de la secuencia obtenida después de la recombinación

Para confirmar la escisión de los genes marcadores de selección del genoma de banano, se purificó la banda de 724 pb del PCR1 en seis líneas libres de genes marcadores de selección, utilizando el kit de extracción de GenElute Gel Extraction KitTM (Sigma-Aldrich). La secuenciación fue realizada por la compañía Macrogen Europe (Países Bajos) empleado los cebadores C-3300-F y nptII-SR.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización de la actividad del promotor *REG-2*

Con el objetivo de desarrollar un sistema de auto-escisión en banano cultivar 'Grande naine' (*Musa AAA*), primeramente se estudió el patrón de expresión del promotor inducible de arroz *REG-2* durante el proceso de embriogénesis somática en este cultivar de banano. El promotor *REG-2* codifica para una proteína del tipo 7S-Globulina la cual es capaz de expresarse en embriones cigóticos maduros (Sun *et al.*, 1996; Miyoshi *et al.*, 1999; Qu y Takaiwa, 2004). La expresión de este gen está regulada temporal y espacialmente en semillas de arroz y aumenta su expresión durante el desarrollo del embrión cigótico. Por tanto, el perfil de expresión de este gen sería conveniente, para controlar la expresión del gen *cre*, durante el proceso de transformación genética.

En el plasmidio pCAMBIA1301, el promotor 35S fue remplazado por el promotor *REG-2*, para conducir la expresión del gen *uidA*. La figura 1A muestra la región del ADN-T del plasmidio resultante pREG2::uidA. La actividad del promotor *REG-2* se comprobó visualmente, por medio de la expresión de la β -glucuronidasa en diferentes períodos de tiempos posterior a la inoculación con *A. tumefaciens* (1, 4, 8, 12 y 16 semanas). Durante las primeras cuatro semanas no se observó expresión GUS (Fig. 2A y B), en la semana ocho durante el proceso de selección pocos embriones mostraron la expresión de la β -glucuronidasa (2C). Sin embargo, la actividad GUS se visualizó a las 12 semanas en los embriones somáticos formados en medio de cultivo RD1 y en embriones somáticos secundarios localizados en la base de las plántulas germinadas, no así en las plántulas germinadas (Fig. 2D y E). Por el contrario se observó expresión GUS en los grupos de células, embriones somáticos y plántulas derivadas de las células embriogénicas transformadas con el plasmidio pCAMBIA1301 durante las semanas evaluadas (Fig. 2F, G, H, I y J).

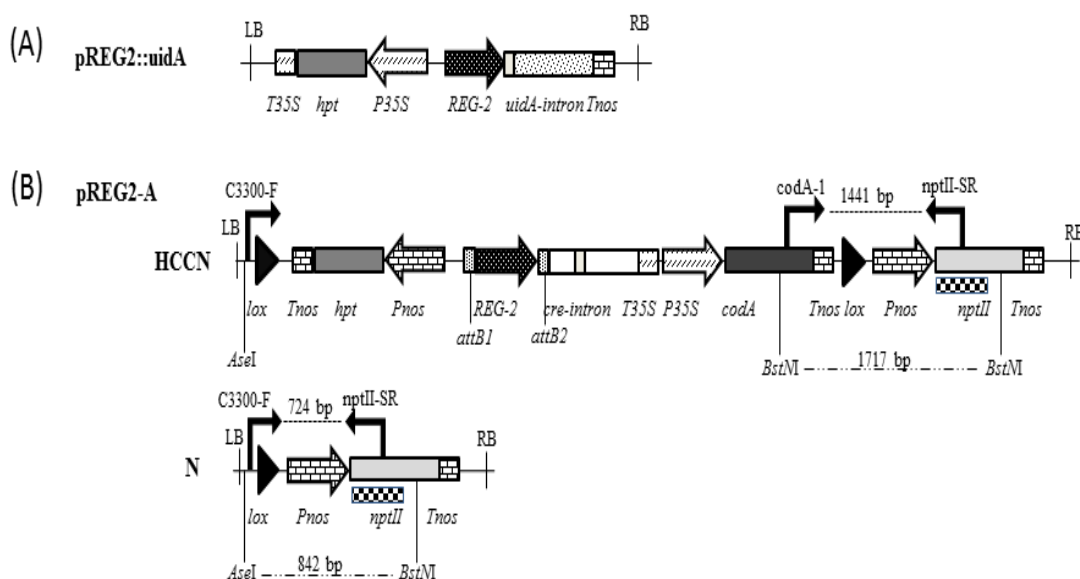


Figura 1 Esquemas de la región ADN-T de los plasmidios usados en los experimentos de transformación. **(A):** pREG2::uidA. plasmidio evaluado derivado del pCambia1301 con el REG-2 para guiar la expresión del gen reportero uidA. **(B):** pREG2-A: construcción de autoescisión de los casetes de expresión de los genes marcadores de selección y de la recombinasa (HCCN) así como el producto esperado (N) después de la escisión mediada por la recombinasa Cre; REG-2: promotor del gen de la proteína embrio globulina 2 de arroz; LB y RB, borde izquierdo y borde derecho del ADN-T; uidA: gen que codifica para la β -glucuronidasa; Tnos: señal de poliadenilación del gen de la *nopalina sintetasa*; lox: sitios de reconocimiento por la recombinasa; hpt: gen de la *higromicina fosfotransferasa*; Pnos, promotor del gen de la *nopalina sintetasa*; T35S, CaMV 35S señales de poliadenilación; codA, gen de la *citocina desaminasa*; nptII, gen de la *neomicina fosfotransferasa*; cre-intron, gen de la recombinasa Cre que contiene un intrón; P35S, promotor 35S. El promotor REG-2 se introdujo vía reacción LR (Gateway®); dando lugar a la presencia de los sitios attB1 y attB2 antes y después de la secuencia del promotor respectivamente. Los cebadores usados en el análisis de PCR y los sitios de restricción y sondas empleadas en el análisis de Southern, se indican respectivamente en la parte superior e inferior de las construcciones.

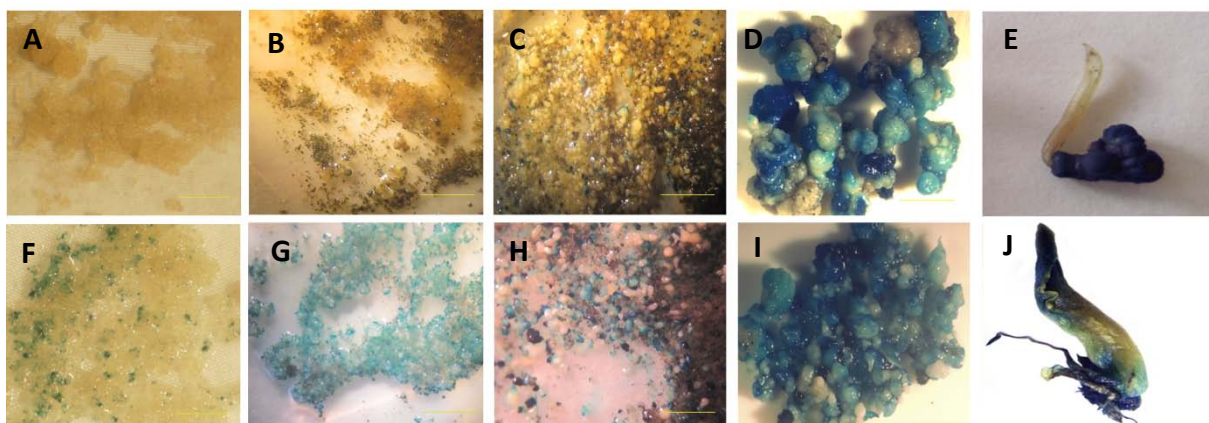


Figura 2 Análisis histoquímico de la expresión GUS dirigido por el promotor *REG-2* específico de embriones (panel superior) y por el promotor 35S (panel inferior), en embriones somáticos transgénicos de banano cv. 'Grande naine' (*Musa* AAA). (A, F) una semana, (B, G) 4 semanas, (C, H) 8 semanas, (D, I) 12 semanas y (E, J) 16 semanas, después de la transformación con *A. tumefaciens* cepa EHA105, que contenía el plasmidio pCambia1301 (panel inferior) y el pREG2::uidA (panel superior).

A partir de los patrones de expresión del gen *uidA* guiado por el promotor *REG-2*, se investigó la estrategia de auto-escisión de los genes marcadores de selección durante la transformación en banano con *A. tumefaciens* utilizando para ello el sistema de recombinación sitio específico Cre-*lox* en el plasmidio pREG2-A (Fig. 1B).

4.2 Determinación de la escisión prematura de los genes marcadores de selección durante el proceso de transformación

Después de dos meses en selección aparecieron colonias de embriones supuestamente transformadas con el plasmidio pREG2-A, en ambos medios selectivos, mientras que las agregados no transformados mostraron una necrosis intensa, lo cual puede estar debido fundamentalmente a la no inserción de los genes foráneos dentro del genoma de la célula vegetal.

Transcurridas ocho semanas del proceso de selección, las suspensiones celulares embriogénicas transformadas con el plasmidio pREG2-A formaron un promedio de $50,43 \pm 10,75$ colonias de embriones por placas en medio selectivo con higromicina y $48,86 \pm 10,55$ en medio selectivo con geneticina no existiendo diferencias significativas entre ellas.

En este experimento se obtuvo una relación de transformación estable de 1.03 al comparar el número de colonias que crecieron en higromicina con respecto a las crecidas en G418. Este resultado es un indicativo de que no ocurrió escisión del gen marcador de selección (*hpt*), durante la etapa de selección (2 meses).

