

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Hacia la transformación de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) en Guatemala: Optimización del medio de cultivo.

Trabajo de graduación presentado por

Luis David Archila Dubón

para optar al grado académico de Licenciado en Bioquímica y

Microbiología

Guatemala

2014

Hacia la transformación de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) en Guatemala: Optimización del medio de cultivo.

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Hacia la transformación de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) en Guatemala: Optimización del medio de cultivo.

Trabajo de graduación presentado por

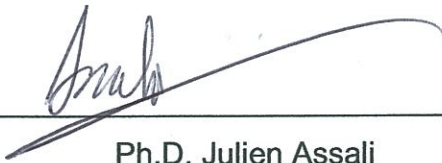
Luis David Archila Dubón

para optar al grado académico de Licenciado en Bioquímica y

Microbiología


Guatemala
2014

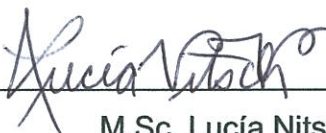
Vo. Bo. :

(f) 
Ph.D. Julien Assali

Tribunal Examinador:

(f) 
Ph.D. Julien Assali

(f) 
Ing. Luis Molina

(f) 
M.Sc. Lucía Nitsch

Fecha de aprobación: Guatemala, 19 de junio de 2014

PREFACIO

La presente investigación se llevó a cabo en el Centro de Estudios en Biotecnología, en las instalaciones del laboratorio de Bioquímica y Microbiología de la Universidad del Valle de Guatemala y en la Estación Experimental de CENGICAÑA. Nació como un proyecto de prueba de concepto de transformación de caña de azúcar mediante *Agrobacterium tumefaciens* en el año 2012; sin embargo, no se obtuvieron resultados positivos en las pruebas piloto, presentándose altos niveles de contaminación. Por esta razón el proyecto presentado se enfoca en la optimización del medio de cultivo para mejorar los resultados de la transformación. Actualmente, CENGICAÑA continúa con el proyecto de transformación de caña de azúcar.

Durante la trayectoria de la investigación, fueron muchas las personas que impulsaron el proyecto hacia adelante, a veces cuando incluso yo ya no quería continuar, permitiendo que este se finalizara.

Quiero agradecer a Dios por brindarme todas las oportunidades que me permitieron llevar a cabo mis estudios universitarios y la realización de este proyecto.

Agradezco a mis padres por apoyarme en todo y estar de acuerdo en mi decisión de estudiar Bioquímica y Microbiología, apoyándome económicamente en los gastos universitarios.

Agradezco a la Dra. Mónica Stein, porque sin ella este proyecto nunca hubiera sido posible. Gracias a su asesoría inicial, las bacterias y vectores que me proporcionó y su constante apoyo para que terminara el trabajo de graduación pronto. Su cátedra de Biología Molecular fue para mí una gran inspiración.

Agradezco al Ing. Luis Molina, por su interés en el proyecto y el material vegetal provisto para la experimentación. Además de permitir el uso de las instalaciones de CENGICAÑA.

Agradezco a la Lic. Claudia Paiz, por el apoyo y asesoría inicial y por sus conocimientos compartidos que ayudaron a enfocarme desde el inicio.

Agradezco a la Dra. Pamela Pennington, por impulsar el proyecto en la recta final y darle el enfoque necesario para su conclusión. Sus cátedras también fueron fuente de inspiración y sus conocimientos han sido invaluable.

Agradezco al Dr. Julien Assali, por tomar el cargo de asesor principal y brindar su ayuda en gran parte del proceso experimental, estando preocupado todo el tiempo por el avance del proyecto.

Agradezco a mis amigos Diego Reckholder, Miguel Morales y Mónica Villatoro, por su constante apoyo y compañía en esas horas de trabajo en el laboratorio y viajes a Escuintla. Sin ellos todo este proceso hubiese sido (más) difícil.

Agradezco a la Licenciada Lucía Nitsch, por su constante apoyo en el proyecto y por su preocupación continua por la finalización del mismo.

Finalmente agradezco al lector, por interesarse en el fruto de mi trabajo y tomarse el tiempo de leer este documento. Espero sea de provecho.

