

Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Departamento de Biología



TRABAJO DE DIPLOMA

Título: Obtención de plantas transgénicas de arroz (*Oryza sativa* L., var. J-104) libres del gen marcador de selección, mediante co-transformación biobalística

Autor:

Daylenis Lorenzo Salinas

2014

Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Departamento de Biología



TRABAJO DE DIPLOMA

Título: Obtención de plantas transgénicas de arroz (*Oryza sativa* L., var. J-104) libres del gen marcador de selección, mediante co-transformación biobalística

Autor: Daylenis Lorenzo Salinas

e-mail: dlsalinas@uclv.edu.cu

Tutor: MSc. Maylin Pérez Bernal

Investigador Auxiliar

Departamento de Investigación-Desarrollo

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Sancti-Spíritus

e-mail: maylin.perez@cigb.edu.cu

Santa Clara, 2014

“Año 56 de la Revolución”

AGRADECIMIENTOS

- A mi tutora Maylín Pérez Bernal que confió y me hizo confiar en que no importa qué tan mal o qué tan bien hagamos algo, siempre lo podemos hacer mejor si tenemos certeza de nuestra suficiencia y fe en nuestra capacidad; que durante estos tres años trabajando juntas y durante la preparación de esta tesis me enseñó a apreciar y amar aún más la que de por sí era ya mi vocación, y ha sido un ejemplo para mí de la profesional que quiero llegar a ser.
- A mis padres por convertirme en lo que ahora soy, por ayudarme y apoyarme durante estos cinco años, confiar en mí y decirme de todas las formas: “tú sí puedes”, por enseñarme que no existe camino difícil para llegar a una meta si pones todo tu empeño para alcanzarla, sin ellos no estaría hoy aquí.
- A Rafe y su mamá (Yaneisy) porque siempre estuvieron ahí para mí cada vez que lo necesitaba, apoyándome en todas mis decisiones, haciéndome saber que lo más importante era lo que yo quería ser y que por nada podía dejar mis sueños detrás. Gracias por formar parte de esta etapa tan importante para mí, por darme fuerzas para seguir hasta el final.
- A mi familia.
- A los trabajadores del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Sancti-Spíritus, por hacerme sentir parte de un colectivo en el que tuve el placer de conocer excelentes profesionales y mejores personas.
- A los trabajadores del laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica, especialmente a Magalis, Yeosvany y Carlos, por facilitarme el acceso a los materiales y medios necesarios para esta investigación y por ofrecerme en todo momento su experiencia y sus conocimientos.
- A mis compañeros de estudios, en especial a Amanda, Claudia y Ernesto que me enseñaron que siempre se puede y que no permitieron que me sintiera sola en estos cinco años de esfuerzo y sacrificio.
- A todo aquel que de alguna manera facilitó o apoyó la realización de este trabajo.

RESUMEN

Este trabajo describe un procedimiento de co-transformación biobalística para obtener plantas transgénicas de arroz (var. Jucarito-104) libres del gen marcador de selección. Para el bombardeo se utilizaron callos embriogénicos de 3-4 mm de diámetro, sometidos a un tratamiento previo con manitol 0,8 M. Se emplearon partículas de oro de 1 μm , y una mezcla 4:1 de los plásmidos *pA9uidA* y *p35SHyg*, portadores del gen reportero *uidA* y del *hpt* para la resistencia a higromicina, respectivamente. Se fijó una distancia de disparo de 6 cm entre la malla retenedora y el material vegetal, se utilizaron discos de ruptura de 1100 psi y condiciones de vacío de 27 pulgadas de mercurio. Los callos transformados y los controles no transformados se situaron en medio de cultivo con 50 mg/L de higromicina hasta la regeneración de las plantas, que luego se transfirieron a medio de cultivo semisólido con sales MS y el antibiótico. Se realizó PCR y tinción GUS para verificar las plantas portadoras de ambos genes co-transformados. Seis líneas con esas características fueron trasplantadas a tierra en una casa de cultivo y de ellas se obtuvieron semillas fértiles. La pesquisa de las plantas libres del marcador de selección y el análisis de segregación del *uidA* y *hpt* en la progenie T_1 se realizaron en plantas de cuatro de las seis líneas, germinadas en medio de cultivo semisólido con sales MS, sin higromicina. En todas las líneas evaluadas se encontraron plantas libres del gen marcador de selección y que expresaron de forma estable el *uidA*. Las cuatro posibilidades de integración de estos genes fueron: GUS(+)/*hpt*(+), GUS(-)/*hpt*(+), GUS(+)/*hpt*(-) y GUS(-)/*hpt*(-) y no segregaron de forma mendeliana 9:3:3:1 en ninguna de las líneas en estudio, lo cual podría responder a efectos posicionales o mecanismos genéticos de integración parcial, duplicación o delección inducidos por el propio evento de transformación. Como ha sido una transformación biobalística pudo ocurrir la integración de varias copias de los transgenes, y esto se asocia a fenómenos de silenciamiento génico, pero esto deberá comprobarse en estudios moleculares futuros.

Palabras clave: arroz, biobalística, co-transformación, marcador de selección

ABSTRACT

This work describes a procedure to obtain marker-free transgenic rice plants (cv. Jucarito-104) by biolistic co-transformation method. Embryogenic calli 3-4 mm diameter, treated previously with 0.8 M mannitol, were bombarded with a mixture of DNA, in a proportion 4:1 of two plasmids: *pA9uidA* and *p35SHyg*, which harboring the *uidA* and *hpt* genes, respectively. They were coated with 1µm gold particles. The target distance was 6 cm, rupture disks 1100 psi and a vacuum of 27 inHg was attained. Transformed calli and untransformed controls were cultured on media with 50 mg/L hygromycin, until plant regeneration. Regenerated plants were transferred to MS semisolid medium with 50 mg/L hygromycin. PCR analysis and GUS staining were performed to detect the regenerated plants harboring the two co-transformed genes. Six lines were transplanted to soil in a culture house, and fertile seeds were obtained. The screening of marker free lines and the segregation analysis of *uidA* and *hpt* genes were made in plants of T₁ progeny, which were germinated in MS semisolid medium without hygromycin. In all lines we found marker-free plants expressing stably the GUS. Four integration patterns were possible: GUS(+)/*hpt*(+), GUS(-)/*hpt*(+), GUS(+)/*hpt*(-) and GUS(-)/*hpt*(-), and they not segregated in a mendelian form (9:3:3:1) in the T₁ progeny. It could be due to partial transgene integration, transgene rearrangement or deletion induced by the transformation event. In addition, biolistic method frequently causes the integration of multiple copy number of transgenes, and it has been associated with transgene silencing, but in this case it must be demonstrated by future molecular studies of the evaluated lines.

Key words: biolistic, co-transformation, rice, selection marker

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	8
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1. El arroz.....	11
2.1.1. El cultivo de arroz en Cuba. La variedad Jucarito-104.....	11
2.2. Ingeniería genética de plantas.....	12
2.2.1. Transferencia génica indirecta.....	12
2.2.2. Transferencia génica directa.....	13
2.3. Genes marcadores.....	15
2.3.1. Genes reporteros.....	16
2.3.2. Genes marcadores de selección.....	17
2.4. Métodos para eliminar el gen marcador de selección en plantas transgénicas.....	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
3.1. Preparación del material vegetal.....	23
3.1.1. Desinfección.....	23
3.1.2. Formación de callos.....	23
3.1.3. Explantes para transformar.....	23
3.2. Plásmidos, genes y promotores.....	23
3.3. Transformación biobalística.....	24
3.4. Selección de callos. Ensayo histoquímico GUS.....	25
3.5. Regeneración y selección de vitroplantas.....	25
3.6. Cultivo <i>ex vitro</i> y obtención de semillas.....	25
3.7. Análisis del ADN genómico y tinción GUS en plantas resistentes a higromicina.....	26
3.8. Estudio de segregación GUS/ <i>hpt</i> en plantas de la generación T ₁	26
3.9. Análisis estadístico.....	26
4. RESULTADOS.....	27
4.1. Desinfección del material vegetal.....	27
4.2. Formación de callos y tratamiento osmótico.....	27
4.3. Selección de callos resistentes a higromicina. Ensayo histoquímico GUS.....	27
4.4. Regeneración y selección de vitroplantas.....	28

4.5. Análisis de transformantes y trasplante a tierra.....	29
4.6. Obtención de plantas libres del gen marcador de selección en la generación T ₁	32
4.7. Análisis de segregación GUS/ <i>hpt</i> en la generación T ₁	33
5. DISCUSIÓN.....	35
5.1. Formación de callos y tratamiento osmótico.....	35
5.2. Tinción histoquímica GUS en callos.....	35
5.3. Regeneración y selección de plantas resistentes a higromicina.....	35
5.4. Detección del gen <i>hpt</i> y actividad GUS en las plantas regeneradas.....	36
5.5. Plantas libres del gen marcador de selección en la generación T ₁	37
5.6. Análisis de segregación GUS/ <i>hpt</i> en la generación T ₁	37
6. CONCLUSIONES.....	40
7. RECOMENDACIONES.....	41
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
9. ANEXOS.....	48
9.1. Anexo I. Composición química de la solución Hoagland de fuerza media.....	48
9.2. Anexo II. Plásmido pCAMBIA 1301.....	49

1. INTRODUCCIÓN

El arroz (*Oryza sativa* L.) es una gramínea perteneciente a la familia *Poaceae*, y constituye la base de la dieta alimenticia de la mitad de la población mundial. Además de su valor nutritivo, el arroz tiene gran importancia desde el punto de vista social, ya que sus procedimientos de cultivo y manipulación post-cosecha brindan empleo a casi mil millones de personas de países subdesarrollados (OCDE/FAO, 2013). De esto se desprende la necesidad de que sus sistemas de producción sean altamente eficaces, para lograr el desarrollo económico y la calidad de vida de una gran parte de la población en el planeta. Está proyectado un incremento en el uso mundial del arroz de 469 Mt en 2010-2012 a 551 Mt en 2022 (OCDE/FAO, 2013). Sin embargo, la producción de este cereal está enfrentándose a factores abióticos y bióticos que amenazan sus rendimientos.

La salinización del suelo en los arrozales es uno de los desencadenantes de estrés abiótico, e impone nuevos retos en los cuales tienen que desarrollarse programas de mejora genética, así como la identificación y selección de genotipos con un comportamiento adecuado en estas condiciones desfavorables (Lamz y González, 2013).

Las plagas son factores bióticos que afectan la producción arroceras. Se conocen a nivel mundial cerca de ciento veinte insectos dañinos al arroz, y en Cuba algunos de ellos constituyen problemas fitosanitarios, como el picudo acuático del arroz (*Lissorhoptrus brevirostris* Suffrian). Unido a esto, las variedades cubanas más extendidas sufren notables pérdidas causadas por los hongos *Pyricularia oryzae* y *Sarocladium oryzae*, y para combatirlos se importan y aplican cada año grandes cantidades de fungicidas. El uso continuado de estos productos implica un riesgo ecológico debido a su toxicidad. Las intoxicaciones por plaguicidas son reconocidas por la Organización Mundial de la Salud como un problema de salud pública y se ha estimado que cada año se producen tres millones de intoxicaciones agudas y entre 80 000 a 220 000 defunciones (Nayhua, 2013).

En Cuba, la variedad de arroz Jucarito 104 (J-104) ha tenido gran aceptación por los productores, sin embargo, uno de sus principales inconvenientes es que es muy susceptible a enfermedades fúngicas que provocan serios daños en los rendimientos. Tradicionalmente estas afectaciones son tratadas con agroquímicos sintéticos, pero estos procedimientos podrían ser minimizados con el mejoramiento de la J-

104 mediante la ingeniería genética, una tecnología que supera las limitaciones de la mejora clásica con la introducción de genes hasta ahora no disponibles para los mejoradores de plantas (Petri, 2005), y que podrían conferirle a esta variedad resistencia a hongos fitopatógenos.

En las etapas de transformación por ingeniería genética se utilizan genes marcadores de selección para distinguir las células, tejidos y plantas que han sido transformados. Sin embargo, una vez que la transformación ocurre, la presencia de estos marcadores no es útil ni deseada, porque la mayoría de ellos son genes de origen bacteriano que confieren resistencia a antibióticos o herbicidas.

Esto plantea varias inquietudes con respecto a la liberación al campo de organismos que se encuentren genéticamente modificados (GM). Algunos autores han planteado que la presencia de genes de selección que confieren resistencia a antibióticos en los cultivos GM, puede dar lugar a la transferencia horizontal de estos genes a patógenos del suelo y bacterias gastrointestinales (Netherwood, *et al.* 2004; Kleter *et al.*, 2005). Otros informes indican que los genes que confieren resistencia a los herbicidas pueden ser transferidos a las especies de malezas estrechamente relacionadas a través de la polinización cruzada (Chen *et al.*, 2004; Nielsen y Townsend, 2004). Por tanto, la eliminación de genes marcadores reducirá posibles consecuencias ambientales y conducirá a una mayor aceptación de los cultivos transgénicos y sus productos.

En el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Sancti Spíritus se ha establecido un protocolo para la transformación genética de la variedad cubana de arroz J-104 (Pérez Bernal *et al.*, 2009b), con el objetivo de introducirle genes de importancia agrícola que le confieran resistencia a enfermedades causadas por hongos fitopatógenos. Sin embargo, hasta la fecha no se han obtenido plantas transgénicas libres del gen marcador de selección.