Las colonias embriogénicas resistentes a higromicina se colocaron en un medio de cultivo libre de antibióticos RD1, hasta completar el desarrollo y maduración de los embriones somáticos. Luego de dos meses en medio de cultivo de germinación se observó la formación de brotes y un desarrollo normal de las raíces. Posteriormente a las líneas transgénicas obtenidas a partir de estos embriones se les realizaron los análisis moleculares.

4.3 Análisis moleculares

4.3.1 Análisis de PCR

Para verificar la escisión de los genes marcadores de selección, se realizó un análisis del ADN de las líneas de plantas regeneradas mediante PCR utilizando dos combinaciones de tres cebadores. Los cebadores C3300-F/nptII-SR amplifican una banda de 724 pb (pares de base) (fragmento "N", Fig.1B) cuando ocurre la escisión y una banda de 8.3 kb (kilobase) cuando no ocurre dicha escisión (el fragmento ADN-T original "HCCN", Fig.1B).

Para confirmar estos resultados, un segundo PCR fue realizado con la combinación de cebadores codA-1/nptII-SR la cual debe amplificar un fragmento de 1441 pb correspondiente al ADN-T no recombinado "HCCN" (Fig.1B) mientras que, ninguna amplificación es posible si ocurre la escisión debido a que la secuencia del cebador codA-1 coincide con un fragmento del gen *codA* que se encuentra dentro del segmento a escindir.

Basado en estos principios, 44 líneas de plantas fueron seleccionadas al azar para el análisis de PCR con las combinaciones de cebadores C3300-F/nptII-SR (PCR 1) y codA-1/nptII-SR (PCR 2). La figura 3, muestra que en el análisis de PCR1, solo 22 líneas tenían el fragmento “N” obtenido debido a la recombinación (724 pb); cuatro líneas mostraron el fragmento sin recombinar “HCCN” (8,3 kb); en seis líneas se observaron ambas bandas, mientras que en 12 líneas no se encontró ninguna señal.

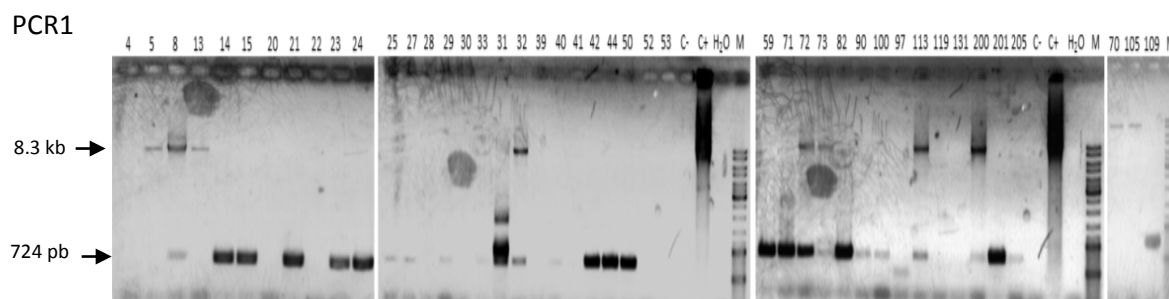


Figura 3 Análisis por PCR de líneas transgénicas de banana cv. ‘Grande naine’ (*Musa AAA*) regeneradas después de seis meses de ocurrida la transformación. PCR1: Combinación de cebadores C-3300-F/nptII-SR produciendo un fragmento de 724 pb específico para el alelo N (escisión) y/o un fragmento de 8.3 kb indicativo para el alelo original HCCN, Co-, plantas sin transformar; C+, plasmidio control; H₂O, control de agua. MWM: Marcador de Peso Molecular Gene Ruler® DNA Ladder Mix (Fermentas).

Por otro lado, los resultados del PCR2 mostraron que el fragmento de ADN de 1441 pb “HCCN” estuvo presente en 21 líneas, las cuales incluyen las seis líneas que mostraron las dos bandas en el PCR1, las cuatro líneas que tenían solo el fragmento de 8.3 kb, siete líneas que contenían solamente el fragmento “N” de escisión y cuatro líneas que no mostraron ninguna señal en el PCR1 (Fig.4).

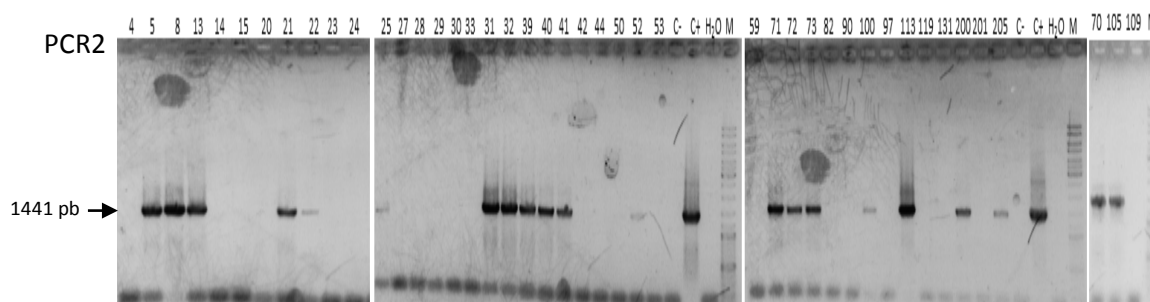


Figura 4 Análisis por PCR de líneas transgénicas de banano cv. ‘Grande naine’ (*Musa* AAA) regeneradas después de seis meses de ocurrida la transformación. PCR2: combinación de cebadores CodA-1/nptII-SR produciendo un fragmento de 1441pb específico para el alelo HCCN, Co-, plantas sin transformar; C+, plasmidio control; H₂O, control de agua. MWM: Marcador de Peso Molecular Gene Ruler® DNA Ladder Mix (Fermentas).

Estos datos permitieron confirmar los resultados obtenidos en el PCR1 y la estrategia para usar la segunda combinación de cebadores y detectar posibles resultados enmascarados.

De las 22 líneas que resultaron positivas a la escisión del fragmento, el PCR2 reveló que 15 de las líneas estaban libres de genes marcadores de selección, con un promedio de 34% de las líneas analizadas (15/44). También 13 líneas mostraron ambos fragmentos “N” y “HCCN”, esto pudo ser debido a que estas líneas contenían múltiples inserciones de ADN-T en su genoma o a la coexistencia de dos tipos de células producto a una escisión incompleta que resulta en la formación de plantas quiméricas. Por otra parte, ocho líneas no mostraron escisión e igualmente ocho líneas no mostraron ninguna señal, lo cual indica que estos fueron escapes en el proceso de selección.

4.3.2 Análisis de hibridación por *Southern*

A su vez, para confirmar los resultados obtenidos en el análisis de PCR, fueron seleccionadas 19 líneas al azar para la hibridación mediante el análisis de Southern. El ADN genómico de estas líneas fue digerido con *Bst*NI/*Ase*I e hibridado con una sonda correspondiente a un fragmento de 488 pb del gen *nptII*.

Las plantas en las cuales ocurrió la escisión, exhibieron una banda de 842 pb, mientras que una banda de 1717 pb es indicativo de una secuencia ADN-T original no recombinada (Fig.5).

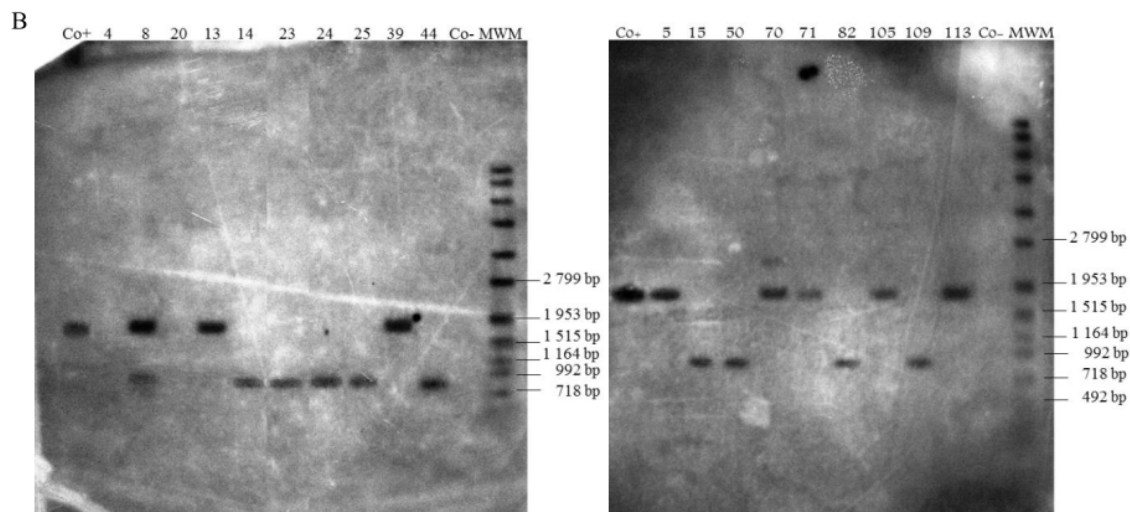


Figura 5 Análisis de hibridación por Southern blot de líneas transgénicas de banano cv. 'Grande naine' (*Musa AAA*) con el plasmidio pREG2-A. Se digirieron 20 µg de ADN total con las enzimas *AseI* y *BstNI*, luego los fragmentos separados fueron hibridados con una sonda *nptII* (488 pb) marcadas con digoxigenina. Co-, control de plantas no transformadas; Co+ plasmidio linializado; MWM, marcador de peso molecular de ADN VII (Roche) marcado con digoxigenina.