ÍNDICE

	Página
Prefacio.....	vi
Lista de cuadros.....	ix
Lista de figuras.....	x
Resumen.....	xii
I. Introducción.....	1
II. Objetivos.....	2
III. Justificación.....	3
IV. Marco Teórico.....	4
V. Materiales y métodos.....	17
VI. Resultados.....	22
VII. Discusión.....	25
VIII. Conclusiones.....	30
IX. Recomendaciones.....	31
X. Bibliografía.....	32
XI. Anexos.....	37

LISTA DE CUADROS

	Página
1. Presupuesto del proyecto de investigación.....	19
2. Calendarización de actividades del proyecto.....	20
3. Inhibición de <i>A. tumefaciens</i> en MS0.6 con antibióticos.....	23
4. Regeneración de explantes de caña de azúcar en MS0.6 con antibióticos.....	23
5. Índice de regeneración de caña de azúcar con cada condición.....	23
6. Composición del medio Murashige y Skoog para cultivo de tejidos de plantas.....	37
7. ANOVA de los porcentajes de regeneración de explantes de caña de azúcar.....	37
8. ANOVA de la cantidad de brotes por explante de caña de azúcar.....	38
9. ANOVA de los índices de regeneración de explantes de caña de azúcar.....	38
10. Prueba Tukey para índices de regeneración de explantes de caña de azúcar.....	38

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Esquema de la caña de azúcar.....	4
2. Ciclo de cultivo de la caña de azúcar.....	5
3. Transferencia de ADN desde <i>Agrobacterium</i> hacia el núcleo de las células vegetales.....	6
4. Ejemplo de cointegración para la formación del plásmido Ti desarmado.....	7
5. Ejemplo de un sistema binario del plásmido Ti desarmado mediante “Transcomplementación”.....	7
6. Esquema de transformación mediada por <i>A. tumefaciens</i> de plantas.....	9
7. Ejemplo de Homopolymer tailing.....	10
8. Ejemplo del uso de linkers con EcoRI como enzima de restricción.....	11
9. Diagrama del vector pANIC6E para sobreexpresión.....	12
10. Regeneración de material vegetal mediante cultivo de tejidos.....	14
11. Estructura base de las penicilinas.....	15
12. Cadenas laterales de amoxicilina y carbenicilina.....	16
13. Posible mecanismo para la inhibición irreversible de las β -lactamasas por el ácido clavulánico.....	16
14. Diagrama de flujo de la metodología del proyecto.....	17
15. ADN plasmidial extraído de <i>A. tumefaciens</i> transformada con pANIC6E.....	22
16. Índice de regeneración de caña de azúcar con cada composición de antibióticos.....	24
17. Explantes de caña de azúcar regenerados tras dos semanas de incubación.....	24
18. Discos foliares de caña de azúcar regenerados en medio MS0.6 suplementado con Augmentin® 250 μ g/mL.....	39
19. Discos foliares de caña de azúcar regenerados en medio MS0.6 suplementado con Augmentin® 500 μ g/mL.....	39
20. Discos foliares de caña de azúcar regenerados en medio MS0.6 suplementado con Augmentin® 250 μ g/mL y carbenicilina 250 μ g/mL.....	40
21. Discos foliares de caña de azúcar regenerados en medio MS0.6 suplementado con Augmentin® 250 μ g/mL y carbenicilina 500 μ g/mL.....	40
22. Discos foliares de caña de azúcar regenerados en medio MS0.6 suplementado con Augmentin® 500 μ g/mL y carbenicilina 250 μ g/mL.....	41
23. Discos foliares de caña de azúcar regenerados en medio MS0.6 suplementado con Augmentin® 500 μ g/mL y carbenicilina 500 μ g/mL.....	41

24. Discos foliares de caña de azúcar regenerados en medio MS0.6 suplementado con Kanamicina 50 µg/mL.....	42
25. Discos foliares de caña de azúcar regenerados en medio MS0.6 sin antibióticos (contaminación leve).....	42
26. Discos foliares de caña de azúcar regenerados en medio MS0.6 sin antibióticos (contaminación masiva).....	43
27. Discos foliares de caña de azúcar regenerados en medio MS0.6 suplementado con Kanamicina 50 µg/mL (contaminación masiva).....	44
28. Discos foliares de caña de azúcar en incubación.....	45