Hipótesis

Si se realiza la co-transformación biobalística de la variedad de arroz J-104 con dos vectores independientes, uno de los cuales contiene un gen marcador de selección, se podrán obtener plantas libres del marcador de selección mediante segregación de los transgenes en la progenie T₁.

Objetivo general

- Obtener plantas transgénicas de arroz (var. J-104) libres del gen marcador de selección, mediante co-transformación biobalística.

Objetivos específicos

- 1- Co-transformar callos de arroz (var. J-104) mediante biobalística, con los genes *hpt*, para la resistencia a higromicina, y *uidA*, que codifica para la enzima β -Glucuronidasa (GUS).
- 2- Detectar las plantas libres del gen marcador de selección en la generación T_1 .
- 3- Comparar la segregación de ambos genes en la generación T_1 , con la proporción mendeliana 9:3:3:1.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 El arroz

El arroz es una monocotiledónea, se clasifica en el género *Oryza* perteneciente a la familia *Poaceae*, y la mayoría de las variedades cultivadas derivan de la especie *Oryza sativa* L. Crece en terrenos muy calurosos y húmedos. Alcanza casi un metro de altura y forma flores perfectas, con seis estambres y un solo pistilo. El fruto, un grano, se dispone en una panícula formada por varias espiguillas que crece en el ápice del tallo, y en su composición media tiene un 8% de sustancias nitrogenadas y poco más del 1% de materia grasa (Angladette, 1969).

El arroz es diploide, $n=12$ cromosomas, su genoma es el menor de las monocotiledóneas conocidas (4,3Mb) y existe una enorme colección de germoplasma (mas de 120 000 accesiones alrededor del mundo), por lo que puede convertirse en organismo modelo en la investigación biológica por su estructura genética (Cheng *et al.*, 2001).

2.1.1 El cultivo del arroz en Cuba. La variedad Jucarito-104

La perspectiva actual y futura de la producción de arroz en Cuba está basada en su incremento paulatino y sostenido, dado el alto nivel de consumo de este alimento por la generalidad del pueblo cubano. Los programas de desarrollo de este cultivo pretenden dotar a los productores de las variedades mejor adaptadas para cada condición específica de cultivo, como por ejemplo riego, secano y salinidad; de bajos requerimientos de insumos, y que sean resistentes a las principales plagas y enfermedades presentes en el país, lo que constituye el pilar fundamental de la agricultura sostenible.

Existe una gran diversidad de variedades tanto en el cultivo popular como en grandes áreas de producción estatal. Variedades nacionales como Amistad-82, Caribe-1 y Jucarito-104, también conocida como J-104, están entre las más sembradas, mientras que en lugares más apartados y remotos todavía se pueden encontrar las llamadas tradicionales, que se caracterizan por tener un porte alto, bajos rendimientos pero de gran calidad del grano (Socorro *et al.*, 2005).

La J-104 es una variedad de ciclo medio, nominada en el año 1981. Tiene una buena capacidad de macollamiento, panículas muy fértiles y es altamente resistente al acame, lo que la hace ser una de las más apreciada por los productores. Su rendimiento agrícola puede superar las 6 toneladas por hectárea, y se obtiene un 50 % de grano blanco entero con un 74,92 % de cristalinidad. Es medianamente resistente a *Tagosodes orizicolus*, pero muy susceptible al Virus de la Hoja Blanca y al hongo *Pyricularia grisea*

Sacc., siendo este último su principal problema fitosanitario, cuya incidencia y severidad puede reducir hasta el 70 % de los rendimientos (Cruz *et al.*, 2009). Esto ha conducido al diseño de varias estrategias de mejoramiento, entre las cuales están el cultivo de anteras, la inducción de mutaciones y la transformación mediante ingeniería genética, para lograr resistencia a enfermedades fúngicas (Pérez Bernal, 2007).

2.2 Ingeniería genética de plantas

La transformación de plantas mediante ingeniería genética posibilita la introducción e integración de ADN foráneo en el genoma y seleccionar eficientemente las células transformadas, permitiendo la regeneración completa de los individuos transformados. El ADN puede ser introducido a la planta de interés de diferentes formas: indirectamente, mediante *Agrobacterium tumefaciens*; o de forma directa, por bombardeo con partículas, microinyección, electroporación y polietilenglicol (Tzfira y Citovsky, 2006).

2.2.1 Transferencia génica indirecta

El primer método de transformación eficaz de plantas se desarrolló a principio de la década de los ochenta, con la utilización del *Agrobacterium tumefaciens*. Esta es una bacteria del suelo, patógena para determinadas plantas, que infecta de forma natural a las zonas de herida de las dicotiledóneas y produce la formación de un tumor en el cuello del tallo conocido como “agalla de la corona” (Valderrama *et al.*, 2005).

Las cepas virulentas de *A. tumefaciens* tienen un gran plásmido con más de 200 kb de longitud, cuyo papel es clave en la inducción del tumor. Durante la infección, un segmento móvil del plásmido, denominado ADN-T, se transfiere al núcleo de la célula vegetal integrándose en el genoma de la planta. El proceso de la transferencia de ADN-T se inicia por la inducción de genes de virulencia bacteriana (*vir*) por los compuestos fenólicos producidos y liberados por las heridas de las plantas, a través de un sistema de transducción de señales celulares. Se ha demostrado que la mayoría de las plantas dicotiledóneas producen tales compuestos fenólicos y por ello se han transformado de forma rutinaria por *A. tumefaciens*. Las monocotiledóneas, que generalmente no producen compuestos Vir, podrían ser transformadas por la adición exógena de tales moléculas, como la acetosiringona (Pratheesh *et al.*, 2012).

La facilidad del procedimiento de transformación por *A. tumefaciens*, la inserción preferencial del ADN-T en regiones potencialmente transcritas y la integración de copia única del transgén en los cromosomas de las plantas, han hecho de este método el idóneo para la transformación genética de las dicotiledóneas (Pratheesh *et al.*, 2012).

El conocimiento básico sobre el mecanismo de transferencia del ADN-T ha permitido además formular modelos de señalización celular, transporte célula a célula, importe nuclear de proteínas y ADN, y mecanismos de integración genómica (Valderrama *et al.*, 2005).

2.2.2 Transferencia génica directa

La expresión de genes foráneos en células vegetales se ha logrado utilizando como método de transfección el polietilenglicol (PEG) y como explante los protoplastos. Este método consiste en mezclar las células y el ADN con PEG, polimerización que actúa como puente molecular e induce procesos de endocitosis introduciendo el ADN al interior de las células. Tiene la ventaja de no requerir equipamiento especializado, pero la frecuencia de transformación y la regeneración de las plantas a partir de los protoplastos no son eficientes (Barampuram y Zhang, 2011).

La microinyección es una técnica de transformación directa que requiere de una pipeta inmovilizadora del protoplasto mientras una aguja fina o micropipeta de vidrio (0,5-10 μm diámetro) introduce el ADN. Para garantizar una manipulación del material vegetal con el menor daño posible, los protoplastos deben cultivarse de 1 a 5 días antes de la microinyección para permitir la regeneración parcial de pared celular. Es un método costoso y requiere de gran habilidad por parte del personal involucrado (Khan, 2010).

Otro método de transferencia génica directa es la electroporación que consiste en aplicar una descarga eléctrica de alto voltaje a una solución de protoplastos o células intactas y ADN, resuspendidos en un tampón. La fuerza iónica del medio permite el paso de la corriente eléctrica que provoca la formación reversible de poros en la membrana celular con el consiguiente intercambio entre el interior y el exterior, lo que permite la entrada del ADN. Con frecuencia se utiliza una corriente de 25 mV con una intensidad de 0,5 mA por 15 minutos. Sin embargo la eficiencia de transformación suele afectarse por otros parámetros como la concentración de ADN o la tolerancia de las células al choque eléctrico (Barampuram y Zhang, 2011).

La técnica más empleada para transformar monocotiledóneas es la biobalística, que es el bombardeo de tejidos, embriones inmaduros o células embriogénicas con microproyectiles cubiertos de ADN a una velocidad suficiente como para atravesar la pared celular sin causar un daño letal a las células. El primer sistema liberador de partículas fue desarrollado en los años 80 por Sanford y colaboradores (Sanford *et al.*, 1987).

El bombardeo consiste en la aceleración de partículas de oro o tungsteno, recubiertas con ADN, mediante un sistema de detonación con pólvora, descarga eléctrica o gases inertes como helio, acelerados a alta presión sobre las células diana con un equipo llamado pistola de partículas o pistola de genes (Figura 1). El alcance de la penetración de las partículas en las células vegetales puede ser controlado variando la intensidad del estallido, alterando la distancia que las partículas han de atravesar para alcanzar la célula o utilizando partículas de diferentes tamaños. Una vez dentro de la célula, el ADN se separa de las partículas y puede integrarse al genoma de las plantas.

De forma convencional, los plásmidos de ADN disueltos en tampón son precipitados sobre la superficie de los microprojectiles; este procedimiento tiene como objetivo aumentar la frecuencia de células transformadas al aumentar la cantidad de plásmido de ADN; no obstante, una elevada cantidad de plásmido puede resultar inhibitoria o aumentar el número de copias del gen foráneo que se insertan (Lowe *et al.*, 2005). Uno de los pasos determinantes en la preparación de las partículas es la adición de espermidina, por su papel protector del ADN de la degradación de las nucleasas celulares. Sivamani *et al.* (2009) demostraron que las protaminas son más eficientes que la espermidina en su acción protectora del ADN, al formar un complejo muy estable de nanopartículas con un efecto preservante a largo plazo. Según Potrykus y Spangenberg (1995) la configuración de los vectores que son utilizados en biolística para introducir genes foráneos a plantas, influye tanto en la integración como en la expresión de dichos genes; de este modo, la transformación resulta más eficaz cuando se usa ADN lineal. Los plásmidos de tamaños superiores a 10 kb, a diferencia de los pequeños, pueden ser fragmentados durante el bombardeo con microprojectiles, produciendo una tasa menor de células transformadas.

El bombardeo con microprojectiles se ha utilizado para transferir ADN exógeno a suspensiones celulares de plantas, cultivos de callos, tejidos meristemáticos, embriones inmaduros y polen, todos ellos obtenidos a partir de un amplio rango de plantas diferentes, incluidas monocotiledóneas y plantas menos susceptibles de la infección por *Agrobacterium* (Lowe *et al.*, 2005). Mediante la biobalística se han obtenido plantas transgénicas de especies de gran interés económico como la soya, el maíz, el arroz, el sorgo, la papaya, la caña de azúcar, el trigo y el espárrago. Además, ha sido el método de elección para transferir ADN a mitocondrias y cloroplastos (Day y Goldschmidt, 2011).

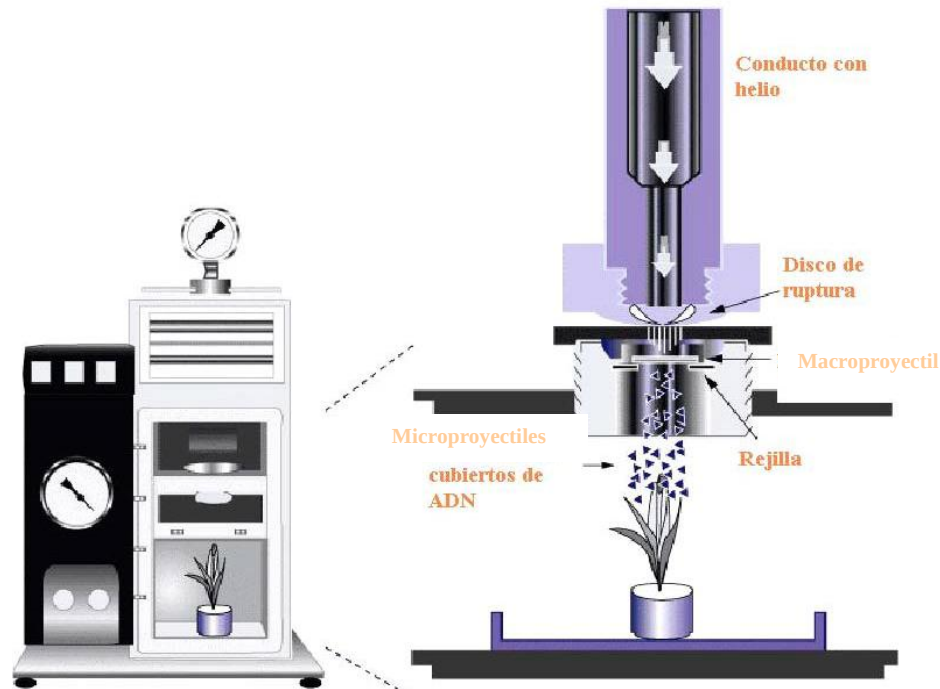


Figura 1. Sistema liberador de partículas PDS-1000/He Biolistic® (Biorad)

Disco de ruptura: Hace que se impulsen las partículas de un metal pesado (oro o tungsteno) como respuesta a un amplio rango de presiones (450 a 2200 psi).

Macroproyectil: Membrana que soporta la mezcla de ADN y partículas (microproyectil).

Rejilla: Malla retenedora del macroproyectil.