Como se muestra en la figura 6, nueve líneas mostraron una recombinación eficiente de los sitios *lox* y revelaron solo la banda de 842 pb (14, 23, 24, 25, 44, 15, 50, 82 y 109). Esto confirma los resultados de PCR, excepto para la línea 25, la cual mostró una banda de 1441 pb en el PCR2 (indicativa de que no hubo escisión). Además, siete líneas mostraron solo la banda con 1717 pb lo que indica que la escisión no ocurrió en estas líneas (13, 39, 5, 70, 71, 105 y 113).

En estos resultados no se evidenció señal de escisión (842 pb) en las líneas 71 y 113, como fue esperado de los resultados del PCR1 (Fig.4); lo cual pudo ser debido a la naturaleza química de estas líneas.

Solo la línea ocho mostró las bandas de 1717 pb y 842 pb en el análisis de Southern, como se esperaba del análisis de PCR. Quizás esta línea tenía múltiples inserciones del ADN-T y en una o alguna de estas ocurrió la recombinación de los sitios *lox* generando así el fragmento “N” mientras en los otros ADN-T no hubo recombinación (Fig. 6).

4.3.3 Análisis de la secuencia obtenida después de la recombinación

Para confirmar la escisión de los genes marcadores de selección del genoma de banano, se purificó la banda de 724 pb en seis líneas libres de genes marcadores de selección, obteniéndose en todas las líneas los resultados esperados para una recombinación precisa. En esta se observa la secuencia del cebador C3300-F, la secuencia específica del sitio de recombinación *lox* remanente después de ocurrida la escisión y parte de la secuencia del promotor de la nopalina sintasa perteneciente al casete de expresión del gen *nptII*.



Figura 6 Secuencia de confirmación de la escisión de los genes marcadores de selección del genoma de la línea 14 de banano transgénico cv. ‘Grande naine’ (*Musa AAA*). El fragmento de 724 bp fue amplificado a partir de ADN genómico en el PCR1 con los cebadores (C3300-F, 5'-GCGGACGTTTTTAATGTACTGAATTAACG-3' y *nptII*-SR, 5'-CCGCATTGCATCAGC CATGATGG-3').

En la literatura científica se hace referencia a diferentes procedimientos para la eliminación de los genes marcadores de selección, posterior a los procesos de transformación genética y selección, con el objetivo de obtener plantas transgénicas libres de marcadores de selección (Darbani *et al.*, 2007). Entre estos procedimientos se encuentra la recombinación sitio específica. Este es un sistema muy versátil que puede ser empleado por diferentes vías en cualquier especie de plantas. Una de estas vías es la estrategia de autoescisión, en la cual la expresión condicional de la recombinasa es controlada por promotores inducibles. Este sistema es de gran importancia para las especies propagadas vegetativamente o en especies con un ciclo vegetativo de larga duración, donde es imposible usar otros métodos que requieren la segregación y/o cruzamiento (Darbani *et al.*, 2007).

Para desarrollar este experimento nos basamos en el sistema Cre/lox guiado por el promotor embrión-específico *REG-2*, para obtener plantas transgénicas de banano libres de genes marcadores de selección. El éxito de este sistema, dependió de la expresión tempo-espacial de este promotor de arroz en agregados celulares y embriones somáticos de banano.

En este trabajo, no fue observada la activación de este promotor en las fases tempranas posterior a la transformación, durante la multiplicación de los agregados celulares de banano (1 y 4 semanas), un período en el cual la presión de selección es aplicada para eliminar las células no transformadas, pero se observó expresión GUS en algunos embriones formados durante la semana ocho, ya que desde este período empiezan a formarse algunos embriones, debido a la asincronía de la embriogénesis somática en banano. Sin embargo se observó una fuerte expresión de la β -glucuronidasa cuando se formaron los embriones somáticos en la semana número doce. En contraste, la expresión GUS estable no fue detectada en las plantas regeneradas, lo que demuestra que la actividad del promotor *REG-2* es regulada durante la embriogénesis somática en banano.

En arroz, el gen *REG-2* codifica la proteína 7S-globulina (Sun *et al.*, 1996) y su expresión es muy específica en embriones cigóticos con estados avanzados de desarrollo y en las capas de aleurona (Miyoshi *et al.*, 1999). Por su parte, Qu y Takaiwa (2004), demostraron que la actividad del promotor *REG-2* ocurre solamente en embriones cigóticos maduros y en la capa de aleurona, sin expresión en el endospermo del arroz. Este modelo de expresión es ideal para la escisión de los genes marcadores de selección en los sistemas de transformación genética, para plantas regeneradas vía embriogénesis somática como en la uva (Vidal *et al.*, 2009), arroz (Wagiran *et al.*, 2010) y coníferas (Klimaszewska *et al.*, 2005).

Sin embargo en los grupos de células, embriones somáticos y plántulas derivadas de las células embriogénicas transformados con el plasmidio pCAMBIA1301, se observó expresión GUS estable, lo cual se debe a que la expresión del gen *uidA* estaba dirigida por el promotor constitutivo 35S, el cual tiene la capacidad de mantener activa la expresión de un gen determinado durante todo el ciclo de vida de la planta y en todos los tejidos de la misma.

Según los resultados obtenidos, el promotor *REG-2* se indujo durante el desarrollo de los embriones somáticos de banano cv. 'Grande naine' (*Musa AAA*) al visualizarse una fuerte expresión GUS en la semana 12 posterior a la transformación con *Agrobacterium tumefaciens*. Este resultado demostró una vez más la especificidad de la expresión de este promotor durante el desarrollo de embriones, logrando una alta expresión en estos de la β -glucuronidasa.

Debido a las características que presenta el vector utilizado para la auto-escisión de los genes marcadores de selección (el gen *hpt* se localizaba entre los sitios *lox* y el gen *nptII* se localizaba fuera de los sitios *lox*), las células transformadas con el plasmidio pREG2-A, se colocaron en dos tipos de medios selectivos (higromicina y geneticina), con el objetivo de observar si ocurrió escisión prematura del gen *hpt*. El análisis estadístico demostró que no hubo diferencias significativas entre los números de colonias embriogénicas crecidas en

ambos medios selectivos. Esto se debe, a que el promotor empleado (*REG-2*) para el control del gen *cre*, no se activó durante la selección, momento en el cual debe ocurrir la multiplicación de las células embriogénicas pero no el desarrollo del embrión. De esta forma se evitó la recombinación de los sitios *lox* y la escisión del gen marcador de selección. Esto refleja la naturaleza del promotor (tejido específico) el cual es capaz de activarse durante el desarrollo del embrión somático al igual que hace en el embrión cigótico (Sun *et al.*, 1996; Miyoshi *et al.*, 1999).

Por otro lado los resultados obtenidos de los análisis moleculares (PCR e hibridación por Southern blot) demostraron la excisión de los genes marcadores de selección. Si tomamos en cuenta solamente las plantas transgénicas (36), el análisis de PCR realizado reveló la escisión completa del gen marcador de selección en 41,7% (15/36) de las plantas analizadas, y un 36,1% (13/36) de plantas quiméricas o que mantenían una copia del fragmento ADN-T sin recombinar, para un 77,8% de eficiencia en la escisión del gen marcador de selección. Estos resultados son similares a los obtenidos por Chong-Pérez *et al.* (2012) en este cultivar de banano, quienes lograron plantas transgénicas libres de genes marcadores de selección con el uso del sistema de recombinación Cre/*lox* guiado por promotores inducibles por golpe de calor.

Por otro lado, el Southern blot confirmó los resultados del PCR, y corroboró la escisión de los genes marcadores de selección (*hpt* y *codA*) y del gen *Cre* del genoma del banano. No obstante, los resultados del PCR y los análisis de hibridación Southern blot no concordaron en las líneas 25, 71 y 113. El PCR realizado a estas líneas mostró la ambas señales (escisión y no escisión), mientras el Southern blot mostró el fragmento “N” recombinado en la línea 25 y el fragmento sin recombinar “HCCN” para las líneas 71 y 113, lo cual puede ser debido a la coexistencia de células donde la recombinación ocurrió y otras donde no, mostrando así que estas plantas podrían ser quiméricas.

El quimerismo puede ser asociado a una insuficiente expresión del gen *Cre* durante el desarrollo del embrión somático. Este es un fenómeno inherente a la tecnología de la transgénesis y puede ser influenciada por muchos factores, como el número de copias del transgén, patrón de integración compleja y el sitio de inserción en el genoma (Jorgensen *et al.*, 1996; De Wilde *et al.*, 2000).

La relación entre los niveles de expresión del gen *Cre* y la eficiencia de recombinación, fue observada en plantas superiores por otros autores (Marjanac *et al.*, 2008). Sin embargo, otros resultados refieren que la expresión del gen *Cre* es menos susceptible a variación cuando este gen está gobernado por un promotor tejido específico o un promotor regulado durante el desarrollo (Van Ex *et al.*, 2009).

Según Maximova *et al.*, (2002), una fase de multiplicación de embriones somáticos puede ser introducida en el protocolo de transformación para reducir la incidencia de plantas quiméricas, basado en el origen unicelular de los embriones somáticos secundarios.