RESUMEN

La transformación genética de plantas es una técnica de ingeniería genética que introduce genes exógenos en el genoma de la planta y aumenta la eficiencia de los procesos de mejoramiento de cultivos ya que disminuye el tiempo necesario para obtener un organismo con las características deseadas. La transformación de plantas puede realizarse mediante técnicas de biolística, vectores virales o mediante infección por *Agrobacterium tumefaciens*. La caña de azúcar es un cultivo económicamente importante en Guatemala, la industria azucarera busca cultivar las mejores variedades en cuanto a producción de azúcar, resistencia a factores abióticos, herbicidas y plagas; por lo que la transformación genética es de interés en esta área. En Guatemala se ha trabajado con transformación de caña de azúcar mediante infección con *A. tumefaciens* con resultados desfavorables debido al sobrecrecimiento de la bacteria en la regeneración del cultivo posterior a la infección incluso con el uso de carbenicilina. El objetivo de este estudio fue evaluar el uso de Augmentin® como antibiótico para inhibir el crecimiento de *A. tumefaciens* en el proceso de regeneración de caña de azúcar y establecer una composición de antibiótico óptima para mejorar el proceso de transformación de caña de azúcar. Se llevó a cabo una evaluación del crecimiento de *A. tumefaciens* en medios suplementados con Augmentin® y carbenicilina para determinar la eficiencia de Augmentin® como inhibidor de *A. tumefaciens*; también se determinó el índice de regeneración del material vegetal en medios con distinta composición de antibióticos. Augmentin® es una alternativa viable para inhibir el crecimiento de *A. tumefaciens* en medio de regeneración de tejido vegetal y en el siguiente estudio se propone utilizar Augmentin® 250µg/mL y carbenicilina 250µg/mL en el proceso de regeneración de caña de azúcar. Se recomienda utilizar una composición sinérgica para evitar la aparición de resistencias.

I. INTRODUCCIÓN

La transformación de plantas es una técnica de ingeniería genética que aumenta en gran manera la eficiencia de los procesos de mejoramiento de cultivo. En Guatemala solamente se utilizan las técnicas de entrecruzamiento por genética tradicional para obtener variedades de caña de azúcar mejoradas para rasgos como resistencia a la desecación, mayor producción de azúcar y rápido crecimiento. Sin embargo, este proceso es muy lento y la mayor parte de veces no produce generaciones útiles.

Recientemente se ha trabajado en Guatemala con el proceso de transformación de caña de azúcar mediante la infección con *Agrobacterium tumefaciens* usando discos foliares como material vegetal con resultados desfavorables. Uno de los principales obstáculos es el sobrecrecimiento de *A. tumefaciens* durante la regeneración del material vegetal, cuyo crecimiento y supervivencia se ve en competencia por el crecimiento de *A. tumefaciens* durante el proceso de transformación.

Otras posibles técnicas para este proceso son la biolística y transformación de protoplasma; sin embargo, estas requieren de equipos más complejos aumentando considerablemente el costo del proceso. Por esta razón este proyecto se enfoca en mejorar el proceso de transformación con *A. tumefaciens*.

El proyecto consta de dos etapas, cuyo objetivo es evaluar el uso de Augmentin® como antibiótico para controlar el crecimiento de *A. tumefaciens* en el proceso de regeneración del material vegetal en la transformación de caña de azúcar y determinar una composición óptima de antibióticos (Augmentin® y/o carbenicilina) para el proceso.

La primera etapa consistió en determinar la composición de antibióticos óptima para la inhibición del crecimiento de *A. tumefaciens* mediante el cultivo de una solución de bacterias en placas de medio de regeneración de material vegetal sólido. La segunda etapa consistió en determinar la composición óptima de antibióticos para permitir una regeneración adecuada de caña de azúcar mediante la incubación de discos foliares de caña de azúcar en el medio de regeneración suplementado con los antibióticos.

Augmentin® es una alternativa adecuada para la inhibición de *A. tumefaciens* en el proceso de regeneración de caña de azúcar, presentando mayor índice de regeneración del material vegetal comparado con carbenicilina. La composición recomendada en el proyecto es Augmentin® 250µg/mL y carbenicilina 250µg/mL, evitando usar solo Augmentin® para evitar la generación de resistencias.