Esta metodología de transformación tiene algunos inconvenientes, como el elevado costo del equipamiento que requiere y la inserción multicopia de los transgenes en el genoma huésped. Algunos tejidos oponen una resistencia natural a la penetración de las partículas, dada por cutículas endurecidas, paredes celulares lignificadas o superficies vellosas, y en esos casos la principal limitante del método sería la baja relación entre el total de células sometidas al bombardeo y el número de ellas que logran incorporar de manera permanente la información genética transferida (Kikkert *et al.*, 2005).

2.3 Genes marcadores

Junto con el gen de interés que se quiere introducir en las plantas, es necesario introducir a la par un gen marcador de selección o un gen reportero. En el primer caso se trata generalmente de genes que confieren resistencia a un antibiótico o a un herbicida, de manera que si los tejidos vegetales se desarrollan sobre un medio que contiene uno de estos compuestos letales, proliferarán aquellas células que han sido

transformadas. Los genes reporteros o delatores generan un producto que puede ser detectado visualmente en los tejidos transformados, y frecuentemente puede ser cuantificado por técnicas colorimétricas y fluorimétricas (Hayakawa *et al.*, 2012).

2.3.1 Genes reporteros

Para identificar células transformadas existen genes reporteros fácilmente ensayables, y que codifican para enzimas cuya actividad no se encuentra en la especie en estudio. El más difundido es el gen *gus*, *gusA* o *uidA*, que codifica para la enzima β -Glucuronidasa (GUS), de *Escherichia coli*, una proteína tetramérica de peso molecular de 68,2 kDa, muy estable, tolerante a muchos detergentes y a cambios iónicos del medio, y puede ser ensayada a pH comprendido entre 5,2 y 8,0 (Vitha, 2004).

El ensayo de detección de la β -Glucuronidasa (GUS) propuesto por Jefferson en 1987, es altamente sensible y ofrece la posibilidad de obtener datos cuantitativos (fluorimétricos y espectrofotométricos) y cualitativos (histoquímicos). Los ensayos cuantitativos son útiles para monitorear la actividad de diferentes promotores y la especificidad de la expresión de genes en células, tejidos y órganos. El ensayo histoquímico puede realizarse con el sustrato cromogénico X-Gluc (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido). La reacción transita por un intermediario inestable e incoloro y continúa con una dimerización oxidativa que da lugar al 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro índigo, un producto de color azul e insoluble en agua, que no difunde fuera de los tejidos aún cuando se sometan a fijación. La dimerización es estimulada por el oxígeno atmosférico, y puede optimizarse con una mezcla catalizadora K^+ ferricianuro/ferrocianuro (Vitha, 2004).

El Centro para la Aplicación de la Biología Molecular a la Agricultura Internacional (CAMBIA) desarrolló los vectores pCAMBIA1305.1 y pCAMBIA1305.2 portadores del GUS $Plus^{TM}$, un gen reportero aislado de *Staphylococcus sp.* La enzima para la cual codifica tiene mayor actividad catalítica que la de *E.coli*, y es mucho más estable a altas temperaturas y en presencia de agentes fijadores como formaldehído y glutaraldehído. En el 2002, Kirby y Kavanagh publicaron el gen reportero de una sialidasa sintética (NAN), cuya actividad puede visualizarse simultánea a la de GUS, en un gel de poliacrilamida con metilumbeliferona como sustrato. Esto es de gran utilidad para el estudio en paralelo de dos promotores en una misma planta. Vickers *et al.* (2003) describieron el gen de una xilanasa sintética (sXynA), proteína muy estable que puede unirse al GUS $Plus^{TM}$, para realizar análisis cuantitativos de expresión transitoria en tejidos vegetales, utilizando el sustrato AZCL-xylan.

La proteína verde fluorescente (con siglas en inglés GFP) es también uno de los marcadores visuales más utilizados en la transgénesis. Su descubrimiento y desarrollo a partir del alga *Aquorea victoria* mereció el Premio Nobel de Química en el 2008. La GFP puede utilizarse para la observación directa y en tiempo real de los eventos de transformación sin necesidad de un sustrato exógeno, y puede ser utilizada en análisis cuantitativo como un indicador de la expresión génica. Hasta la fecha la selección visual utilizando GFP ha sido exitosa en varias plantas. Sin embargo, para ser usada como único sistema de selección se requiere un protocolo de transformación altamente eficiente, que permita separar con precisión las células transformadas de la mayoría no transformadas (Hraska *et al.*, 2006).

2.3.2 Genes marcadores de selección

La eficiencia que se logra durante la transformación genética vegetal es baja; solamente unas pocas células son transformadas y la mayoría permanece sin transformarse. Para seleccionar las células transformadas en etapas tempranas del proceso se utilizan agentes de selección, que eliminan las células no transformadas y dejan solamente las transformadas. Los agentes de selección más utilizados han sido antibióticos o herbicidas, cuya acción es inactivada o bloqueada en las células portadoras del gen de resistencia (Yau y Stewart, 2013).

Los genes marcadores de selección más conocidos son el *nptII* y *hpt*, originalmente derivados de *Escherichia coli*, para la resistencia a los antibióticos kanamicina e higromicina, respectivamente; y el *bar*, aislado de *Streptomyces higroscopicus*, para la resistencia a glufosinato de amonio, un herbicida registrado en más de 80 países bajo diferentes nombres tales como: BASTA®, Liberty®, Finale® y Rely® (Reyes *et al.*, 2010)

El gen *nptII* codifica para la enzima neomicina fosfotransferasa; y el *hpt*, denominado también *hph* o *aphIV*, codifica para la higromicina fosfotransferasa, proteína encargada de detoxificar al antibiótico higromicina en las células resistentes, mediante una reacción de fosforilación. La higromicina ha sido un eficiente agente de selección en muchas especies y variedades, por su función inhibitoria de los procesos de transcripción y traducción en las células (Tuteja *et al.*, 2012).

El gen *bar* confiere resistencia al herbicida a través de un sistema de detoxificación. La enzima fosfinotricina acetil transferasa (PAT), codificada por este gen convierte, el glufosinato de amonio en N-acetil glufosinato que es un compuesto no tóxico para la planta. Las células no resistentes a herbicidas mueren por acumulación de amonio (Reyes *et al.*, 2010).

La concentración letal mínima del agente de selección debe determinarse para cada especie y variedad antes realizar cualquier paso de transformación genética, y ha de ser suficiente como para que solamente sobrevivan a ella, durante el proceso de selección, aquellas células que han sido transformadas con el gen que exprese la proteína detoxificadora. Aún así pueden existir escapes no transformados, en dependencia de la fortaleza del agente selectivo, del tipo de explante y la rigurosidad de su selección (Pérez-Bernal, 2007). Pipatpanukul *et al.* (2004) sugirieron el empleo de dos antibióticos de selección a la vez, la higromicina y la kanamicina, para lograr arroz transgénico de la variedad indica RD6. Para la resistencia a kanamicina se emplea el gen *nptII*; este antibiótico, al igual que la higromicina, es un aminoglucósido que inhibe la transcripción y traducción en las células no resistentes.

2.4 Métodos para eliminar el gen marcador de selección en las plantas transgénicas

Las aprobaciones para la comercialización de cultivos genéticamente modificados, que contienen marcadores de resistencia a antibióticos o herbicidas, han dado lugar a preocupaciones por el riesgo de que los genes de resistencia a los antibióticos se extiendan a microbios anteriormente sensibles y que, por tanto, les hagan resistentes a los antibióticos utilizados (Netherwood, *et al.*, 2004; Kleter *et al.*, 2005); o que ocurra la transferencia horizontal de genes de resistencia a herbicidas que den lugar a “supermalezas” (Chen *et al.*, 2004; Nielsen y Townsend, 2004).

Como consecuencia, ha sido conveniente retirar poco a poco los cultivos que contengan marcadores de resistencia antibiótica, y poner en práctica métodos para eliminar los marcadores de selección como un paso adicional en los protocolos de transformación genética.

Existen cuatro alternativas para prescindir del gen marcador de selección:

- a) No utilizar el marcador de selección durante la transformación genética.

Teóricamente puede ser posible identificar por métodos moleculares las células portadoras del transgén, pero esto requiere de un método de transformación altamente eficiente que garantice la obtención de una mayoría de individuos transformados, además de un protocolo eficaz para la pesquisa del transgén (Aziz y Machray, 2003).

- b) Usar genes marcadores que no sean potencialmente dañinos al entorno.

Son los denominados genes de selección positiva, llamados así porque permiten la proliferación del tejido transformado e inhiben la del tejido no transformado. Una de las estrategias más interesantes de selección positiva se basa en la utilización de las fuentes de carbono, para las cuales se han usado genes de origen

bacteriano que permiten la modificación de manosa o xilosa, monosacáridos que no pueden ser directamente utilizados por las plantas (Puchta, 2003). Como gen de selección positiva se utiliza el gen *man* de la fosfomanosa isomerasa de *Escherichia coli*, enzima que está ausente en muchas especies vegetales. Se utiliza la manosa como agente de selección, que no es tóxica para las plantas. Sin embargo, las plantas la convierten en manosa-6-fosfato que inhibe la glicólisis e impide su crecimiento. Las plantas transgénicas que dispongan de fosfomanosa isomerasa convierten la manosa-6-fosfato en fructosa-6-fosfato que es un azúcar que pueden metabolizar las plantas. Se seleccionan únicamente aquellas plantas capaces de desarrollarse en presencia de manosa.

La manosa es una hexosa que cumple todos los requerimientos para ser un buen agente de selección: (a) es soluble en los medios de cultivo, (b) absorbido por las células de las plantas, (c) barato, (d) fácilmente disponible en el mercado y (e) seguro (Tuteja *et al.*, 2012).

c) Co-transformar con dos transgenes independientes: un gen de interés y un marcador de selección, y analizar la segregación de ambos a través de las generaciones sucesivas.

Este es un método muy utilizado, y supone la transformación con la inserción de dos plásmidos en diferentes *loci* del genoma nuclear (Tuteja *et al.*, 2012). Un plásmido contiene el marcador de selección y otro el gen de interés. Existen tres alternativas para aplicar el sistema de co-transformación: (i) utilizar dos vectores diferentes, que pueden incorporarse a las células por biobalística o mediante cepas diferentes de *Agrobacterium tumefaciens* (Kumar *et al.*, 2010); (ii) dos vectores diferentes en la misma célula de *Agrobacterium tumefaciens* (Sripriya *et al.*, 2008); (iii) dos ADNs-T en un mismo vector binario (Miller *et al.*, 2002).

La base de esta estrategia consiste en que, de producirse la co-transformación, ambos transgenes se insertarán en diferentes regiones del genoma en forma no ligada, por lo cual deberá analizarse su segregación en la progenie de la planta transgénica. Para ello se realiza una pesquisa de aquellos individuos que no segregaron el gen marcador de selección y sí el gen de interés. Este análisis discriminatorio constituye la desventaja principal del método, porque puede ser engorroso o extenso (Tuteja *et al.*, 2012)

d) Escisión del marcador de selección por recombinación sitio-específica, transposición o recombinación homóloga.

La recombinación sitio-específica puede llevarse a cabo a través del sistema Cre/*lox*.

La enzima Cre es una recombinasa monomérica y asimétrica, de la familia de las integrasas, cuyo nombre proviene de “cyclization recombination”, tiene un tamaño de 38 kDA y deriva del bacteriófago P1. La importancia de esta enzima radica en su capacidad para reconocer unas regiones específicas del ADN, llamadas regiones *lox* o *loci* de recombinación, y cataliza una recombinación entre dos regiones *lox*. Esta recombinación puede ser de dos maneras dependiendo de si los *loci* se encuentran orientados en la misma dirección o están inversamente orientados. Si las regiones *lox* se encuentran orientadas en la misma dirección, la acción que lleva a cabo la recombinasa es la supresión del fragmento de ADN que se encuentra entre ambos *loci*. En cambio, si las regiones *lox* se encuentran orientadas inversamente, la recombinación resultante no es la escisión del fragmento sino que el fragmento se conserva pero se invierte su secuencia. La cualidad más sobresaliente de este sistema es la capacidad de inactivar la función de un gen tan solo en aquellas células del organismo que expresen la recombinasa Cre (López, 2011).

El sistema Cre/*lox* es útil para la eliminación del gen marcador de selección en las plantas transgénicas. La idea es sencilla: al insertar el gen marcador en el ADN este gen iría flanqueado por dos regiones *lox* orientadas en la misma dirección. Después de haber logrado las plantas transgénicas, la recombinasa Cre reconocería las dos secuencias *lox* y suprimiría el gen marcador de selección situado entre ambas (Tuteja *et al.*, 2012).

Existen varios informes sobre la eliminación del marcador en el arroz con el sistema de recombinación sitio-específica Cre/*lox*. Hoa *et al.* (2002) informó la funcionalidad y expresión del sistema siguiendo el enfoque de cruzamiento. El mismo criterio fue seguido por Moore y Srivastava (2006), salvo que mantuvieron el gen *gusA* junto con el gen *hpt* dentro de los sitios *lox*. En ambos casos se necesitó mucho tiempo para generar plantas transgénicas libres de marcadores.