En este sistema de auto-escisión la presión de selección fue aplicada durante ocho semanas. Al parecer este tiempo no fue suficiente para eliminar las células sin transformar, causa de la ocurrencia de un 18% (8/44) de escapes durante la selección. Sin embargo, un incremento de la concentración del antibiótico o del período de cultivo en selección, combinado con una sincronización en el proceso de embriogénesis somática podría ser una solución para este problema. Adicionalmente, un tratamiento con ácido abscísico (ABA) en el medio de cultivo de maduración de los embriones somáticos podría ser incluida en el protocolo de transformación. De hecho, se plantea que el ABA induce la expresión de algunos genes en embriones cigóticos y embriones somáticos, como son los genes Late-Embryogenic Abundant (LEA) (Ikeda *et al.*, 2006). Así mismo, la expresión del promotor *REG-2* es inducida en embriones cigóticos de arroz en presencia de ABA (Sun *et al.*, 1996) y pueden ser esperados algunos efectos en los embriones somáticos. Según Sholi *et al.*

(2009) cuando el ABA fue incluido en el medio de cultivo de maduración, se incrementó alrededor de cinco veces la germinación de los embriones somáticos, lo cual hace mucho más atrayente la idea de utilizar este regulador de crecimiento en nuestro sistema de auto-escisión.

En otros trabajos se ha hecho referencia a una frecuencia de excisión del 100%, con empleo de sistemas basados en el promotor *NTM 19* específico del polen de tabaco (Mlynárová *et al.*, 2006), promotores *SDS* y *AP1* en *Arabidopsis thaliana* (Verweire *et al.*, 2007), promotores *BGP1* y *PAB5* específicos de polen (Luo *et al.*, 2007) en plantas de *Arabidopsis thaliana* y tabaco.

Por otro lado, Moravčíková *et al.* (2008), mostraron que el promotor del gen *cruciferin C* (*CruC*) de *Arabidopsis*, permitió la obtención de plantas transgénicas de tabaco libres del gen marcador de selección. También el promotor *LAT52* específicos de polen, obtenido de tomate acoplado con el sistema de recombinación *CinH-RS2* fue empleado para eliminar los genes marcadores de selección del polen de tabaco (Moon *et al.*, 2011).

Igualmente, Bai *et al.* (2008) informaron la excisión de un gen marcador de selección en arroz, en un sistema donde el gen *Cre* fue controlado por el promotor *OsMADS45* específico de flores, el cual es el único descrito para especies monocotiledóneas. En soya la eficiencia de excisión fue de 5-30% cuando el gen *Cre* fue dirigido por un promotor *app1* de *Arabidopsis thaliana* específico en embriones somáticos (Li *et al.*, 2007). Este sistema demostró por primera vez, la posibilidad de dirigir la activación del gen *Cre* con un promotor regulado durante el desarrollo en condiciones de cultivo *in vitro*.

En otras investigaciones se ha logrado escindir genes marcadores de selección con el empleo del sistema de recombinación *Cre/lox* guiado por varios tipos de promotores.

Empleando este sistema de recombinación, Liu *et al.* (2005) lograron un 95.7% de escisión de GM en plantas de tabaco, al emplear un promotor inducible por golpe térmico. Por su

parte, Wang *et al.* (2005) obtuvieron una eficiencia de 70-80% plantas de tabaco libres de genes marcadores con el promotor *HSP17.5E* inducible por golpe térmico.

En plantas de papa, Cuellar *et al.* (2006) lograron un 4.7% de escisión de GM, al emplear el promotor *hsp70* de *Drosophila melanogaster* inducible por golpe térmico. También, Deb Roy *et al.* (2008) obtuvieron plantas de *A. thaliana* libres del gen marcador *nptII* a través del promotor *hsp*, inducible por golpe térmico. Mientras que Khattri *et al.* (2011), lograron una línea de arroz transgénico que portaba una construcción *lox* y una simple copia del gen *cre* bajo el control del promotor *HSP17.5E* inducible por golpe térmico.

Por otro lado, se logró entre 29-66% de escisión de genes marcadores de selección en *Arabidopsis thaliana* con empleo del promotor *XVE* inducible a la presencia de β -estradiol (Zuo *et al.*, 2001). Con este mismo promotor, se obtuvo una eficiencia del 29.1% en plantas transgénicas de arroz (Sreekala *et al.*, 2005). También Zhang *et al.* (2006) hacen referencias a plantas de tomate libres de GM, con una eficiencia del 15% usando un promotor inducible químicamente. Similarmente, Ma *et al.* (2009) lograron plantas transgénicas de tomate libres del gen marcador de selección (*nptII*), con una eficiencia de 41% al utilizar un promotor inducible a la presencia de ácido salicílico.

En el arroz ha sido intensamente estudiado la escisión de genes marcadores de selección mediado por el sistema Cre-*lox*. En un estudio, se observó un 58.3% de delección de los genes marcadores de selección en la segunda generación de los híbridos obtenidos (Hoa *et al.*, 2002). A su vez, el empleo de este sistema controlado por un promotor específico del estado floral permitió una eficiencia de 37.5% en tres de ocho líneas de arroz (Bai *et al.*, 2008).

También se ha logrado escindir genes marcadores de selección con empleo de sistemas de recombinación sitio específica FLP/*frt* y el sistema de recombinación R/RS.

En el primer caso, Shan *et al.* (2006) emplearon este sistema controlado por un promotor inducible por golpe térmico (*hsp*), donde emplearon dos construcciones: pCAMBIA1300-betA-*frt*-*als*-*frt* y pCAMBIA1300-*hsp*-FLPhpt. Mediante el proceso de retransformación el gen de recombinasa FLP (*betAfrt-als-frt*) se introdujo en plantas de tabaco transgénico. Estas plantas al ser tratadas con golpe térmico, el gen marcador *als*, flanqueado por los sitios *frt*, fueron escindidos por la expresión de la recombinasa y el control del promotor *hsp*.

Por otro lado, Woo *et al.* (2009) lograron plantas transgénicas de tabaco libres del gen *hpt* mediante el empleo del sistema FLP/*frt* utilizando un promotor inducible al estrés oxidativo.

Posteriormente, Fladung *et al.* (2010) escindieron el GM en un clon de álamo, con empleo de los sistemas de recombinación sitio específico Cre/*lox* y FLP/*frt*. Las recombinasas (FLP y Cre), fueron guiadas por un promotor inducible por golpe térmico *Gmhsp17.5-E* de soya, flanqueados por los sitios de reconocimiento (*frt* y *lox*).

Trabajos recientes describen la obtención de plantas transgénicas de maíz libres de marcadores de selección que expresan constitutivamente el gen *AtNHX1* de *A. thaliana* el cual le confiere tolerancia a la salinidad empleado el sistema de recombinación sitio específico FLP/*frt* (Li *et al.*, 2010). Las plantas transgénicas que expresaban el gen FLP fueron cruzadas con plantas que portaban el gen *AtNHX1* y un mutante *als*, el cruzamiento sexual dio lugar a la obtención de plantas libres del gen marcador, ya que este se encontraba flanqueado por los sitios de recombinación *frt*.

Por otro lado, se ha empleado el sistema de recombinación R/RS, el cual ha sido empleado en cultivos de importancia agronómica y se han obtenido plantas transgénicas libres de GM de selección en *A. thaliana*, maíz, tabaco y arroz (Hoff *et al.* 2001; Zuo *et al.* 2001; Zhang *et al.* 2003; Yuan *et al.* 2004; Sreekala *et al.* 2005).

En todas estas metodologías la excisión del gen marcador ocurre durante la reproducción sexual, por eso estos sistemas no son aplicables en especies que son propagadas vegetativamente o tienen un ciclo de vida largo.

En esta investigación se demostró la capacidad del promotor *REG-2* para dirigir la expresión del gen de la recombinasa en estados tardíos del desarrollo de los embriones somáticos y obtener plantas transgénicas libres de genes marcadores de selección en banano cultivar 'Grande naine' (*Musa AAA*).

Conclusiones

1. Se logró caracterizar el promotor *REG-2* durante el proceso de transformación genética de banano cv. 'Grande naine' (*Musa AAA*) mediante la expresión del gen *uidA*,
2. No hubo escisión prematura de los genes marcadores de selección durante el proceso de selección, por lo que no afectó la eficiencia de transformación,
3. Se comprobó mediante análisis de PCR, hibridación de Southern y secuenciación, la escisión de los genes marcadores de selección,
4. Se logró obtener plantas transgénicas de banano cv. 'Grande naine' (*Musa AAA*) libres de genes marcadores de selección con el empleo del sistema de recombinación sitio específico Cre//ox guiado por el promotor *REG-2*.

1. Aplicar este sistema de recombinación sitio específico Cre//lox en otras especies para escindir los genes marcadores de selección.
2. Evaluar la influencia del ABA durante la maduración de los embriones somático.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abden, A., Miki, B. (2009) The pleiotropic effects of the BAR gene and glufosinate on the *Arabidopsis* transcriptome. Plant Biotechnol. J. 7: 266-282.
- Acharjee, S., Sarmah, B.K., Kumar, P.A., Olsen, K., Mahon, R., Moar, W.J., Moore, A. y Higgins, T.J.V. (2010) Transgenic chickpeas (*Cicer arietinum* L.) expressing a sequence-modified cry2Aa gene. Plant Science 178, 333-339.
- Afolabi, A. S., Worland, B., Snape, J., Vain, P. (2005) Multiple T-DNA co-cultivation as a method of producing marker-free (clean gene) transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plant. African J. Biotechnol. 4: 531–540.
- Águila, L.G., Gómez, K.R., Capó, Y.A., Sarría, Z. y Reyes, M. (2010) Efecto de la densidad de inoculación en la formación y morfología de los embriones somáticos de plátano (*Musa* spp. AAAB, cv híbrido FHIA-21). Revista Colombiana de Biotecnología, 12 (2): 240-247.
- Aguliar, M.V., Ortiz, L.V, Sandoval, J.F. (2008) Embriogénesis somática en plátanos y bananos: perspectivas y limitaciones. ATIE. Turrialba.
- Akbudak, M.A., Srivastava, V. (2011) Improved FLP recombinase, FLPe, efficiently removes marker gene from transgene locus developed by Cre–lox mediated site-specific gene integration in rice. Mol. Biotech. 49: 82-89.
- Araki, H., Jeernpipatkul, A, Tatsumi, H., Sakurai, T, Ushio, K., Muta, T., Oshima, Y. (1985) Molecular and functional organization of yeast plasmid pSR1. J. Mol. Biol. 182: 191–203.
- Arvanitoyannis, I.S., Mavromatis, A.G., Grammatikaki-Avgeli, G. and Sakellariou, M. (2008) Banana: cultivars, biotechnological approaches and genetic transformation. Int. J. Food Science Technol. 43: 1871-1879.