II. OBJETIVOS

A. GENERAL

Definir un protocolo con composición de antibiótico óptima para la inhibición de *Agrobacterium tumefaciens* y regeneración de caña de azúcar para mejorar el proceso de la transformación de caña de azúcar.

B. ESPECÍFICOS

- Determinar la composición de antibióticos óptima en el medio de regeneración de material vegetal para inhibir el crecimiento de *Agrobacterium tumefaciens*.
- Determinar la composición de antibióticos óptima en el medio de regeneración de material vegetal que permita la regeneración adecuada de caña de azúcar.
- Evaluar el uso de Augmentin® como antibiótico alternativo en la regeneración de caña de azúcar.

III. JUSTIFICACIÓN

La industria azucarera es de gran importancia económica en Guatemala; según el Banco de Guatemala, representó el 6.2% del capital total exportado por el país en el 2011 (Asazgua, 2012). Esta industria se basa en el cultivo de caña de azúcar, una planta monocotiledónea que almacena la energía en forma de sacarosa (azúcar de mesa). Actualmente, los ingenios azucareros se interesan por el uso de las mejores variedades de caña de azúcar con características como mayor rendimiento de azúcar, resistencia a herbicidas y la desecación (Scortecci *et al.*, 2012).

Las técnicas de mejoramiento de cultivos incluyen genética tradicional, mediante cruces de especies y selección de los mejores organismos; e ingeniería genética, que involucra la selección de genes específicos y su transferencia al cultivo de interés. Las técnicas de genética tradicional regularmente involucran trabajo de varios años (Scortecci *et al.*, 2012); la ingeniería genética disminuye considerablemente el tiempo de trabajo ya que se trabaja específicamente con el rasgo deseado (Curtis, 2004).

La transformación genética es la técnica que permite la introducción de genes exógenos a un organismo (Lewin *et al.*, 2011), al trabajar con plantas monocotiledóneas, la infección por *Agrobacterium* es una forma económica y sencilla de realizar este proceso, siendo *Agrobacterium tumefaciens* el vector más común (Alimohammadi *et al.*, 2009); que en conjunto con cultivo de tejidos agiliza el proceso mediante la regeneración del tejido tras la infección (Curtis, 2004). En Brasil, la Empresa Brasileña de Investigación Agropecuaria (EMBRAPA por sus siglas en portugués) desarrolló la primera caña de azúcar transgénica resistente a la desecación en el 2011 (Collares, 2011), con éxito en la cosecha (Food & Beverage Online, 2011); abriendo las puertas hacia la innovación y desarrollo de nuevos cultivos de caña de azúcar basados en la transgénesis.

Uno de los principales problemas en la regeneración del tejido es la contaminación por bacterias u otros organismos, debido a que los medios utilizados presentan muchos nutrientes; por lo que la eliminación de la contaminación constituye un paso primordial en el proceso. Por esta razón, se aplican tratamientos que eliminen la contaminación mediante el control de los microorganismos contaminantes (principalmente *Agrobacterium*), ya que esto aumenta la eficiencia de transformación y la sobrevivencia de los tejidos vegetales (Zhangsun *et al.*, 2007; Dan *et al.*, 2010; Joyce *et al.*, 2010); esto es de gran importancia e interés para la industria azucarera, ya que disminuiría las pérdidas de material vegetal, aumentando los éxitos de la regeneración permitiendo obtener cultivos mejorados más exitosamente.

IV. MARCO TEÓRICO

A. CAÑA DE AZÚCAR

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) es una planta de la familia de las Poaceas proveniente de Nueva Guinea y las islas vecinas, traída por primera vez a América por Cristóbal Colón. La caña de azúcar es una grama de hasta 5 metros de alto, las hojas son elongadas, aserradas, pubescentes, con nervadura prominente y en disposición alternada, presentan una vaina tubular, envolvente y pubescente que se une al limbo por el collar. La inflorescencia es en panículas largas, densas y plumosas de color plateado o rosado; las flores son bisexuales de un solo óvulo y pueden ser sésiles o pedunculadas y dan lugar a un fruto sumamente pequeño. La caña de azúcar moderna consiste en híbridos (Fauconnier y Bassereau, 1975; Melgar *et al.*, 2012; Williams y Nash, 1946). (Ver Figura1)

Figura 1. Esquema de la caña de azúcar.