Se han desarrollado también sistemas Cre/*lox* controlados por promotores inducibles. Lin *et al.* (2008) reportaron el uso del Cre/*lox* en la transformación genética del arroz, mediante inducción química con Bentazon, un herbicida usado para el control de malezas en cultivos importantes como maíz, trigo, algodón, soya y arroz. Ma *et al.* (2009) lograron plantas transgénicas de tomate libres del marcador de selección, mediante el Cre/*lox* inducible por ácido salicílico. A través de este sistema los autores lograron un 41 % de plantas libres del gen marcador *nptII* en la progenie T₁.

En el 2011, Khattri *et al.* reportaron el uso de un promotor de soya inducible por calor para controlar la expresión de la recombinasa Cre, y lograr plantas de arroz transgénicas y libres del marcador *nptII*. En banano cv. Grande Naine (*Musa AAA*) también se ha logrado escindir el gen marcador de selección con el

uso del sistema de recombinación Cre/lox guiado por promotores inducibles por golpe térmico (Chong-Pérez *et al.*, 2011).

Además de la recombinación específica de sitio, pueden ser usados elementos transponibles para obtener plantas transgénicas libres del gen marcador de selección, proceso conocido como transposición, el cual involucra un segmento corto de ADN que se mueve de un lugar a otro del mismo o diferente cromosoma (Yau y Stewart, 2013). Con esta estrategia se conecta lo mismo el transgén que el marcador de selección con la secuencia transponible, de forma tal que las dos entidades puedan ser separadas una de la otra en una reacción controlada después de la transformación y la selección. Los marcadores están posicionados en un elemento móvil, los cuales se pierden luego de la transposición (Gorbunova y Levy, 2000). Otra posibilidad para la disociación del marcador y del gen de interés consiste en la reubicación de este gen, el cual debe situarse separado del lugar que ocupa el transgén original.

La recombinación homóloga es otro método también usado para la eliminación del gen marcador de selección. Es este un proceso bastante claro en los sistemas biológicos: ocurre entre dos moléculas de ADN homólogas, constituye una fuente de variabilidad genética e intercambio de segmentos. La supresión mediante la recombinación homóloga de secuencias posicionadas entre repeticiones directas en el genoma ocurre a bajas frecuencias en células somáticas. Un largo período de recombinación homóloga no se considera viable para llevar a cabo la eliminación del gen marcador (Puchta, 2003).

Numerosos científicos a nivel mundial han encauzado sus esfuerzos para lograr plantas transgénicas de arroz libres de marcadores de selección. En la Tabla I se resumen los principales resultados de estos estudios.

Tabla I. Desarrollo de plantas transgénicas de arroz libres del gen marcador de selección.

Método	Gen marcador	Referencia
Co-transformación	<i>hpt</i> y <i>nptII</i>	Komari <i>et al.</i> (1996)
Selección positiva	<i>pmi</i>	Lucca <i>et al.</i> (2001)
Sistema transposón Ac-Ds	<i>gfp</i> y <i>hpt</i>	Cotsaftis <i>et al.</i> (2002)
Co-transformación	<i>hpt</i>	Tu <i>et al.</i> (2003)
Co-transformación 2 sistemas ADN-T	<i>hpt</i> y <i>gfp</i>	Breitler <i>et al.</i> (2004)

Co-transformación	Phytoene-sintasa (<i>psy</i>) y phytoene-desaturasa (<i>crtl</i>)	Parkhi <i>et al.</i> (2005)
Selección positiva	Gen acetolactato sintasa de arroz (mutado) y gen <i>uidA</i>	Osakabe <i>et al.</i> (2005)
<i>Cre/loxP</i> sitio-específica	<i>hpt</i> y <i>gfp</i>	Sreekala <i>et al.</i> (2005)
Co-transformación 2 sistemas ADN-T	<i>hpt</i>	Yu <i>et al.</i> (2006)
Co-transformación	<i>bar</i>	Zhao <i>et al.</i> (2007)
Co-transformación	<i>hpt</i>	Li <i>et al.</i> (2007)
Vector binario sin marcador	OsDREB2A y AtSOS1 (sin marcador)	Zhu y Wu (2008)
Co-transformación	<i>hpt</i> y <i>uidA</i>	Sripriya <i>et al.</i> (2008)
Sistema <i>Cre/loxP</i>	<i>OsMADS45</i> y <i>uidA</i>	Bai <i>et al.</i> (2008)
Co-transformación	<i>hpt</i>	Qi <i>et al.</i> (2009)
Co-transformación	<i>hpt</i>	Yu <i>et al.</i> (2009)
Vectores binarios ADN-T idénticos	<i>hpt</i>	Xia <i>et al.</i> (2009)
Recombinación sitio-específica <i>Cre/lox</i>	<i>hpt</i>	Sengupta <i>et al.</i> (2010)
Co-bombardeo	<i>hpt</i>	Kumar <i>et al.</i> (2010)
Co-transformación	<i>uidA</i> y <i>hpt</i>	Rao <i>et al.</i> (2011)
Recombinación sitio-específica <i>Cre/lox</i>	<i>hpt</i> , <i>uidA</i> y <i>npt</i>	Akbudak y Srivastava (2011)
<i>Cre/lox</i> sitio-específica inducible por calor.	<i>npt</i> y <i>uidA</i>	Khattari <i>et al.</i> (2011)

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Preparación del material vegetal

Se utilizaron semillas de arroz índica, de la variedad Jucarito-104 (J-104), obtenidas en la Estación Experimental “Sur del Jíbaro”, de La Sierpe, Sancti-Spíritus, Cuba; las cuales fueron descascaradas manualmente.

3.1.1 Desinfección

Para la desinfección de semillas, se hizo un lavado inicial con agua destilada, a seguidas se trataron con etanol al 70 % durante 5 minutos y después con hipoclorito de sodio al 2,5 % durante 25 minutos; por último se lavaron 3 veces con agua destilada estéril y se secaron sobre papel absorbente en un flujo laminar horizontal.

3.1.2 Formación de callos

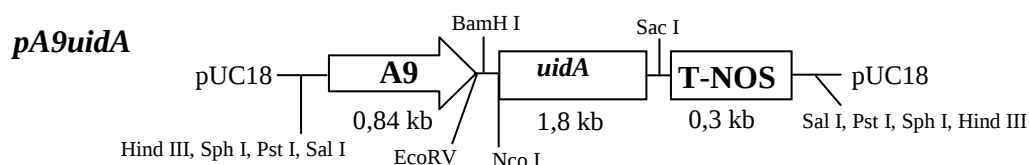
Para la formación de callos embriogénicos a partir de semillas, se utilizó el medio de cultivo N6-2, compuesto por las sales y vitaminas del N6 (Chu *et al.*, 1975), 3% de sacarosa, 1 g/L de hidrolizado de caseína, 500 mg/L de prolina, 500 mg/L de glutamina, 2,5 mg/L de 2,4-D y 3 g/L de fitagel. La incubación de las semillas se llevó a cabo en la oscuridad a 28°C durante 21 días.

3.1.3 Explantes para transformar

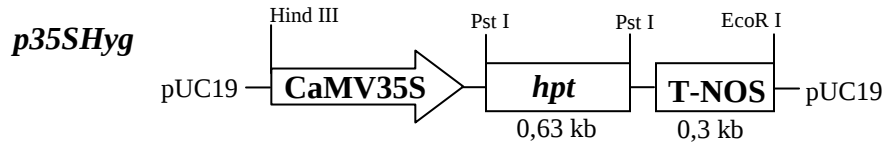
Se utilizaron los callos embriogénicos inducidos a partir de semillas. Se seleccionaron aquellos de tamaño uniforme, aproximadamente de 3-4 mm de diámetro, con apariencia nodular y de color amarillo brillante.

3.2 Plásmidos, genes y promotores

Se utilizaron los plásmidos *pA9uidA* y *p35SHyg*. El primero de ellos con el gen *uidA*, que codifica para la enzima β -Glucuronidasa (GUS), bajo el promotor constitutivo quimérico A9 conformado por el primer exón/ intrón/ exón de la actina-1 del arroz, el enhancer de la octopina sintetasa de *Agrobacterium tumefaciens*, y una versión de la región activa del promotor CaMV35S del virus del mosaico de la coliflor.



El *p35SHyg* fue derivado del vector pUC19, en el que se clonó el gen *hpt* que codifica para la higromicina fosfotransferasa, bajo el control del promotor CaMV35S del virus del mosaico de la coliflor, y la región 3' no codificante de la nopalina sintasa (NOS) de *Agrobacterium tumefaciens*.



3.3 Transformación biobalística

La co-transformación biobalística se llevó a cabo con una proporción 4:1 de los plásmidos *pA9uidA* y *p35SHyg*, respectivamente.

Se esterilizaron 60 mg de partículas de oro (1,0 μm de diámetro) con sucesivos lavados de etanol durante 15 minutos y finalmente fueron resuspendidos en 1,0 mL de agua destilada estéril. A 37 μL de esta solución se añadió la mezcla de ADN plasmídicos, 50 μL de cloruro de calcio 2,5 M y 20 μL de espermidina 0,1 M. La mezcla se agitó durante 30 segundos en un vortex. Se incubó en hielo 10 minutos, y se centrifugó a 1500 xg durante 20 segundos, eliminando el sobrenadante y añadiendo 100 μL de etanol absoluto.

La mezcla de ADN-oro en etanol se sometió a tratamiento de ultrasonido en un baño Ultrasons (Selecta, España) durante 15 segundos para evitar la agregación de las partículas, e inmediatamente se dispensaron 7,5 μL de la mezcla en cada macroproyectil.

Para el bombardeo se utilizó una pistola de genes modelo PDS-1000/He DuPont Biolistics (BIORAD). Se fijó una distancia de 6,0 cm desde la malla retenedora a la muestra de callos, con discos de ruptura de 1100 psi y las condiciones de vacío a 27 pulgadas de mercurio.

Los callos embriogénicos se colocaron 4 horas antes del bombardeo en placas Petri con medio de cultivo N6-2 con manitol 0,8 M. Después del bombardeo los callos fueron mantenidos durante 16 horas en el mismo medio con manitol. Posteriormente fueron transferidos a medio de cultivo N6-2 con 50 mg/L de higromicina, y permanecieron en la oscuridad a 28°C. Se dispuso además de un grupo de callos como control no transformado, que se distribuyó en dos partes: una para control positivo en medio de cultivo N6-2 sin higromicina, y otra para control negativo, cultivado en presencia del antibiótico.

3.4 Selección de callos. Ensayo histoquímico GUS

Los callos fueron seleccionados durante dos semanas en medio de cultivo N6-2 con higromicina 50 mg/L. La selección se realizó en dos subcultivos de 7 días cada uno, con un refrescamiento del medio de cultivo al concluir el primero.

Durante la etapa de selección de los callos se tomaron muestras de estos a las 72 horas y dos semanas después del bombardeo, para realizar ensayos histoquímicos GUS según el procedimiento descrito por Jefferson en 1987.

3.5 Regeneración y selección de vitroplantas

Los callos resistentes a higromicina se incubaron en el medio de regeneración, compuesto por las sales y las vitaminas del MS (Murashige y Skoog, 1962), 3% de maltosa, 1,0 mg/L de ácido naftalenacético, 0,5 mg/L de 6-bencilaminopurina, 3,0 mg/L de kinetina y fitagel a 4,5 g/L. El cultivo de los callos se realizó en placas Petri, a 27 ± 1 °C, bajo un régimen de fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, en un fitotrón (WiseCube, Korea).

Las plantas resistentes se separaron cuidadosamente de los callos y se cultivaron durante cinco días en frascos de vidrio con medio de cultivo semisólido con sales MS (Murashige y Skoog, 1962), 30 g/L de sacarosa y 3 g/L de fitagel.

3.6 Cultivo *ex vitro* y obtención de semillas

Las plantas se extrajeron del medio de cultivo con una altura aproximada de 10 cm, se lavaron las raíces y se colocaron tres días en tubos de ensayo con solución Hoagland de fuerza media (Anexo I), a 27 ± 1 °C, con fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad.

Se transfirieron las plantas a macetas con suelo arcilloso, previamente fertilizado con la fórmula completa Nitrógeno-Fósforo-Potasio, y se llevaron a una casa de cultivo con condiciones naturales y protegida con malla antipájaros. Se garantizó el riego diario de las plantas hasta la recogida de las semillas. Al concluir la cosecha los restos de las plantas fueron cremados.

3.7 Análisis del ADN genómico y tinción GUS en plantas resistentes a higromicina

El ADN total fue aislado a partir de hojas de plantas resistentes a higromicina y del control no transformado (control negativo), siguiendo el método reportado por Potrykus y Spangenberg (1995). Para

los ensayos de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) se utilizó 0,5 µg de ADN de cada muestra. Como control positivo se empleó el vector pCAMBIA1301 (Anexo II).

Las muestras fueron sometidas a PCR para amplificar el gen *hpt*. Se utilizó un termociclador Eppendorf, con el programa siguiente: 3 min a 95°C, [1 min a 93°C, 1 min a 55°C, 1 min a 72°C] [repetido en 35 ciclos] y 3 min a 72°C. La mezcla de reacción (50 µL de volumen total) consistió en: cloruro de magnesio 2,5 mM, desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs) 0,2 mM, 3U de Taq ADN Polimerasa (HeberZima). Se utilizaron los oligonucleótidos siguientes:

hpt sentido: 5'-CTGCCTGAAACCGAACTGC -3' (0,2 µM)

hpt antisentido: 5'-CTTCTGCGGGCGATTTGTG -3' (0,2 µM)

El resultado de la reacción se chequeó mediante una electroforesis en gel de agarosa 0,8 % (p/v), con bromuro de etidio 0,5 mg/L, incluyendo un marcador de peso molecular para ADN (Lambda HindIII), los controles positivo y negativo y las plantas en estudio. Las bandas se observaron en un transiluminador (FotoDyne, USA). La banda correspondiente a la amplificación del *hpt* debe observarse a una talla de 0,63 kb.