- Bai, X., Wang, Q., Chengcai, C. (2008) Excision of a selective marker in transgenic rice using a novel *Cre/loxP* system controlled by a floral specific promoter. *Transgenic Res.* 17: 1035–1043.
- Bakry, F. y Horry, J.P. (1994) *Musa* Breeding at Cirad-FIhor. En: The Improvemet and Testing of *Musa*: a Global Partnership Dr Jones (Edt). *Procedeedings of the First Global Conference of the International Musa Testing Program* held at FIHA, Honduras 27-30 abril. Pp. 169-176.
- Becker, D., Dugdale, B., Smith, M., Harding, R., Dale, J. (2000) Genetic transformation of Cavendish banana (*Musa* spp. AAA group) cv. 'Grande Naine' via microprojectile bombardment. *Plant Cell Report* 19: 229-234.
- Behrens, M.R., Mutlu, N., Chakraborty, S., Dumitru, R., Jiang, W.Z., LaVallee, B.J., Herman, P.L., Clemente, T.E. y Weeks, D.P. (2007) Dicamba resistance: enlarging and preserving biotechnology-based weed management strategies. *Science* 316, 1185-1188.
- Belalcázar, S.L. (1991) El cultivo del Plátano en el trópico. ICA. Cali, Colombia.
- Bevan, M.W., Flavell, R.B., Chilton, M.D. (1983) A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature* 304: 184-187.
- Bieberach, C. (1995) Embriogénesis y regeneración de plantas en cultivares de *Musa* spp. Tesis para optar al grado de *Magister Scientiae*. CATIE, Turrialba, Costa Rica. p. 86.
- Blochlinger, K., Diggelmann, H. (1984) Hygromycin B phosphotransferase as a selectable marker for DNA transfer experiments with higher eucaryotic cells. *Mol. Cell. Biol.* 4: 2929-2931.
- Carlier, J., Fouré, E., Gauhl, F., Jones, D., Lepoivre, P., Mourichon, X., Pasberg-Gauhl, C., Romero, R. (2000) Black Leaf Streak. En: Jones, D (Ed.) *Fungal Disease of the Foliage*. Cap. 2, pp. 67-72. CAB International, Wallingford.

- Chong-Pérez, B., Kosky, R.G., Reyes, M., Rojas, L., Ocaña, B., Tejeda, M., Pérez, B., Angenon, G. (2012a) Heat shock induced excision of selectable marker genes in transgenic banana by the Cre-lox site-specific recombination system. *Journal of Biotechnology*, 159: 265-273.
- Chong-Pérez, B., Reyes, M., Rojas, L., Ocaña, B., Pérez, B., Kosky, R.G., Angenon, G. (2012b) Establishment of embryogenic cell suspension cultures and *Agrobacterium*-mediated transformation in banana cv. 'Dwarf Cavendish' (Musa AAA): effect of spermidine on transformation efficiency. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 111:79-90.
- Cote, F., Domergue, R., Mommarso, S., Schwendiman, J., Teisson, C., Escalant, J.V. (1996) Embryogenic cell suspensions from the male flower of *Musa* AAA cv. Gran nain. *Physiologia Plantarum*. 97: 285-290.
- Cotsaftis, O., Sallaud, C., Breitler, J.C., Meynard, D., Greco, R., Pereira, A., Guiderdoni, E. (2002) Transposon-mediated generation of marker free rice plants containing a Bt endotoxin gene conferring insect resistance. *Mol. Breeding* 10: 165–180.
- Cox, M.M. (1983) The FLP protein of the yeast 2 mm plasmid: expression of a eukaryotic genetic recombination system in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80: 4223-4227.
- Cuellar, W., Gaudin, A., Solorzano, D., Casas, A., Nopo, L., Chudalayandi, P., Medrano, G., Kreuze, J., Ghislain, M. (2006) Self-excision of the antibiotic resistance gene nptII using a heat inducible Cre-loxP system from transgenic potato. *Plant Mol. Biol.* 62: 71-82.
- Daniels, D., Kosky, R.G., Vega, M.R., (2002) Plant regeneration system via somatic embryogenesis in the hybrid cultivar FHIA-21 (*Musa* sp. AAAB group). *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 38: 330-333.
- Darbani, B., Eimanifar, A., Stewart, C.N., Jr. y Camargo, W.N. (2007) Methods to produce marker-free transgenic plants. *Biotechnology Journal* 2, 83-90.

- de Vries, J., Wackernagel, W. (2002) Integration of foreign DNA during natural transformation of *Acinetobacter* sp. by homology-facilitated illegitimate recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 2094-2099.
- De Wilde, C., Van Houdt, H., De Buck, S., Angenon, G., De Jaeger, G., Depicker, A. (2000) Plants as bioreactors for protein production: avoiding the problem of transgene silencing. *Plant Mol. Biol.* 43: 347-359.
- Deb Roy, S.M., Saxena, P.S., Bhomkar, M., Pooggin, T., Hohn., Sarin, N.B. (2008) Generation of marker free salt tolerant transgenic plants of *Arabidopsis thaliana* using the gyl gene and cre gene under inducible promoters. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 95: 1– 11.
- Domingo, J.L., Bordonaba, J.G (2011). A literature review on the safety assessment of genetically modified plants. *Enviroment International*, 37: 734-742.
- Donini, P. y Sonnino, A. (1998) Induced Mutatation in Plant Breeding: Current Status and future Outlook En: *Somaclonal Variation and Indiced Mutation in Crop Improvement*. Jain, S.M. (Edt). Dordrecht/Boston/London: Kluwer. Pp. 255-291.
- Eckert, H., La Vallee, B., Schweiger, B.J., Kinney, A.J., Cahoon, E.B. y Clemente, T. (2006) Co-expression of the borage Δ^6 desaturase and the *Arabidopsis* Δ^{15} desaturase results in high accumulation of stearidonic acid in the seeds of transgenic soybean. *Planta* 224, 1050-1057.
- Ellstrand, N.C. (2003) Current knowledge of gene flow in plants: implications for transgene flow. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 358: 1163-1170.
- Escalant, J.V., Teisson, C. y Cote, F. (1994) Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant.* 30: 181-186.
- Escobar, M.A. y Dandekar, A.M. (2003) *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *Trends in Plant Science* 8 (8): 380-386.

- Espinal, C., Martínez, H., Peña, Y. (2006) "La cadena del banano en Colombia. Una mirada global de su estructura y dinámica." disponible en <http://www.agrocadenas.gov.co/>.
- FAO. (2007). "Banano, notas sobre productos básicos: situación del mercado del banano en 2005 y comienzos de 2006." disponible en <http://www.fao.org>
- FAOSTAT (2012). Food and Agriculture Organization of United Nations, available online at <http://faostat.fao.org> (consultado 3 de octubre del 2012).
- Fernández, J.F. (2006) Transgenic plants: Myths and realities from a technical point of view. *Rev Fitotec. Mex* Vol. 29(2):95-102.
- FHIA (2007). "Carta informativa trimestral de la dirección general." Fundación Hondureña de investigación agrícola **15** (1).
- Fishman-Lobell, J., Rudin, N., Haber, J.E. (1992) Two alternative pathways of double-strand break repair that are kinetically separable and independently modulated. *Mol. Cell. Biol.* 12: 1292–1303.
- Fladung, M., Becker, D. (2010) Targeted integration and removal of transgenes in hybrid aspen *Populus tremula* L x *P tremuloides* Michx using site-specific recombination systems. *Plant Biol. (Stuttg)* 12: 334 – 340.
- Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Sanders P.R., Flick, J.S., Adams, S.P., Bittner, M.L., Brand, L.A., Fink, C.L., Fry, J.S., Gallupi, G.R., Goldberg, S.B., Hoffman, N.L., Woo, S.C. (1983) Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80: 4803-4807.
- Ganapathi, T.R., Higgs, N.S., Balint-Kurti, P.J., Arntzen, C.J., May, G.D., van Eck, J.M. (2001) Agrobacterium –mediated transformation of embryogenic cell suspensions of the banana cultivar Rasthali (AAB). *Plant Cell Rep.* 20: 157-162
- Gelvin, S.B. (2003a) Improving plant genetic engineering by manipulating the host. *Trends in Biotechnology* **21**(3): 95-98.