(Adaptada de Williams y Nash, 1946).

La caña de azúcar se usa principalmente para la producción de azúcar; sin embargo, de su cultivo pueden obtenerse varios subproductos, entre ellos: material vegetal para alimentación animal y humana, fuente combustible y energética, y producción de alcohol o biocombustibles (GEPLACEAE, 1987). Se propaga por medio de estacas para optimizar el cultivo, aunque también pueden usarse las semillas (Fauconnier y Bassereau, 1975), usualmente el ciclo de la caña es:

Figura 2. Ciclo de cultivo de la caña de azúcar.



(Adaptado de Fauconnier y Bassereau, 1975).

En la industria azucarera, se utiliza el tallo de la caña de azúcar; el tamaño del mismo es inversamente proporcional al contenido de sacarosa. El proceso industrial se lleva a cabo en el período de maduración, ya que es ahí cuando se almacenan los compuestos energéticos (Fauconnier y Bassereau, 1975).

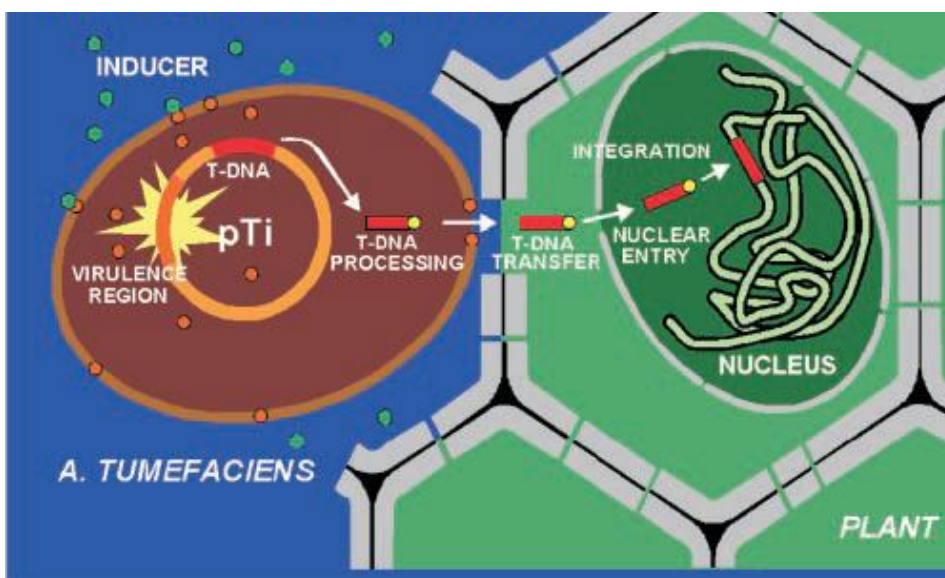
En Guatemala, la zona cañera se ubica en la costa sur en los departamentos de Retalhuleu, Suchitepéquez, Santa Rosa, Escuintla y Jutiapa (Melgar, 2012). Los factores que afectan la fisiología de la caña de azúcar son la temperatura, luz, humedad, viento y localización (Fauconnier y Bassereau, 1975).

B. AGROBACTERIUM TUMEFACIENS

Agrobacterium tumefaciens (actualmente llamada *Rhizobium radiobacter*) (UniProt, 2014) es una bacteria fitopatógena gram negativa, mesófila y de crecimiento rápido (Winans *et al.*, 1999). El nombre de *Agrobacterium tumefaciens* fue descrito por primera vez en 1907 por Smith y Townsend; sin embargo, en 1993 se propuso un cambio al sinónimo *Agrobacterium radiobacter* propuesto en 1902 por Beijerinck & van Delden el cual fue rechazado. No fue sino hasta 2001 cuando Young y colaboradores propusieron la transferencia de *A. tumefaciens*/*A. radiobacter* al género *Rhizobium* para eliminar cualquier conflicto aplicando *radiobacter* como el epíteto de *Rhizobium* (EUZÉBY, 2013), para mantener coherencia con las tecnologías desarrolladas con esta bacteria, se utilizará el nombre *A. tumefaciens*.