Para evaluar la expresión de la β-Glucuronidasa en los callos, fragmentos de hojas, de tallos y raíces se realizó la tinción histoquímica según el procedimiento descrito por Jefferson (1987) en muestras escogidas al azar.

3.8 Estudio de segregación de GUS/*hpt* en plantas de la generación T₁

Se escogieron al azar 50 semillas de cuatro líneas transgénicas y de un control no transformado, y se esterilizaron según lo descrito en el acápite 1.1. Las semillas estériles se sembraron en frascos de vidrio transparente con medio MS (Murashige y Skoog, 1962), sacarosa 30 g/L y fitagel 3,0 g/L, y se cultivaron bajo el régimen de fotoperíodo explicado en el acápite 3.5.

A las plantas que germinaron se les tomaron muestras de hojas para aislar el ADN genómico y realizar PCR (acápites 3.7) con el objetivo de analizar la segregación del gen *hpt*. Simultáneamente se realizó el ensayo histoquímico GUS (Jefferson, 1987) en hojas, tallos y raíces de estas plantas.

3.9 Análisis estadístico

Para analizar la segregación de los genes *hpt* y *uidA* en líneas de la generación T₁ se aplicó una prueba binomial de bondad de ajuste, con un nivel de significación $\alpha = 0,05$. Para el procesamiento de los datos se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 11.5 para Sistema Operativo Windows.

4. RESULTADOS

4.1 Desinfección del material vegetal

El proceso de desinfección de las semillas fue eficiente, pues solo el 5 % de ellas se contaminó, mayormente con hongos, y el resto mantuvo su viabilidad y capacidad de formación de callo.

4.2 Formación de callos y tratamiento osmótico

En las semillas se observó engrosamiento del mesocótilo y de la zona radicular, ablandamiento total del endospermo al cabo de los 4 días en el medio de cultivo y se detectó la formación de callos en la región correspondiente al escutelo del embrión cigótico. Las estructuras proembriogénicas de estos callos tenían una apariencia nodular, friable y de color amarillo brillante, y se localizaron además algunos embriones en etapa globular, con su forma característica, coloración blanquecina y translúcida. Las masas no embriogénicas se caracterizaron por su apariencia opaca y seca y se encontraron en menor proporción que las proembriogénicas.

Los callos embriogénicos de 3-4 mm de diámetro que se seleccionaron para la transformación permanecieron 4 h antes del bombardeo bajo el tratamiento osmótico en medio de cultivo N6-2 con manitol 0,8 M. Después del bombardeo los callos fueron mantenidos durante 16 h en las mismas condiciones con manitol, y no se observaron en ellos cambios en su morfología externa ni en su coloración.

4.3 Selección de callos resistentes a higromicina. Ensayo histoquímico GUS

Después del tratamiento osmótico, los callos bombardeados se sometieron a las 2 semanas de selección con 50 mg/L de higromicina. La selección se realizó en dos subcultivos de 7 días cada uno, para refrescar el medio de cultivo, renovar los nutrientes y eliminar el material necrótico.

Concluido el tiempo de selección, los callos del control no transformado cultivados sin higromicina no modificaron su color, consistencia, ni ritmo de crecimiento (Figura 2A); mientras que la mayoría de los que se colocaron en el medio de selección con higromicina cambiaron de color amarillo a pardo oscuro y sufrieron necrosis. Un pequeño grupo de estos callos no transformados se mantuvo sin cambios de coloración, pero sin proliferación de masas pro-embriogénicas (Figura 2B).

En los callos resistentes se observaron conglomerados pro-embriogénicos y se encontraron algunos embriones globulares, que constituyeron sectores de normal crecimiento capaces de desarrollarse en

presencia del agente de selección (Figura 2C). A las 72 horas después del bombardeo, el patrón de tinción GUS en los callos transformados se visualizó en forma de pequeños puntos azules aislados (Figura 2D).

Luego de dos semanas este patrón cambió, y se observaron grandes áreas teñidas de azul en la mayoría de los callos sometidos al ensayo (Figura 2E).

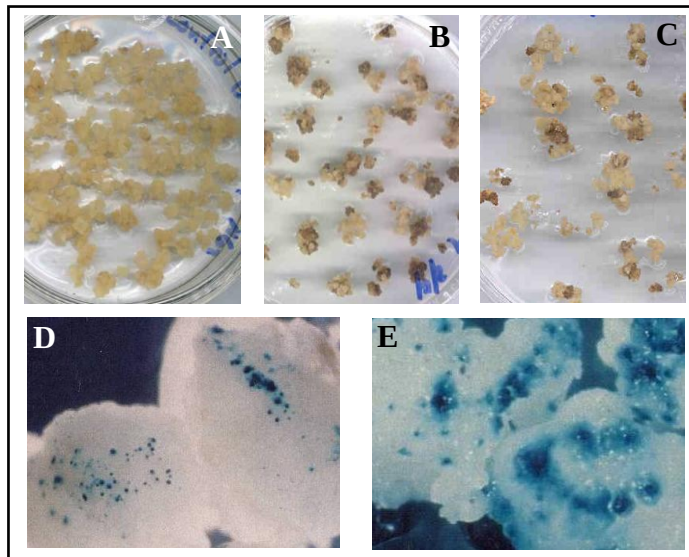


Figura 2. Callos de arroz (*Oryza sativa*, L) durante la etapa de selección en medio de cultivo semisólido con 50 mg/L de higromicina **(A)** Control sin higromicina **(B)** Control con higromicina **(C)** Callos transformados creciendo sobre higromicina. Resultados del ensayo histoquímico GUS a los **(D)** 3 días y **(E)** 15 días.

4.4 Regeneración y selección de vitroplantas

La regeneración de plantas ocurrió en el 100 % de los callos del control no transformado cultivado sin higromicina (Figura 3A), lo que confirmó la efectividad de este medio de cultivo. Los callos del control no transformado cultivados con higromicina retrasaron su crecimiento, cambiaron de color amarillo a pardo oscuro, no regeneraron plantas, y finalmente murieron, como era de esperar (Figura 3B).

En los callos resistentes a higromicina regeneraron brotes bipolares, típicos de la germinación de embriones somáticos. Se observaron algunos callos no resistentes al antibiótico, que fueron escapes de la

etapa de selección anterior (Figura 3C). La eficiencia de regeneración fue alta: regeneraron brotes del 100% de los callos resistentes, con una frecuencia aproximada de 3 brotes por callo.

En las plantas regeneradas que se transfirieron a medio de cultivo semisólido MS (Murashige y Skoog, 1962) con 50 mg/L de higromicina se observó la elongación de tallos y hojas, y aumento en el número y longitud de las raíces (Figura 5A). Del total de plantas regeneradas que pasaron a este medio de cultivo, el 15 % no sobrevivió al agente de selección.

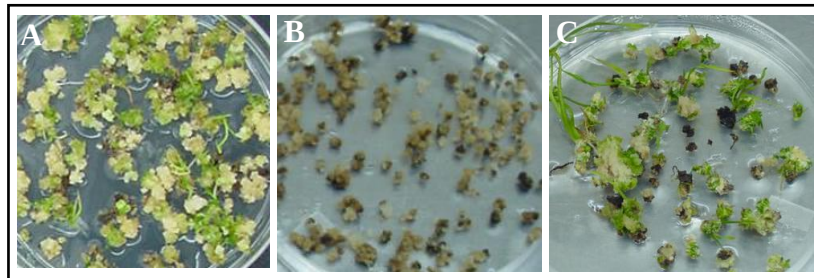


Figura 3. Callos de arroz (*Oryza sativa*, L) durante la etapa de selección de regenerantes en medio de cultivo semisólido con 50 mg/L de higromicina. **(A)** Control sin higromicina **(B)** Control con higromicina **(C)** Callos transformados regenerando sobre higromicina.

4.5 Análisis de transformantes y trasplante a tierra

El análisis por PCR permitió comprobar que todas las plantas resistentes a higromicina eran portadoras del gen *hpt*. En el gel de agarosa se observó la banda de 0,63 kb correspondiente con la talla esperada para el *hpt*, y que coincidió con el control positivo utilizado (Figuras 4A y 4B). De estas plantas se tomaron fragmentos de hojas, tallos y raíces, que se sometieron a tinciones histoquímicas GUS. El 66,6 % de ellas resultaron negativas a este ensayo. Solamente en seis plantas se desarrolló el producto azul de la reacción, que permitió corroborar la expresión de la β -Glucuronidasa (Figura 4C).

En los análisis simultáneos por PCR y GUS a las plantas regeneradas (transformantes primarios) se comprobó que en seis de las dieciocho plantas evaluadas ocurrieron eventos de integración de los genes *uidA* y *hpt*. El resto de las plantas fue GUS(-)/*hpt*(+) (Tabla II).

Tabla II. Resumen del análisis simultáneo por PCR (para amplificar el gen *hpt*) y por tinción histoquímica GUS a plantas resistentes a higromicina.

Planta T ₀	<i>hpt</i>	GUS	Planta T ₀	<i>hpt</i>	GUS
A9-1	+	-	A9-10	+	+
A9-2	+	-	A9-11	+	-
A9-3	+	-	A9-12	+	-
A9-4	+	-	A9-13	+	-
A9-5	+	+	A9-14	+	-
A9-6	+	+	A9-15	+	+
A9-7	+	-	A9-16	+	+
A9-8	+	+	A9-17	+	-
A9-9	+	-	A9-18	+	-

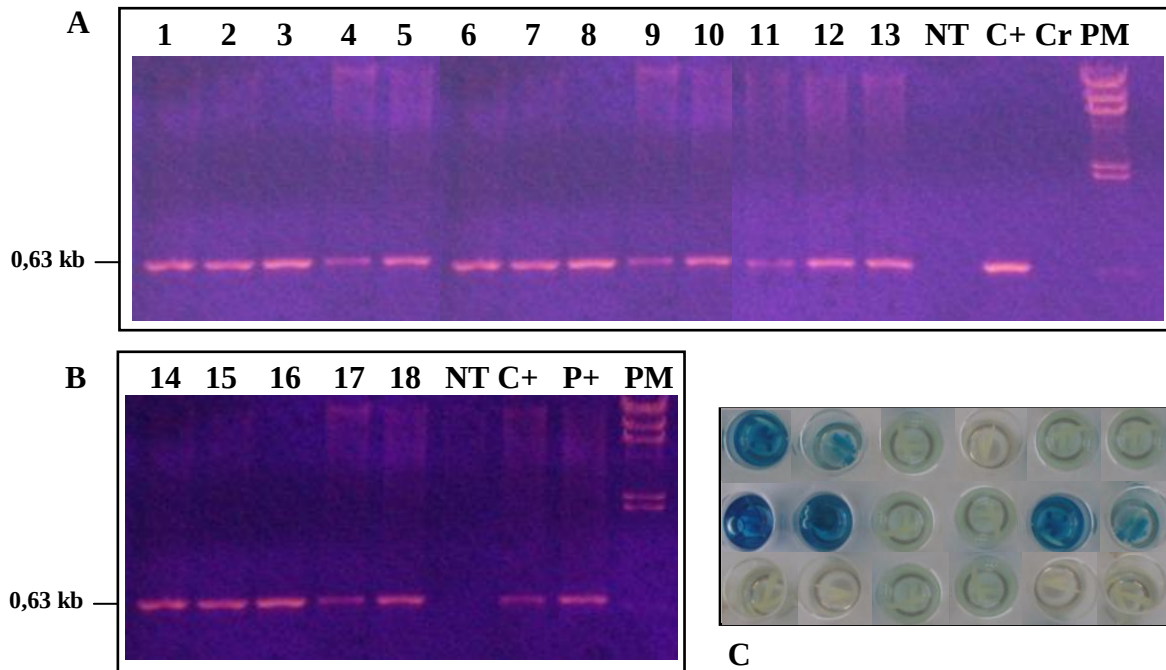


Figura 4. Análisis de las líneas transgénicas de *O. sativa* var J-104, mediante PCR y ensayo GUS. **A y B:** Electroforesis en gel de agarosa 0,8 (p/v) del producto de PCR para amplificar el gen *hpt*. (1-18) plantas resistentes a higromicina, (NT) planta no transformada, (C+) control positivo plásmido pCAMBIA1301, (Cr) control de reacción, (P+) control planta positiva al *hpt*, (PM) marcador de peso molecular λ -ADN-HindIII **C:** Ensayo histoquímico GUS en las plantas analizadas por PCR.

Los seis transformantes GUS(+)/*hpt*(+) fueron seleccionados como las líneas T₀ y transferidas al ambiente *ex vitro* para la obtención de semillas. La estadía en solución Hoagland (Figura 5B), como fase de tránsito *in vitro/ex vitro*, fue satisfactoria: las plantas alcanzaron una altura aproximada de 15 cm y el sistema radicular se fortaleció.