- Gelvin, S.B. (2003b) Agrobacterium and plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 16–37.
- Ghosh, A., Ganapathi, T.R., Nath, P., Bapat, V.A. (2009) Establishment of embryogenic cell suspension cultures and Agrobacterium-mediated transformation in an important Cavendish banana cv. Robusta (AAA). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 97: 131–139
- Gidoni, D., Srivastava, V., Carmi, N. (2008) Site-specific excisional recombination strategies for elimination of undesirable transgenes from crop plants. *In Vitro Cell Dev. Biol. -Plant* 44: 457–467.
- Gómez, K.R. (1998) Cultivo de Células y Tejidos. En: *Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología*. Pérez N. (Edt.). Instituto de Biotecnología de Las Plantas. Cuba. Editorial GEO. Pp.25-44.
- Gómez, K.R., De, Feria M., Posada, L.P., Gilliard, T., Martínez, F.B., Reyes, M.V., Chávez, M.M., Quiala, M.E. (2002) Somatic embryogenesis of the banana hybrid cultivar FHIA-18 (AAAB) in liquid medium and scaled-up in a bioreactor. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 68: 21-26.
- Gómez, K.R., Escalant, J.V., Reyes, M.V., Posada, L.P., Freire, M.S. (1999) Embriogénesis somática en medio líquido en el cv. Gran Enano (*Musa* AAA). *CORBANA* 25 (52): 143-154.
- Grapin, A., Schwendiman, J. y Teisson, C. (1996) Somatic embryogenesis in banana plant. *In vitro Cell Dev. Biol.* 32: 66-71.
- Herrera-Estrella, L., De Block, M., Messens, M., Hernalsteens, J.P., Van Montagu, M., Schell, J. (1983) Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. *EMBO J.* 2: 987-995
- Hills, M.J., Hall, L., Arnison, P.G., Good, A.G. (2007) Genetic use restriction technologies (GURTs): strategies to impede transgene movement. *Trends Plant Science* 12: 177-183.
- Hoa, T.T.C., Bong, B.B., Huq, E., Hodges, T.K. (2002) Cre/lox site-specific recombination controls the excision of a transgene from the rice genome. *Theor. Appl. Genet.* 104: 518-525.

- Hoess, R.H., Abremski, K. (1985) Mechanism of strand cleavage and exchange in the Cre-lox site-specific recombination system. *J. Mol. Biol.* 181: 351–362.
- Hoess, R.H., Ziese, M., Sternberg, N. (1982) P1 site-specific recombination: nucleotide sequence of the recombining sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79: 3398–3402.
- Hofegen, R y Willmitzer, L (1988) Storage of competent cells for Agrobacterium Transformation. *Nucleic Acids Research* 26 (20): 9877.
- Hoff, T., Schnorr, K-M., Mundy, J. (2001) A recombinase-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* 45: 41–49.
- Holsters, M., De Waele, D., Depicker, A., Messens, E., Van Montagu, M., Schell, J. (1978) Transfection and transformation of *A. tumefaciens*. *Mol. Gen. Genet.* 163: 181–187.
- Hood, E.E., Gelvin, S.B., Melchers, L.S., Hoekema, A. (1993) New Agrobacterium helper plasmids for gene-transfer to plants. *Transgenic Res.* 2: 208-218.
- Ikeda, M., Umehara, M., Kamada, H. (2006). Embryogenesis-related genes: Its expression and roles during somatic and zygotic embryogenesis in carrot and Arabidopsis. *Mol. Biol.* 161: 153-161.
- Jain, M. (2002) Informe sumario de la Cuarta Reunión final de investigaciones coordinadas de FAO/IAEA sobre la Biología celular y biotecnología incluyendo técnicas de mutación para la creación de nuevos genotipos útiles de banano. *INFOMUSA.* 11(1): 14-15.
- Jalil, M., Khalid, N., Othman, R.Y. (2003) Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of *Musa acuminata* cv. Mas (AA). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 75: 209-214.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., Bevan, M.W. (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6: 3901-3907.
- Jones, D. (2000) Diseases of Banana; Abacá and Enset. Jones DR (Ed). CABI Publishing, Wallingford, UK. Cap. 2 Fungal disease of the foliage. Pp 48-71.
- Jorgensen, R.A., Cluster, P.D., English, J., Que, Q.D., Napoli, C.A. (1996) Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs antisense constructs and single-copy vs complex T-DNA sequences. *Plant Mol. Biol.* 31: 957–973.

- Kamle, M., Bajpai, A., Chandra, R., Kalim, S. y Kumar, R. (2011) Somatic embryogenesis for crop improvement. *GERF Bulletin Biosciences*, 2 (11): 54-59.
- Kerbach, S., Lorz, H., Becker, D. (2005) Site-specific recombination in *Zea mays*. *Theor. Appl. Genet.* 111: 1608–1616.
- Key, S., Ma, J.K., Drake, P.M.W. (2008) Genetically modified plants and human health. *JR Soc Med*, 101: 290-298.
- Khalil, S.M., Chean, K.T., Pérez, E.A., Gaskill, D.A., Hu, J.S. (2002) Regeneration of banana (*Musa* spp. AAB cv. Dwarf Brazilian) via secondary somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.* 20: 1128-1134.
- Khana, H., Becker, D., Kleidon, J., Dale, J. (2004) Centrifugation assisted *Agrobacterium tumefaciens*- mediated transformation (CAAT) of embryogenic cell suspensions of banana (*Musa* spp. Cavendish AAA and Lady Finger AAB). *Molecular Breeding* 14: 239-252.
- Khatti, A., Nandy, S., Srivastava, V. (2011) Heat-inducible Cre-lox system for marker excision in transgenic rice. *J. Biosci.* 36: 37-42.
- Klimaszewska, K., Rutledge, R.G., Seguin, A. (2005) Genetic transformation of conifers utilizing somatic embryogenesis. *Methods Mol. Biol.* (Clifton, NJ) 286: 151-164.
- Kopertekh, L., Broer, I., Schiemann, J. (2009) Developmentally regulated site-specific marker gene excision in transgenic *B. napus* plants. *Plant Cell Rep.* 28: 1075-1083.
- Kopertekh, L., Schulze, K., Frolov, A., Strack, D., Broer, I., Schiemann, J. (2010) Cre-mediated seed-specific transgene excision in tobacco. *Plant Mol. Biol.* 72: 597-605.
- Kwit, C., Moon, H.S., Warwick, S.I., Stewart, C.N. (2011) Transgene introgression in crop relatives: molecular evidence and mitigation strategies. *Trends Biotechnol.* 29: 284-293
- Leiva-Mora, M. (2006) Mejoramiento genético tradicional y empleo de técnicas biotecnológicas en la búsqueda de resistencia frente a los principales patógenos fúngicos de *Musa* spp. *Biotecnología Vegetal* 6 (3): 131-147.

- Lemaux, P.G. (2009) Genetically engineered plants and foods: a scientist's analysis of the issues (part II). *Annu. Rev. Plant Biol.* 60: 511-559.
- Li, B., Li, N., Duan, X., Wei, A. Yang, A., Zhang, J. (2010) Generation of marker-free transgenic maize with improved salt tolerance using the FLP/*frt* recombination system. *J. Biotechnol.* 145: 206–213.
- Li, Z., Xing, A., Moon, B.P., Burgoyne, S.A., Guida, A.D., Liang, H., Lee, C., Caster, C.S., Barton, J.E., Klein, T.M., Falco, S.C. (2007) A Cre/*loxP*-mediated self-activating gene excision system to produce marker gene free transgenic soybean plants. *Plant Mol Biol* 65:329–341.
- Liu, H.K., Yang, C., Wei, Z.M. (2005b) Heat shock-regulated site-specific excision of extraneous DNA in transgenic plants. *Plant Sci.* 168: 997-1003.
- López, M. (1989) Botánica. En: El plátano. López M (Ed.). Editora Pueblo y Educación. Cuba. Pp. 1-14.
- Luo, K., Duan, H., Zhao, D., Zheng, X., Deng, W., Chen, Y., Stewart, C.N. Jr., McAvoy, R., Jiang, X., Wu, Y., He, A., Pei, Y., Li, Y. (2007) 'GM-gene-deletor': fused *loxP-frt* recognition sequences dramatically improve the efficiency of FLP or CRE recombinase on transgene excision from pollen and seed of tobacco plants. *Plant Biotechnol. J.* 5: 263–274.
- Ma, B.G., Duan, X.Y., Niu, J.X., Ma, C., Hao, Q.N., Zhang, L.X., Zhang, H.P. (2009) Expression of stilbene synthase gene in transgenic tomato using salicylic acid-inducible Cre/*loxP* recombination system with self-excision of selectable marker. *Biotechnol. Lett.* 31: 163 – 169.
- Magaña-Gomez, J.A, de la Barca, A.M. (2009) Risk assessment of genetically modified crops for nutrition and health. *Nutr Rev*, 67: 1-16.
- Mallory-Smith, C., Zapiola, M. (2008) ~~Genetic~~ flow from glyphosate -resistant crops. *Pest Manag. Sci.* 64: 428–440.

- Maluszynski, M., Ahloowalia, B.S. and Sigurbjornsson, B. (1995) Application of *in vivo* and *in vitro* mutation techniques for crop improvement. *Euphytica* 85: 303-315.
- Marín, D., Romero, R., Guzmán, M., Sutton, T. (2003) Black Sigatoka: An increasing threat to banana cultivation. *Plant disease* 87(3): 208-222.
- Marjanac, G., De Paepe, A., Peck, I., Jacobs, A., De Buck, S., Depicker, A. (2008) Evaluation of CRE-mediated excision approaches in *Arabidopsis thaliana*. *Transgenic Res.* 17: 239–250.
- Matsumoto, K., Cunha, N.B., Morais, L.S., Aragão, F.J.L. (2005) Instability of transgenes *in vitro*-maintained banana plants. *Acta Hort.* 738: 529-533.
- Matsumoto, K., Morais, L.S., Vianna, G.R., Aragão, F.J.L. y Rech, E.L. (2002) Genetic transformation of banana embryogenic cells through particle bombardment using a herbicide resistance gene as selectable marker. *Acta Hort. (ISHS)* 575: 61-67
- Matsunaga, E., Sugita, K., Ebinuma, H. (2002) Asexual production of selectable marker-free transgenic woody plants, vegetatively propagated species. *Mol. Breed.* 10: 95–106
- Maximova, S.N., Alemanno, L., Young, A., Ferriere, N., Traore, A., Guiltinan, M.J. (2002) Efficiency, genotypic variability, and cellular origin of primary and secondary somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 38: 252-259.
- May, G., Afza, R., Mason, H., Wiecko, A., Novak, F. y Arntzen, C. (1995) Generation of transgenic banana (*Musa acuminata*) plants via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Bio/Technology* 13: 486-492
- Miki, B., Abdeen, A., Manabe, Y. y MacDonald, P. (2009) Selectable marker genes and unintended changes to the plant transcriptome. *Plant Biotechnology Journal* 7, 211-218.
- Miki, B., McHugo, S. (2004) Selectable marker genes in transgenic plants: Applications, alternatives and biosafety. *J. Biotech.* 107: 193–232.