Las plantas fueron transplantadas a tierra y la adaptación a las condiciones de casa de cultivo fue exitosa, avalada por un 100 % de supervivencia (Figura 5C). Todas mantuvieron un crecimiento erecto, y en su estado maduro alcanzaron una altura media de 110 cm. No se observaron diferencias fenotípicas entre las plantas transformadas y el control no transformado.

Transcurridos 140 días después de la siembra en tierra, se cortaron las panículas de cada planta, y se dio por terminado el ciclo de vida de las mismas, que en este caso ha sido un ciclo alternativo que se inició con el cultivo *in vitro*. No obstante, su duración se aproximó al ciclo de vida normal de esta variedad (ciclo medio, 140-150 días).

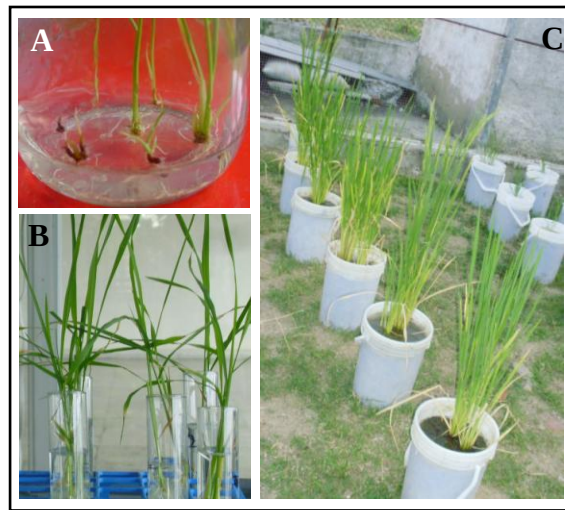


Figura 5. Plantas transgénicas de *Oryza sativa* L, var. J-104, portadoras de los transgenes *hpt* y *uidA*. **(A)** Plantas en medio de cultivo semisólido con sales MS e higromicina 50 mg/L. **(B)** Plantas en solución Hoagland. **(C)** Plantas transferidas a tierra, en una casa de cultivo protegida con malla antipájaros.

Las semillas de cada planta se disgregaron de las panículas, y fueron colectadas cuidadosamente en sobres individuales. Se conservaron en un banco de semillas a 4°C con 34 % de humedad relativa. Los restos de las plantas se llevaron en bolsas plásticas cerradas hasta un crematorio, para su total incineración.

4.6 Obtención de plantas libres del marcador de selección

La germinación de las 50 semillas de cada muestra en medio de cultivo MS sin higromicina se afectó de forma aislada por contaminación con hongos. Por esta razón es desigual el número de plantas procesadas por línea.

Se observó en el gel de agarosa la banda de 0,63 kb en las plantas positivas, que correspondió con la talla esperada para el *hpt*, y que coincidió con el producto amplificado del control positivo. Los ensayos histoquímicos GUS, realizados de forma simultánea al PCR, demostraron que no todas las plantas portadoras del *hpt* eran GUS positivas, y viceversa.

En todas las líneas se detectaron plantas libres del gen marcador de selección en las dos formas posibles: GUS(+)/*hpt*(-) y GUS(-)/*hpt*(-). La Tabla III muestra los porcentajes de plantas sin *hpt* en estas dos variantes, que oscilaron entre el 37,50 % y el 58,53 %. Suponiendo que el *uidA* en este caso fuera el gen de interés, el patrón de integración más atractivo sería GUS(+)/*hpt*(-) y fue identificado en las cuatro líneas pero con valores porcentuales diferentes. En las líneas A9-8 y A9-10 los resultados fueron similares. La línea con mayor porcentaje de GUS(+)/*hpt*(-) fue la A9-5 con 22,50%, en contraste con la línea A9-6 cuyo valor porcentual fue 3,6 veces menor que la A9-5.

Tabla III. Porcentaje de plantas libres del gen marcador de selección en las cuatro líneas transgénicas de arroz evaluadas.

Línea	Total de plantas <i>hig</i> (-)	%	Plantas GUS(+)/ <i>hig</i> (-)	%
A9-5	18	45,00	9	22,50
A9-6	18	37,50	3	6,25
A9-8	24	58,53	7	17,07
A9-10	22	51,16	7	16,27

En plantas de una misma línea se encontraron varios modelos de integración de GUS y *hpt* (Tabla IV). Por ejemplo, nueve plantas de la línea A9-5 estaban libres del *hpt* y eran GUS (+); en el caso contrario estaban tres plantas de la línea A9-6, que amplificaron el gen de selección y fueron negativas al ensayo histoquímico GUS. En las líneas A9-6 y A9-10 se encontraron las cuatro posibilidades de integración de los genes: GUS(+)/*hpt*(+), GUS(+)/*hpt*(-), GUS(-)/*hpt*(+) y GUS(-)/*hpt*(-). El patrón de integración GUS(-)/*hpt*(+) no se detectó en las líneas A9-5 y A9-8. En todas las líneas en estudio se encontraron plantas que no segregaron ninguno de los dos genes.

4.7 Análisis de segregación GUS/hpt en la generación T₁

En la Tabla IV se exponen los resultados de la prueba binomial de bondad de ajuste ($\alpha=0,05$) para analizar la segregación GUS/hpt en la generación T₁. Si los dos genes co-transformados se encuentran en *loci* independientes, la segregación mendeliana esperada para la generación T₁ sería 9:3:3:1 para GUS(+)/hpt(+), GUS(+)/hpt(-), GUS(-)/hpt(+) y GUS(-)/hpt(-), respectivamente.

De acuerdo a los resultados de esta prueba estadística, ninguna de las plantas de las líneas analizadas cumplió con la segregación mendeliana 9:3:3:1 ($\alpha=0,05$). Bastó con que una sola de las cuatro categorías evaluadas por línea no cumpliera el valor de significación exacta unilateral para que no se completara la proporción 9:3:3:1. En las líneas A9-5 y A9-8 no se encontró la categoría GUS(-)/hpt(+), y en las líneas A9-5 y A9-8 no se detectaron plantas GUS(-)/hpt(+) y esto afectó en ambos casos el valor de la significación exacta unilateral. La categoría GUS(+)/hpt(-), el patrón de integración más atractivo, cumplió con la significación exacta unilateral en A9-5, A9-8 y A9-10, pero simultáneamente otras categorías no cumplieron con ese valor en dichas líneas.

Tabla IV. Análisis de segregación GUS/hpt en la generación T₁ de cuatro líneas transgénicas de arroz obtenidas mediante co-transformación biobalística. La prueba binomial de bondad de ajuste se realizó con un nivel de significación $\alpha = 0,05$

Línea	Categoría	Número de plantas	Proporción observada	Proporción de prueba	Significación exacta (unilateral)
A9-5	GUS(+)/hpt(+)	22	0,550	0,560	0,510
	GUS(-)/hpt(+)	0	0,000	0,190	0,000
	GUS(+)/hpt(-)	9	0,230	0,190	0,345
	GUS(-)/hpt(-)	9	0,230	0,060	0,001

n=40

Línea	Categoría	Número de plantas	Proporción observada	Proporción de prueba	Significación exacta (unilateral)
A9-6	GUS(+)/hpt(+)	27	0,563	0,560	0,546
	GUS(-)/hpt(+)	3	0,060	0,190	0,012
	GUS(+)/hpt(-)	3	0,060	0,190	0,012
	GUS(-)/hpt(-)	15	0,310	0,060	0,000

n=48

Línea	Categoría	Número de plantas	Proporción observada	Proporción de prueba	Significación exacta (unilateral)
A9-8	GUS(+)/hpt(+)	19	0,442	0,560	0,080
	GUS(-)/hpt(+)	0	0,000	0,190	0,000
	GUS(+)/hpt(-)	7	0,016	0,190	0,412
	GUS(-)/hpt(-)	17	0,400	0,060	0,000

n=43

Línea	Categoría	Número de plantas	Proporción observada	Proporción de prueba	Significación exacta (unilateral)
A9-10	GUS(+)/hpt(+)	15	0,366	0,560	0,010
	GUS(-)/hpt(+)	4	0,100	0,190	0,088
	GUS(+)/hpt(-)	7	0,170	0,190	0,471
	GUS(-)/hpt(-)	15	0,370	0,060	0,000

n=41

5. DISCUSIÓN

5.1 Formación de callos y tratamiento osmótico

Durante la formación de callos de variedades cubanas de arroz Pérez-Bernal *et al.* (2009a, 2013) han descrito la hinchazón del escutelo del embrión de arroz a los 2-3 días después de situadas las semillas en el medio de formación de callos, seguida por la formación de un callo primario y luego por la proliferación de estructuras proembriogénicas y embriones globulares de rápida multiplicación, todo lo cual coincide con lo observado en este trabajo.

Alfonso Rubí *et al.* (1999) recomendaron el tratamiento osmótico con manitol 0,8 M a los callos que van a ser bombardeados, con el fin de deshidratar las células, disminuir la tensión de la pared celular y reducir el contenido de agua del citosol, para favorecer la penetración de las partículas y la supervivencia de las células después de la transformación biobalística.

5.2 Tinción histoquímica GUS en callos

La tinción histoquímica GUS realizada a los callos tres días después de transformados reveló un patrón de puntos aislados similar al reportado por Pérez-Bernal *et al.* (2009b) para variedades comerciales de arroz. Dos semanas después este patrón cambió, y se observaron grandes áreas teñidas de azul que indicaron la proliferación de los tejidos transformados y la estabilidad en la expresión del gen reportero. Las observaciones histológicas realizadas por Alfonso Rubí *et al.* (1999) demostraron que las células que expresan la β -Glucuronidasa se encuentran en las capas periféricas de los callos, a partir de las cuales se originan los embriones somáticos y se produce la regeneración de plantas.

5.3 Regeneración y selección de plantas resistentes a higromicina

En la etapa de regeneración los controles positivo y negativo funcionaron adecuadamente, y la regeneración en los callos transformados fue exitosa. El medio de regeneración utilizado fue descrito por Pérez Bernal *et al.* (2009a, 2013) para variedades cubanas de arroz. Estos autores han planteado que cuando los callos con masas embriogénicas se transfieren a este medio de cultivo, donde el balance de reguladores de crecimiento favorece las citoquininas, tienen lugar los eventos de maduración y germinación de los embriones somáticos, para dar lugar a plantas completas.

No todas las plantas regeneradas de callos transformados sobrevivieron en medio de cultivo semisólido MS con higromicina. Esto demostró que pueden regenerar falsos positivos a pesar de la continua selección

sobre el antibiótico, coincidiendo con los resultados de Pérez Bernal (2007). El contacto directo de las células del callo con el medio de regeneración es desigual: las que ocupan la porción inferior del callo reciben la máxima cantidad posible de los componentes del medio de cultivo, incluida la higromicina, mientras que las más alejadas no la reciben en igual magnitud. Por tal motivo, puede favorecerse la formación de brotes no resistentes en regiones del callo que no están en contacto directo con el medio de cultivo y que no consumen la cantidad letal de higromicina.

Merkle *et al.* (1999) describieron este fenómeno de otra manera. Estos autores plantearon que la transformación genética es un fenómeno unicelular. Una célula transgénica puede dividirse para formar un embrión somático, del que germina una planta transgénica. Sin embargo, los embriones somáticos no siempre tienen un origen unicelular, sino que pueden formarse a partir de un grupo de células que crecen coordinadamente, donde unas son transgénicas y otras no. De ahí que los brotes germinen de un tipo u otro de embrión, y en el segundo caso se emite un brote quimérico que finalmente no sobrevive al cultivarse en el medio MS con higromicina. Esta puede ser otra explicación del porcentaje de brotes que, aún regenerando en higromicina, no resisten el agente de selección en el medio de cultivo MS.

5.4 Detección del gen *hpt* y actividad GUS en las plantas regeneradas

El análisis por PCR permitió comprobar que todas las plantas resistentes a higromicina que se evaluaron eran portadoras del gen *hpt*, como resultado de la continua presión de selección del material vegetal con el antibiótico. Sin embargo, el 66,6% de ellas fueron negativas al ensayo histoquímico GUS.

Wang *et al.* (2006) y Devi *et al.* (2012) también observaron la incorporación no uniforme de los transgenes en transformantes obtenidos mediante biobalística. Durante el bombardeo los genes son liberados por métodos físicos hacia las células vegetales luego de una precipitación del ADN con partículas de oro en agitación con vortex. El disparo de las partículas implica una alta presión y velocidad. Durante estos procesos drásticos el ADN podría ser fragmentado, y esto puede ser una de las razones para la supresión y la integración por separado y desigual de los transgenes (Devi *et al.*, 2012).

Devi *et al.*, (2012) concluyeron que el patrón de integración de genes co-transformados es muy variable. La frecuencia de co-integración parece cambiar en diferentes especies y cuando se utilizan distintos plásmidos. La tasa de co-integración de los genes ligados y no ligados puede variar además entre los diferentes experimentos utilizando los mismos plásmidos y también en condiciones experimentales

similares. En el presente trabajo se utilizaron los mismos plásmidos e iguales condiciones experimentales, y aún así ocurrió la incorporación no uniforme de los genes co-transformados.

5.5 Plantas libres del gen marcador de selección en la generación T₁

El método de co-transformación empleado permitió obtener plantas libres del gen marcador de selección en la generación T₁ de todas las líneas en estudio. Según Rozo y Chaparro (2004) el PCR es una herramienta útil para detectar plantas libres del marcador de selección, pero en este trabajo requirió procesar gran cantidad de muestras a la vez, lo que hizo engorrosa la pesquisa. Existe la alternativa de automatización en la preparación de las muestras (De la Cruz, 2013), pero no estuvo disponible en este caso.

Los porcentajes de plantas libres del marcador de selección, y que expresaron de forma estable el *uidA*, estuvieron entre 6,25 % y 22,50 %, superiores a los reportados por otros autores que han trabajado la co-transformación biobalística de arroz. Zhao *et al.* (2007) co-transformaron dos variedades de arroz japónica con los genes *bar* y *cecropina B*. El porcentaje de plantas libres del *bar* no superó el 6 % en la progenie T₁. Kumar *et al.* (2010) analizaron por PCR la segregación independiente de los genes *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) y *hpt* en las progenies T₁ y T₂ de una variedad de arroz índica obtenida mediante co-transformación biobalística. Estos autores obtuvieron un 4% de plantas libres del gen marcador en la generación T₂.

5.6 Análisis de segregación GUS/*hpt* en la generación T₁

Los resultados de la prueba binomial de bondad de ajuste indicaron que las líneas analizadas no cumplieron con la segregación mendeliana esperada para la generación T₁, que sería 9:3:3:1 para las variantes de integración GUS(+)/*hpt*(+), GUS(+)/*hpt*(-), GUS(-)/*hpt*(+) y GUS(-)/*hpt*(-), respectivamente.

Existen reportes de segregación mendeliana de genes co-trasformados en arroz o especies relacionadas. Yao *et al.* (2006) utilizaron para la co-transformación de trigo (*Triticum aestivum*) los genes *uidA* y *bar* y obtuvieron plantas transgénicas con bajo número de copias de los transgenes, que se segregaron de forma mendeliana en tres generaciones sucesivas.

Kumar *et al.* (2010) determinaron mediante PCR la integración de un gen fusionado de *Bacillus thuringiensis* (*cry1B-1Aa*) y *hpt* en uno y varios *loci* del genoma de arroz co-transformado, y confirmaron la herencia estable y el patrón mendeliano de segregación de los genes.

Sin embargo, Yayuan *et al.* (2013) afirmaron que las monocotiledóneas son frecuentes las relaciones de segregación distorsionadas de los transgenes respecto al patrón mendeliano. Campbell *et al.* (2000) estudiaron la herencia múltiple de transgenes en trigo, introducidos mediante co-transformación biobalística. Demostraron que tres de las nueve combinaciones de genes detectadas en los transformantes primarios segregaron de forma 9:3:3:1 en la generación T₁. El estudio de otro grupo de combinaciones génicas reveló tasas de segregación ambiguas de los genes cuando se insertaban de forma múltiple, y los autores no descartaron la ocurrencia de rearrreglos cromosómicos o aberraciones propias del cultivo de tejidos.

Satoto *et al.* (2008) analizaron los patrones de segregación en varias generaciones de arroz transgénico (var. Rojolele) co-transformado por biobalística con los genes *cry1Ab* y *gna*. En todos los eventos de transformación ocurrió la segregación 3:1 del *cry1Ab*; sin embargo, la segregación del gen *gna* tuvo un comportamiento no mendeliano (1:1) en varias poblaciones. En la población T₂, derivada de plantas T₁ que eran portadoras de ambos genes, se verificó que estos segregaron según el patrón mendeliano 9:3:3:1. La segregación de genes marcadores morfológicos de antocianina en una población T₂ de arroz Basmati fue estudiada por Nthakanio *et al.* (2013). Sus resultados indicaron que la segregación de antocianinas no se correspondía con las proporciones mendelianas 3:1 ni 9:3:3:1, por lo que concluyeron que ocurrió distorsión de la segregación de los genes.

La introducción de un transgén en un genoma receptor es un evento complejo que depende del propio transgén y del genoma huésped (Yin *et al.*, 2004). Se considera que los transgenes se comportan como genes dominantes y es complejo su destino una vez integrados al cromosoma de la planta (Jackson *et al.*, 2013). La segregación se ve afectada por la estructura y posición del transgén debido a la integración aleatoria, y por su interacción con los genes endógenos (Jackson *et al.*, 2013; Yayuan *et al.*, 2013). La frecuencia de distorsión de la herencia mendeliana de los transgenes varía entre el 10 y el 50 % de los transformantes (Yin *et al.*, 2004).

La segregación de los transgenes en las plantas también se afecta por el efecto multicopia, que es una de las desventajas de la transformación biobalística. Se ha demostrado que cuando un transgén es integrado como una copia simple en el genoma vegetal, su patrón de herencia corresponde a la herencia monohíbrida mendeliana clásica (Chaparro, 2009). Cuando los transgenes son integrados en copias múltiples, muestran patrones complejos de herencia, reducen los niveles de expresión y puede resultar en la escisión o el silenciamiento, y llevar a la pérdida del transgén en generaciones sucesivas (Yao *et al.*, 2006; Chaparro 2009).

Los resultados del presente estudio, donde las relaciones de segregación de los transgenes en la progenie T_1 no han sido mendelianas, podrían responder a efectos posicionales o mecanismos genéticos de integración parcial, duplicación o delección inducidos por el propio evento de transformación. Como ha sido una transformación biobalística es probable que en algunos eventos haya ocurrido la integración de varias copias de los transgenes, lo cual puede acarrear, entre otros, problemas de silenciamiento génico y pérdida del transgén en la descendencia, pero esto deberá comprobarse mediante estudios moleculares futuros.

6. CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron, mediante co-transformación biobalística, plantas transgénicas de una variedad cubana de arroz libres del gen marcador de selección.
2. Se detectaron plantas libres del gen marcador de selección en la progenie T₁ mediante PCR.
3. Se analizó la segregación de los genes *uidA* y *hpt* en la generación T₁ de las líneas transgénicas de arroz (var. J-104), la cual no tuvo un comportamiento mendeliano.

7. RECOMENDACIONES

- 1- Realizar estudios moleculares por Southern blot en las líneas transgénicas para verificar el número de copias insertadas de los genes co-transformados, y por PCR para amplificar el gen *uidA* como estudio simultáneo al ensayo histoquímico.
- 2- Estandarizar un método de pesquisa *in planta*, en sustitución del PCR, para facilitar la detección masiva de plantas libres del marcador de selección.
- 3- Continuar los análisis de segregación en generaciones sucesivas de las líneas transgénicas.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akbudak, M. A y V. Srivastava (2011): Improved FLP Recombinase FLAP efficiently removes marker gene from transgene *locus* developed by Cre-lox mediated site specific gene integration in rice. **Mol. Biotechnol.** 49 (1): 82-89.
- Angladette, A. (1969): **El arroz. Técnicas agrícolas y producciones tropicales**. En: Andre Angladete (ed.). Blume: Barcelona, 35 p.
- Alfonso-Rubí, J., P. Carbonero y I. Díaz (1999): Parameters influencing the regeneration capacity of calluses from mature Indica y Japonica rice seeds after microprojectile bombardment. **Euph.** 107: 115-122.
- Aziz, N. y G. Machray (2003): Efficient male germ line transformation for transgenic tobacco production without selection. **Plant Mol. Biol.** 51: 203-211.
- Bai, X., Q. Wang y C. Chu (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.
- Barampuram, S. y Z. J. Zhang (2011): Recent advances in plant Transformation. **Plant Chrom. Eng.** 701: 1-33.
- Breitler, J. C., D. Meynard, J. Van Boxtel, M. Ryer, F. Bonnot, L. Cambillau y E. Guiderdoni (2004): A novel two T-DNA binary vector allows efficient generation of marker-free transgenic plants in three elite cultivars of rice (*Oryza sativa* L). **Transgenic Res.** 13: 271-287.
- Campbell, B. T., P. S. Baenziger, A. Mitra, S. Soto y T. Clemente (2000): Inheritance of multiple transgenic in wheat. **Crop Sci.** 40: 1133-1141.
- Cotsaftis, O., C. Sallaud, J. C Breitler, D. Meynard, R. Greco, A. Pereira y E. Guiderdoni (2002): Transposon-mediated generation of T-DNA and marker-free rice expressing a *Bt* endotoxin gene. **Mol. Breed.** 10: 165-180.
- Cruz, A., B. Martínez y D. Rivero (2009): Efecto de metabolitos y esporas del hongo *Sarocladium oryzae* Sawada sobre algunas poáceas. **Fitosanidad J.** 13 (3): 151-153.
- Chaparro, G. A. (2009): Natural selection and transgenic crops: a Darwinian hiatus? **Acta Biol. Colomb.** 14: 365-382.
- Cheng, Z., C. R. Buell, R. A. Wing, M. Gu y J. Jing (2001): Toward a Cytological Characterization of the Rice Genome. **Genome Res.** 11: 2133-2141
- Chen, L. J., D. S. Lee, Z. P. Song, H. S. Suh y B. R. Lu (2004): Gene flow from cultivated rice (*Oryza sativa* L) to its weedy and wild relatives. **Annals of Bot.** 93: 67-73.
- Chong-Pérez, B., R. G. Kosky, M. Reyes, L. Rojas, B. Ocaña, M. Tejeda, B. Pérez y G. Angenon (2011): Heat shock induced excision of selectable marker genes in transgenic banana by Cre-lox site-specific recombination system. **J. Biotechnol.** 159 (4): 265-273.

- Chu, C. C., W. Ching-Chu, S. Ching-San, T. Kwang-Chu, C. Chih-Yin y B. Feng-Yun (1975): Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments in the nitrogen sources. **Sci. Sin.** 18: 659-668.
- Day, A. y M. Goldschmidt (2011): The chloroplast transformation toolbox: selectable markers and marker removal. **Plant Biotech.** 9: 540-553.
- De La Cruz, A. (2013): La automatización en la preparación de muestras para PCR. **Boletín Eppendorf Ibérica SLU.** 1 p.
- Devi, S., M. K. Mishra y M. Elliott (2012): Regeneration of transgenic rice with bacterial *ipt* gene driven by senescence specific (SAG12) promoter by particle bombardment. **Trop. Life Sci. Res.** 23 (2): 39-48.
- Gorbunova, V. y A. A. Levy (2000): Analysis of extrachromosomal Ac/Ds transposable elements. **Genet.** 155 (1): 349-359.
- Hayakawa, H., R. Ogura., K. Hiratsuka, M. Suzuki y M. Ugaki (2012): Novel intron-containing luciferase genes for quantitative analysis of mRNA levels in transient gene expression assays. **Plant Biotech.** 29: 505-509.
- Hoa, T. C., B. B. Bong, E. Hug y T. K. Hodges (2002): *Cre-lox* site-specific recombination controls the excision of a transgene from the rice genome. **Theor. Appl. Genet.** 104 (4): 518-525.
- Hraska, M., S. Rakousky y V. Curn (2006): Green fluorescent preotein as a vital marker for non-destructive detection of transformation events in transgenic plant. **Plant Cell Tissue Organ. Cult.** 86: 303-318.
- Jackson, M., D. Anderson y R. Birch (2013): Comparison of *Agrobacterium* and particle bombardment using whole plasmid or minimal cassette for production of high-expressing, low-copy transgenic plants. **Transgenic Res.** 22: 143-151.
- Jefferson, R. A. (1987): Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. **Plant Mol. Biol. Rep.** 5 (4): 387-405.
- Khan, H. K. (2010): Gene Transfer Technologies and their Applications: Roles in Human Diseases. **Soc. App. Sci.** 1 (1): 208-218.
- Khatttri, A., S. Nandy y V. Srivastava (2011): Heat-inducible *Cre-lox* system for marker excision in transgenic rice. **Biosci.** 36: 37-42.
- Kikkert, J. R, J.R. Vidal y B. I. Reisch (2005): Stable Transformation of Plant Cells by Particle Bombardment/Biolistics. Methods in Molecular Biology. **Transgenic Plants: Methods and Protocols.** pp. 286: 61-78. En: Peña, L. (ed.). New Jersey: Humana Press Inc.
- Kirby, J. y T. A. Kavanagh (2002): NAN fusion: a synthetic sialidase, reporter gene as a sensitive and versatile partner of GUS. **Plant J.** 32 (3): 391-400.