- Miyoshi, K., Nakata, E., Nagato, Y., Hattori, T. (1999) Differential in situ expression of three ABA-regulated genes of rice, RAB16A, REG2 and OSBZ8, during seed development. *Plant Cell Physiol.* 40: 443-447.
- Mlynárová, L., Conner, A.J., Nap, J.P. (2006) Directed microspore-specific recombination of transgenic alleles to prevent pollen-mediated transmission of transgenes. *Plant Biotechnol. J.* 4: 445-452.
- Mobambo, K. (2002) Estrategias para el manejo integrado de la producción platanera y control de la Sigatoka negra en la República Democrática del Congo. *Enfermedades. Control de la Sigatoka negra. INFOMUSA* 11(1): 3-6.
- Moon, H.S., Abercrombie, L.L., Eda, S., Blanvillain, R., Thomson, J.G., Ow, D., Stewart, C.N. (2011) Transgene excision in pollen using a codon optimized serine resolvase CinH-RS2 site-specific recombination system. *Plant Mol. Biol.* 75: 621-631.
- Moravčíková, J., Vaculková, E., Bauer, M., Libantova, J. (2008) Feasibility of the seed specific cruciferin C promoter in the self excision Cre//loxP strategy focused on generation of marker-free transgenic plants. *Theor Appl Genet*, 117:1325–1334.
- Morpurgo, R., Bruner, H., Grasso, G., Van duren M., Roux, N. and Afza R. (1997) Enigma of banana breeding: A challenge for biotechnology. *Agro-Food-Industry Hi-Tech. Plant Breeding Unit, FAO/IAEA Agriculture and Biotechnology Laboratory. Austria.* Pp. 16-21.
- Mourichon, X., Fullerton, R.A. (1990) Geographical distribution of two species *Mycosphaerella musicola* Leach (*Cercospora musae*) and *M. fijiensis* Morelet (*C. fijiensis*), respectively agents of Sigatoka Disease and Black Leaf Streak Disease in bananas and plantains. *Fruits* 45: 213-218.
- Musalogue. (2001) Grande naine. Cultivated varieties AAA. INIBAP. Pp.66. Namasivayam, P. (2007) Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 90 (1):1-8.

- Natarajan, S., Turna, J. (2007) Excision of selectable marker genes from transgenic crops as a concern for environmental. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87:2547–2554.
- Nichterlein, K. (2000) Workshop on Mutation and *in vitro* culture techniques for the improvement of vegetatively propagated tropical food crops. Curso FAO/IAEA/UCR. Centro de Investigaciones Agronómicas. Universidad de Costa Rica. Pp. 15-23.
- Orel, N., Kyryk, A., Puchta, H. (2003) Different pathways of homologous recombination are used for the repair of double-strand breaks within tandemly arranged sequences in the plant genome. *Plant J.* 35: 604-612.
- Ortiz, R. y Vuylsteke, D. (1996) Recent advances in *Musa* genetics, breeding and biotechnology. *Plnat Breeding Abstr.* 66: 1355-1363.
- Ow, D.W. (2007). GM maize from site-specific recombination technology, what next? *Curr. Opin. Biotechnol.* 18: 115-120.
- Perea, M.D. (1998) Consideraciones biotecnológicas para el mejoramiento de *MUSACEAS*. En: Seminario Internacional sobre Producción de Plátano. Memorias Proceedings. Colombia. Pp. 63-70.
- Pérez, J.P. (1998a) Introducción a la mejora de plantas. En: En Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Pérez, PJ (Edt.) Editora GEO. Pp. 285-295.
- Pérez, J.P. (1998b). Mutagénesis *in vitro*. En: En Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Pérez, PJ (Edt.) Editora GEO. Pp. 299-311.
- Pérez, L.V. (1996) Manual para el manejo integrado de Sigatoka negra (*Micosphaerella finjensis* Morelet) y Sigatoka amarilla (*Micosphaerella musicola* Leach ex Mulder) en banano y plátano. Proyecto TCP/CUB/4454. Control de la Sigatoka negra del banano y del plátano. P. 27.
- Pérez, L.V., Mauri, F., Hernández, A., Abreu, E. y Porras, A. (2002). Epidemiología de la Sigatoka negra (*Micosphaerella finjensis* Morelet) en Cuba. Pronóstico bioclimático de

- los tratamientos en bananos (*Musa acuminata* AAA). Revista Mexicana de Fitopatología 18 (1): 15-26.
- Pérez-Hernández, J.B., Remy, S., Swennen, R., Sági, L. (2006) Banana (*Musa* spp.), in: Wang, K., (ed.), Methods in Molecular Biology, 344: Agrobacterium Protocols, volume 2. Humana Press Inc., Totowa, NJ., U.S.A. pp. 167–175.
- Pérez-Hernández, J.B., Remy, S., Swennen, R., Sági, L. (2006) Banana (*Musa* spp.), in: Wang, K., (ed.), Methods in Molecular Biology, 344: Agrobacterium Protocols, volume 2. Humana Press Inc., Totowa, NJ., U.S.A. pp. 167–175.
- Pino, J.A., Salazar, R. y Valerín, A. (1998) Selección de niveles de resistencia a *Micosphaerella finjiensis* en vitroplantas de *Musa* spp. Mediante fitotoxinas. Libro de resúmenes del III Encuentro latinoamericano de Biotecnología Vegetal. REDBIO 98. Palacio de las Convenciones. Habana. Pp 197-198.
- Qu, L.Q., Takaiwa, F. (2004) Evaluation of tissue specificity and expression strength of rice seed component gene promoters in transgenic rice. Plant Biotech. J. 2: 113–125.
- Ramessar, K., Peremarti, A., Gomez-Galera, S., Naqvi, S., Moralejo, M., Munoz, P., Capell, T. and Christou, P. (2007) Biosafety and risk assessment framework for selectable marker genes in transgenic crop plants: a case of the science not supporting the politics. Transgenic Research 16, 261-280.
- Reed J., Privalle L., Powell M.L., Meghji M., Dawson J., Dunder E., Suttie J., Wenck A., Launis K., Kramer C., Chang Y.F., Hansen G., Wright M. (2001) Phosphomannose isomerase: an efficient selectable marker for plant transformation. In Vitro Cell Dev. Biol. Plant 37: 127–132.
- Remy, S., Thiry, E., Coemans, B., Windelinckx, S., Swennen, R., Sagi, L. (2005) Improved T-DNA vector for tagging plant promoters via high-throughput luciferase screening. BioTechniques 38: 763-770.

- Reyes, M., Kosky, R.G., Bermúdez-Caraballosa. I., Chong-Pérez, B. (2010) Determinación de la concentración mínima letal de glufosinato de amonio en diferentes materiales vegetales de banano cv. 'Grande Naine' (*Musa* AAA). *Biotecnología Vegetal*, 10 (3): 157-168.
- Roux, N., Afza, R., Bruner, H., Morpurgo, R. y van Duren, M. (1994) Complementary Approaches to Cross-Breeding and Mutation Breeding for *Musa* Improvement. En: *The improvement and Testing of Musa: a Global Partnership*. Jones DR (Edt.). Proceedings of the First Global Conference of the International *Musa* Testing Program held at FIHA, Honduras 27-30 de abril. Pp. 213-218.
- Rowe, P. y Rosales, F. (1990) Breeding bananas and plantains with resistance to black Sigatoka. En: *Proceeding of the International Workshop on Sigatoka leaf spots diseases*. R. A. Fullerton y R. H. Stover (Edts.). San José. Costa Rica. Pp. 250-263.
- Rowe, P. y Rosales, F. (1994) *Musa* breeding at FHIA. En: *The Improvement and Testing of Musa: A Global Partnership*. D. Jones (Edts). *Proceeding of the First Global Conference of the International Musa Testing Program Held at FHIA, Honduras 27-30 abril*. Pp. 270-282.
- Russell, S.H., Hoopes, J.L., Odell, J.T. (1992) Directed excision of a transgene from the plant genome. *Mol. Gen. Genet.* 234: 49–59.
- Sagi, L., Remy, S., Panis, B., Swennen, R. y Volckaert, G. (1994) Transient gene expression in electroporated banana (*Musa* spp., cv. Bluggoe, ABB group) protoplasts isolated from regenerable embryogenic cell suspensions. *Plant Cell Rep.* 13: 262–266
- Sandoval, J. y Muller, L. (1999) Anatomía y morfología de la planta de banano (*Musa* AAA). *Corbana* 24 (51): 43-60.
- Sato, S., Xing, A., Ye, X., Schweiger, B., Kinney, A., Graef, G. and Clemente T. (2004) Production of γ -Linolenic Acid and Stearidonic Acid in Seeds of Marker-Free Transgenic Soybean. *Crop Science* 44, 646-652.

- Schell, J., Montagu, M.V., Beuckeleer, M.D., Block, M.D., Depicker, A., Wilde, M.D., Engler, G., Genetello, C., Hernalsteens, J.P., Holsters, M., Seurinck, J., Silva, B., Vliet, F.V. y Villaroel, R. (1979) Interactions and DNA Transfer between *Agrobacterium tumefaciens*, Ti-Plasmid and the Plant Host. *Proceedings of the Royal Society of London* 204 (1155): 251-266.
- Senecoff, J.F., Bruckner, R.C., Cox, M.M. (1985) The FLP recombinase of the yeast 2- μ plasmid: characterization of its recombination site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 7270–7274.
- Shan, X.Y., Shan, B.L., Zhang, J.R. (2006) Production of marker-free transgenic tobacco plants by Flp/*frt* recombination system. *Chinese J. Biotechnol.* 22: 744 – 749.
- Sholi, N.J.Y., Chaurasia, A., Agrawal, A., Sarin, N.B. (2009) ABA enhances plant regeneration of somatic embryos derived from cell suspension cultures of plantain cv. Spambia (*Musa sp.*). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 99: 133-140.
- Siebert, R., Puchta, H. (2002) Efficient repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination between directly repeated sequences in the plant genome. *Plant Cell* 14: 1121-1131.
- Simmonds, N.W. (1962) *The evolution of the bananas*. Ed. John Wiley and Sons, Inc. New York. p 170.
- Soto, M. (1985) *Bananos: Cultivo y comercialización*. Costa Rica.
- Sreekala, C., Wu, L., Gu Wang, D., Tian, D. (2005) Excision of a selectable marker in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) using a chemically regulated CRE/*loxP* system. *Plant Cell Rep.* 24: 86–94.
- Stover, R.H. y Simmonds, N.W. (1987) *Bananas*. 3rd ed. Longman Scientific y Technical, Essex, England.

- Subramanyam, K., Sailaja, K., Srinivasulu, M., Lakshmidevi, K. (2011) Highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of banana cv. Rasthali (AAB) via sonication and vacuum infiltration. *Plant Cell Rep.* 30: 425-436
- Sugita, K., Kasahara, T., Matsunaga, E., Ebinuma, H. (2000) A transformation vector for the production of marker-free transgenic plants containing a single copy transgene at high frequency. *Plant J.* 22: 461– 469
- Sun, J.L., Nakagawa, H., Karita, S., Ohyama, K., Hattori, T. (1996) Rice embryo globulins: amino-terminal amino acid sequences, cDNA cloning and expression. *Plant Cell Physiol.* 37: 612–620.
- Sundar, I.K., Sakthivel, N. (2008) Advances in selectable marker genes for plant transformation. *J. Plant Physiol.* 165: 1698-1716.
- Sweenen, R., Arinaitwe, G., Cammue, B., Francois, I., Panis, B., Sági, L., Santos, E., Strosse, H. y Van-Den-Houwe, I. (2003) Transgenic approaches for resistance to *Mycosphaerella* leaf spot disease in *Musa* spp. En: Jacome, L., Lepoivre, P., Marín, D., Ortiz, R., Romero, R. y Escalant V (eds) *Mycosphaerella* leaf spot disease of bananas, present status and outlook. Proceeding of the Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot disease held in San José, Costa Rica, pp. 209-238. INIBAP Montpellier.
- Thompson, C.J., Movva, N.R., Tizard, R., Cramer, R., Davies, J.E., Lauwereys, M., Botterman, J., (1987) Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO J.* 6: 2519–2523
- Thomson JG, Yau YY, Blanvillain R, Chiniquy D, Thilmony R, Ow DW (2009) ParA resolvase catalyzes site-specific excision of DNA from the *Arabidopsis* genome. *Transgen Res.* 18: 237-248.
- Tisserat, B. (1991) Embryogenesis, Organogenesis and Plant Regeneration. En: *Plant Cell culture a practical approach*. Dixon R.A. (Edt.) IRL PRESS. Washington. Pp. 79-105.

- Tripathi, L., Tripathi, J.N., Tushemereirwe, W.K. (2008) Rapid and efficient production of transgenic East African Highland Banana (*Musa* spp.) using intercalary meristematic tissues. *Afr. J. Biotechnol.* 10: 1438-1445
- van den Eede, G., Aarts, H., Buhk, H.-J., Corthier, G., Flint, H.J., Hammes, W., Jacobsen, B., Midtvedt, T., van der Vossen, J., von Wright, A., Wackernagel, W., Wilcks, A. (2004) The relevance of gene transfer to the safety of food and feed derived from GM plants. *Food Chem. Toxicol.* 42: 1127–1156.
- Van Ex, F., Verweire, D., Claeys, M., Depicker, A., Angenon, G. (2009) Evaluation of seven promoters to achieve germline directed Cre-lox recombination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep.* 28: 1509–1520.
- Verweire, D., Verleyen, K., De Buck, S., Claeys, M., Angenon, G. (2007) Marker-free transgenic plants through genetically programmed auto-excision. *Plant Physiol.* 145: 1220-1231
- Vidal, J.R., Rama, J., Taboada, L., Martin, C., Ibañez, M., Segura, A., González-Benito, M.E. (2009) Improved somatic embryogenesis of grapevine (*Vitis vinifera*) with focus on induction parameters and efficient plant regeneration. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 96: 85-94.
- Vishnevetsky, J., White, T.L., Palmateer, A.J., Flaishman, M., Cohen, Y., Elad, Y., Melcheva, M., Hanania, U., Sahar, N., Dgani, O., Perl, A. (2011) Improved tolerance toward fungal diseases in transgenic Cavendish banana (*Musa* spp. AAA group) cv. Grand Nain. *Transgenic Res.* 20: 61-72.
- Vuylsteke, DR., Swennen, R.L. y De Langhe, E.D. (1996) Performance of Somaclonal Variants of Plantain (*Musa* spp., AAB Group). *Amer. Soc. Hort. Sci.* 121: 42-46.
- Wagiran, A., Ismail, I., Mohd Zain, C.R.C., Abdullah, R. (2010) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the isopentenyltransferase gene in japonica rice suspension cell culture. *Aust. J. Crop Prod.* 4: 421-429.

- Wang, H.H., Huang, X., Qiu, G.H., Huang, X.L., Tan, Z.P. y Huang, W.R., (2000) Optimization of the biological and physical parameters of bombardment-mediated transformation of micro-cross section explants of banana. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni* 39: 87-91
- Wang, W., Hu, Y., Sun, D., Staehelin, C., Dawei, X., Xie, J. (2012) Identification and evaluation of two diagnostic markers linked to *Fusarium* wilt resistance (race 4) in banana (*Musa* spp.) *Mol. Biol. Rep.* 39: 451-459.
- Wang, Y., Chen, B., Hu, Y., Li, J., Lin, Z. (2005) Inducible excision of selectable marker gene from transgenic plants by the *Cre/lox* site-specific recombination system. *Transgenic Res.* 14: 605–614.
- Wohlleben, W., Arnold, W., Broer, I., Hilleman, D., Strauch, E., Puhler, A. (1988) Nucleotide sequence of the phosphinothricin N-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. *Gene* 70: 25–37
- Woo, H.J., Cho, H.S., Lim, S.H., Shin, K.S., Lee, S.M., Lee, K.J., Kim, D.H., Cho, Y.G. (2009) Auto-excision of selectable marker genes from transgenic tobacco via a stress inducible *FLP/frt* site-specific recombination system. *Transgenic Res.* 18: 455 – 465.
- Yoder, J.I., Goldsbrough, A.P. (1994) Transformation systems for generating marker-free transgenic plants. *Bio-Technology* 12: 263-267.
- Yoo, S.Y., Bomblies, K., Yoo, S.K., Yang, J.W., Choi, M.S., Lee, J.S., Weigel, D., Ahn, J.H. (2005) The 35S promoter used in a selectable marker gene of a plant transformation vector affects the expression of the transgene. *Planta* 221: 523-530.
- Yuan, Y., Liu, Y.J., Wang, T. (2004) A new *Cre/lox* system for deletion of selectable marker gene. *Acta Bot. Sin.* 46: 862-866.
- Zambrano, A.Y., Martínez, G., Gutiérrez, Z., Manzanilla, E., Vicente-Villardón, J.L., Demey, J.R. (2007) Marcador RAPD asociado a la resistencia de *Fusarium oxysporum* en *Musa*. *INCI* 32(11):775-779.

- Zhang, W., Subbarao, S., Addae, P., Shen, A., Armstrong, C., Peschke, V., Gilbertson, L. (2003) Cre/lox-mediated marker gene excision in transgenic maize (*Zea mays* L.) plants. *Theor. Appl. Genet.* 107: 1157–1168.
- Zhang, Y., Li, H., Ouyang, B., Lu, Y., Ye, Z. (2006) Chemical-induced autoexcision of selectable markers in elite tomato plants transformed with a gene conferring resistance to lepidopteran insects. *Biotechnol. Lett.* 28: 1247-1253.
- Zheng, X.L., Deng, W., Luo, K.M., Duan, H., Chen, Y.Q., McAvoy, R., Song, S.Q., Pei, Y., Li, Y. (2007) The cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter sequence alters the level and patterns of activity of adjacent tissue- and organ-specific gene promoters. *Plant Cell Rep.* 26: 1195-1203.
- Zuo, J., Niu, Q.W., Moller, S.G., Chua, N.H. (2001) Chemical-regulated, site-specific DNA excision in transgenic plants. *Nat. Biotechnol.* 19: 157–161.