- Kleter, G. A., M. Peijinenburg y H.J.M. Aarts (2005): Health Considerations Regarding Horizontal Transfer of Microbial Transgenes Present in Genetically Modified Crops. **Biomed. Biotechnol.** 4: 326-352.
- Komari, T., Y. Hiei, Y. Saito, N. Murai y T. Kumashiro (1996): Vectors carrying two separate T-DNAs for co transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. **Plant J.** 10 (1): 165-174.
- Kumar, S., L. Arul y D. Talwar (2010): Generation of marker-free Bt transgenic indica rice and evaluation of its yellow stem borer resistance. **Appl. Genet.** 51 (3): 243-257.
- Lamz, A. y M. C. González (2013): La salinidad como problema en la agricultura: una solución inmediata. **Cultivos Trop.** 34 (4): 31-42.
- Li, S., A. Xing, B. Moon, S. Burgoyne y A. Guida (2007): A *Cre/loxP* mediated self-activating gene excision system to produce marker gene free transgenic soybean plants. **Plant Mol Biol.** 65 (3): 329-341.
- Lin, C., F. Jun, X. Xu, T. Zhao, J. Cheng, J. Tu, G. Ye y Z. Shen (2008): A Built-in strategy for containment of transgenic plants: Creation of selectively terminable transgenic rice. **PLoS One.** 3: 1818.
- López, N. L. (2011): Eliminación del gen marcador de selección en plantas transplastómicas mediante la expresión transitoria de la recombinasa Cre. Tesis en opción al título de Ingeniero Técnico Agrícola en Hortofruticultura y Jardinería. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Pública de Navarra. España. 7-8 p.
- Lowe, B. A. , N. S. Prakash, M. Way, M. T. Mann, T. M. Spencer y R. S. Boddupalli (2009): Enhanced single copy integration events in corn via particle bombardment using low quantities of DNA. **Transgenic Res.** 18: 831-840.
- Lucca, P., X. Ye, I. Potrykus (2001): Effective selection and regeneration of transgenic plants with mannose as selective agent. **Mol. Breed.** 7: 43-49.
- Ma, B. G, X. Y Duan, J. X Niu, C. Ma, Q. N Hao, L. X Zhang y H. P Zhang (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.
- Merkle, S. A., W. A. Parrott y E. G. Williams (1999): **Applications of somatic embryogenesis and embryo cloning.** En: Plant tissue culture: Applications and limitations (ed.). S.S. Bhojwani, Elsevier Science Publishers: Amsterdam, 67-101 pp.
- Miller, M., L. Tagliani, N. Wang, B. Berka, D. Bidney y Z. Y. Zhao (2002): High efficiency transgene segregation in co-transformed maize plants using an *Agrobacterium tumefaciens* 2 T-DNA binary system. **Transgenic Res.** 11 (4): 381-396.
- Moore, S. K. y V. Srivastava (2006): Efficient deletion of transgenic DNA from complex integration locus of rice mediated by *Cre/lox* recombination system. **Crop Sci.** 46: 700-705.

- Murashige, T. y F. Skoog (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant J.** 15 (3): 473-497.
- Nayhua, G. L. (2013): Intoxicación por plaguicidas, un problema para la salud pública. **Boletín Epidemiológico**, 22: 7 p.
- Netherwood, T., S. M. Martin-Orue, A. G. O'Donnell, S. Gockling, J. Graham, J. C. Mathers y H. J. Gilbert (2004): Assessing the survival of transgenic plant DNA in the human gastrointestinal tract. **Nat. Biotech.** 22: 204-209.
- Nielsen, K. M. y J. P. Townsend (2004): Monitoring and modeling horizontal gene transfer. **Nat. Biotech.** 22: 1110-1114.
- Nthakanio, P. N., J. I. Kanya, J. M. Kimani, R. K. Wanjogu y S. Njaukariuri (2013): Segregation distortion of anthocyanin morphological marker in population of crosses between basmati and environment genic male sterile rice lines. **Agronomy and Agricultural Res.** 3 (12): 43-52.
- OCDE/FAO. (2013) (activo noviembre 2013). OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2013-2022. Texcoco, México, Universidad Autónoma Chapingo. http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2013-es.
- Osakabe, K., M. Endo, K. Kawai, Y. Nishizawa, K. Ono, K. Abe, Y. Ishikawa, H. Nakamura, H. Ishikawa, S. Nishimura, T. Shimizu y S. Toki (2005): The mutant form of acetolactate synthase genomic DNA from rice is an efficient selectable marker for genetic transformation. **Mol. Breed.** 16: 313-320.
- Parkhi, V., M. Rai, J. Tan, N. Oliva, S. Rehana, A. Bandyopadhyay, L. Torrizo, V. Ghole, K. Datta y S. Datta (2005): Molecular characterization of marker-free transgenic lines of indica rice that accumulate carotenoids in seed endosperm. **Mol. Genet. Genom.** 274: 325-336..
- Pérez-Bernal, M. (2007): Transformación genética de la variedad de arroz IACuba-28 mediante *Agrobacterium tumefaciens*. Tesis en opción al grado de máster en Biología Vegetal, Mención Biotecnología Vegetal. Facultad de Biología. Universidad de La Habana. 33-40 p.
- Pérez-Bernal, M., M. Delgado, C. Hernández, M. Barceló y R. Armas (2009a): Callus and plant regeneration of two Cuban rice cultivars using different seed explants and amino acid supplements. **Ann. Trop. Res.** 3 (12): 1-15.
- Pérez-Bernal, M., C. Hernández, M. Barceló, M. Delgado y R. Armas (2009b): Quantitative transient GUS expression in J-104 rice calli through manipulation of *in vitro* culture conditions. **Rev. Colomb. Biotecnol.** 11 (2): 75-84.
- Pérez-Bernal, M., D. Abreu, O. Valdivia, M. Delgado y R. Armas (2013): Effective β -lactam antibiotics for *Agrobacterium tumefaciens* suppression in indica rice calli. **Rev. Colomb. Biotecnol.**, 15 (2): 108-117.
- Petri, C. S. (2005): Transformación genética del albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.), mediada por *Agrobacterium* y regeneración de plantas transformadas. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias. Departamento de Biología Vegetal. Universidad de Murcia. España. 11-15 p.
- Potrykus, I. y G. Spangenberg (1995): **Gene transfer to plants**. Editorial Springer-Verlag, Berlin, Alemania, 361 p.

- Pipatpanukul, T., S. Bunang, P. Thurakulpisut y Kositrakul (2004): Transformation of indica rice cv RD6 mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Sci. Technol.** 26 (1): 1-13.
- Pratheesh, P. T., G. M. Shonima, T. Jiji, C. I. Abraham y G. M. Kurup (2012): Study on efficacy of different *Agrobacterium tumefaciens* strains in genetic transformation of microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Adv. Appl. Sci. Res.** 3 (5): 2679-2686.
- Putcha, H. (2003): Marker-free transgenic plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Cult.** 74: 123-134.
- Qi, Y.B., S.H. Ye, Y.T. Lu, Q.S. Jin y X.M. Zhang (2009): Development of marker-free transgenic Cry 1Ab rice with Lepidopteran pest resistance by *Agrobacterium* mixture-mediated co-transformation. **Rice Sci.** 16 (3): 181-186.
- Rao, R., M. Venkata, C. Parameswari, R. Sripriya y K. Veluthambi (2011): Transgene stacking and marker elimination in transgenic rice by sequential *Agrobacterium*-mediated co-transformation with the same selectable marker gene. **Plant Cell Rep.** 20 (7): 1241-1252.
- Reyes, M., R. G. Kosky, I. Bermúdez-Caraballosa y B. Chong-Pérez (2010): Determinación de la concentración mínima letal de glufosinato de amonio en diferentes materiales vegetales de banano cv "Grande naine" (*Musa AAA*). **Biotechnol. Veg.** 10 (3): 157-168.
- Rozo, Y. I. y A. Chaparro (2004): Análisis de un sistema de selección de plantas transgénicas basado en la técnica de PCR. **Acta Biol. Colomb.** 9 (2): 120-121.
- Sanford, J. C., T. Klein, E. D. Wolf y N. Allred (1987): Delivery of substances into cells and tissues using particle bombardment process. **Part. Sci. Tech.** 5 (1): 27-37.
- Satoto, J. S., A. Hartana y I. H. Slamet-Leodin (2008): The segregation pattern of insect resistance genes in the progenies and crosses of transgenic Rojolele rice. **Indonesian Agricultural J.** 9 (2): 35-43.
- Sengupta, S., D. Chakraborty, H. A. Mondal y S. Das (2010): Selectable antibiotic resistance marker gene-free transgenic rice harbouring the garlic leaf lectin gene exhibits resistance to sapsucking planthoppers. **Plant Cell Rep.** 29: 261-271.
- Sivamani, E., R. K. Delong y R. Qu (2009): Protamine-mediated DNA coating remarkably improves bombardment transformation efficiency in plant cells. **Plant Cell Rep.** 28: 213-221.
- Socorro, M., L. Alemán y S. Sánchez (2005) (activo junio 2014). El cultivo popular del arroz en Cuba. <http://www.desal.org.mx/spip/spip.php?article24> .
- Sreekala, C., L. Wu, K. Gu, D. Wang, D. Tian y Z. Yin (2005): Excision of a selectable marker in transgenic rice (*Oryza sativa L.*) using a chemically regulated *Cre-loxP* system. **Plant Cell Rep.** 24 (2): 86-94.
- Sripriya, R., V. Raghupathy y K. Veluthambi (2008): Generation of selectable marker-free sheath blight resistant transgenic rice plants by efficient co-transformation of a cointegrate vector T-DNA and a binary vector T-DNA in one *Agrobacterium tumefaciens* strain. **Plant Cell Rep.** 27: 1635-1644.
- Tu, J., K. Datta, N. Oliva, G. Zhang, C. Xu, G. S. Khush, Q. Zhang y S. K. Datta (2003): Site-independently integrated transgenes in the elite restorer rice line Minghui 63 allow removal of a selectable marker from the gene of interest by self segregation. **Plant Biotechnol.** 1: 155-165.

- Tuteja, N., S. Verma, R. K. Sahoo, S. Reveendar y I. B. L. Redy (2012): Recent advances in development of marker-free transgenic plants: Regulation and biosafety concern. **Biosci.** 37 (1): 167-197.
- Tzfira, T. y V. Citovsky (2006): *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. **Curr. Opin. Biotechnol.** 17 (2): 147-154.
- Valderrama, A. M., R. Arango y L. Afanador (2005): Transformación genética de plantas mediada por *Agrobacterium*: ingeniería genética natural y aplicada. **Rev. Fac. Nat. Agr. Medellín.** 58 (1): 2569-2585.
- Vickers, C. E., G. Xue y P. Gresshoff (2003): A synthetic xylanase as a novel reporter in plants. **Plant Cell Rep.** 22 (2): 135-140.
- Vitha, S. (2004) (activo noviembre 2013). Histochemical localization of β -Glucuronidase (GUS) reporter activity in plant tissues. En: Microscopy and Imaging Center, Texas. <http://www.tamu.edu/mic> .
- Wang, D., Q. Zhao, D. Zhu, G. Ao y J. Yu (2006): Particle-bombardment-mediated co-transformation of maize with a lysine rich protein gene (*sb401*) from potato. **Euph.** 150 (1-2): 75-85.
- Xia, Z., L. Gao, Y. Luo, X. Deng, S. Li, W. Zhai (2009): Application of competitive PCR for screening selectable marker-free Xa21 transgenic rice. **Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.** 25 (4): 605-610.
- Yao, Q., L. Cong, J. L. Chang, K. X. Li, G. X Yang y G. Y. He (2006): Low copy number gene transfer and stable expression in a commercial wheat cultivar via particle bombardment. **J. Exp. Bot.** 57 (14): 3737-3746.
- Yau, Y.Y. y Steward N (2013): Less is more: strategies to remove marker genes from transgenic plants. **BMC Biotech.** 13: 36.
- Yayuan, J., L. Sun, M. Jiang, K. Li, Y. Song y C. Zhu (2013): Production of marker-free and RSV-resistant transgenic rice using a twin T-DNA system and RNAi. **Biosci.** 38 (3): 573-581.
- Yin, Z., W. Plyder y S. Malepszy (2004): Transgene inheritance in plants. **Appl. Genet.** 45 (2): 127-144.
- Yu, H.X., Q.Q. Liu, L. Xu, M.F. Lu y X.J. Yang (2009): Quality characteristics and field performance of selectable marker-free transgenic rice with antisense Wx gene and improved quality derived from the elite parents of hybrid indica rice. **Cereal Sci.** 50 (3): 370-375.
- Yu, H.X., Q.Q. Liu, L. Wang, Z.P. Zhao, L. Xu, B.L. Huang, Z.Y. Gong, S.Z. Tang y M.H. Gu (2006): Breeding of selectable marker-free transgenic rice lines containing AP1 gene with enhanced disease resistance. **Agric. Sci. China.** 5 (11): 805-811.
- Zhao, Y., Q. Qian, H.Z. Wang y D.N. Huang (2007): Co-transformation of gene expression cassettes via particle bombardment to generate safe transgenic plant without any unwanted DNA. **In Vitro Cell Dev. Plant J.** 43 (4): 328-334.
- Zhu, Z. y R. Wu (2008): Regeneration of transgenic rice plants using high salt for selection without the need for antibiotics or herbicides. **Plant Sci.** 174 (5): 519-523.

ANEXO I. Composición química de la solución Hoagland de fuerza media.

Para preparar 1 litro de solución completa se mezclan, de las siguientes soluciones, los volúmenes especificados entre paréntesis:

Solución I (2,5mL)

KNO₃ 10,10 g
 CaN₂O₄ x 4H₂O 11,80 g
 Para 100 mL

Solución II (1mL)

NH₄NO₃ 4,0 g
 MgSO₄ x 7H₂O 24,65 g
 Para 100 mL

Solución III (1,5mL)

FeNaEDTA 0,343 g
 Para 100 mL

Solución IV (1mL)

HBO₃ 143 mg
 ZnSO₄ x 7H₂O 11 mg
 CuSO₄ x 5H₂O 40 mg
 Na₂MoO₄ x 2H₂O 6 mg
 Para 100 mL

Solución V (1mL)

MnCl₂ x 4H₂O 180 mg
 Para 100 mL

Solución VI (1,5mL)

KH₂PO₄ 6,8 g
 Para 100 mL

ANEXO II. Plásmido pCAMBIA 1301