Tiene la capacidad de transferir ADN oncogénico al núcleo de las células vegetales que infecta (T-DNA). *A. tumefaciens* reconoce compuestos fenólicos y azúcares (inductores) producidos por un sitio de herida en la planta y migra a este; los compuestos actúan también como inductores de genes de virulencia contenidos en un plásmido (plásmido Ti) que activan el procesamiento y transferencia de genes inductores de tumores y productores de opinas hacia la planta [Ver Figura 3] (Valentine, 2003). Se ha reportado la presencia de beta-lactamasas en cepas de *A. tumefaciens*, codificadas plasmidialmente (Goodner *et al.*, 2001).

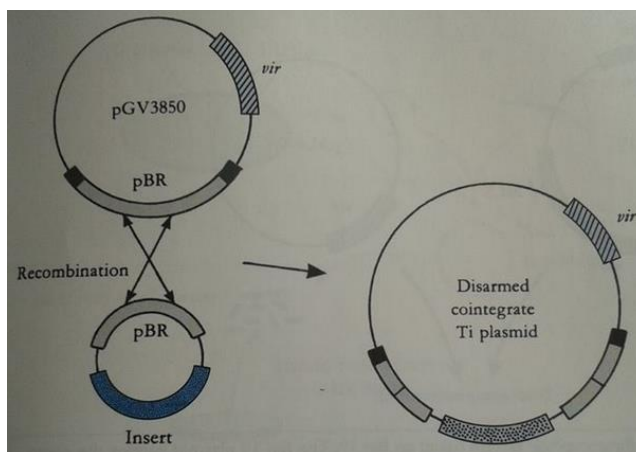
Figura 3. Transferencia de ADN desde *Agrobacterium* hacia el núcleo de las células vegetales.



(Adaptado de Valentine, 2003).

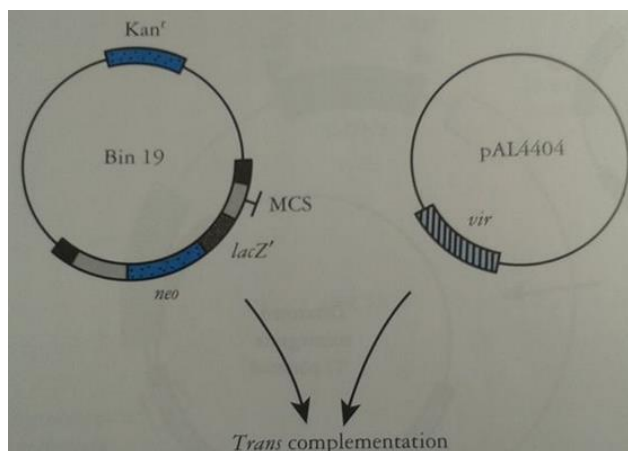
El plásmido Ti (del inglés “inductor de tumores”) tiene un tamaño de 140 a 235kb. Contiene secuencias que definen los bordes del segmento que es transferido hacia la planta; la supresión de los genes oncogénicos del plásmido permite la transferencia exitosa de genes dentro de los bordes descritos sin la formación de tumores en el material vegetal (Nicholl, 2008; Winans *et al.*, 1999; Zambryski *et al.*, 1983). Actualmente se usan dos enfoques para la transferencia génica por medio de plásmidos Ti: la cointegración, por medio de recombinación homóloga entre un plásmido basado en pBR322 y otro basado en un plásmido Ti se forma un plásmido Ti desarmado que permite la transferencia [Ver Figura 4]; y el sistema binario, que se basa en usar dos plásmidos en *A. tumefaciens* que juntos suplen la función del plásmido Ti desarmado [Ver Figura 5] (Nicholl, 2008).

Figura 4. Ejemplo de cointegración para la formación del plásmido Ti desarmado.



(Adaptado de Nicholl, 2008).

Figura 5. Ejemplo de un sistema binario del plásmido Ti desarmado (los dos mini plásmidos Ti se complementan para formar un plásmido Ti desarmado) mediante “Transcomplementación”.



(Adaptado de Nicholl, 2008).

C. TRANSFORMACIÓN DE PLANTAS

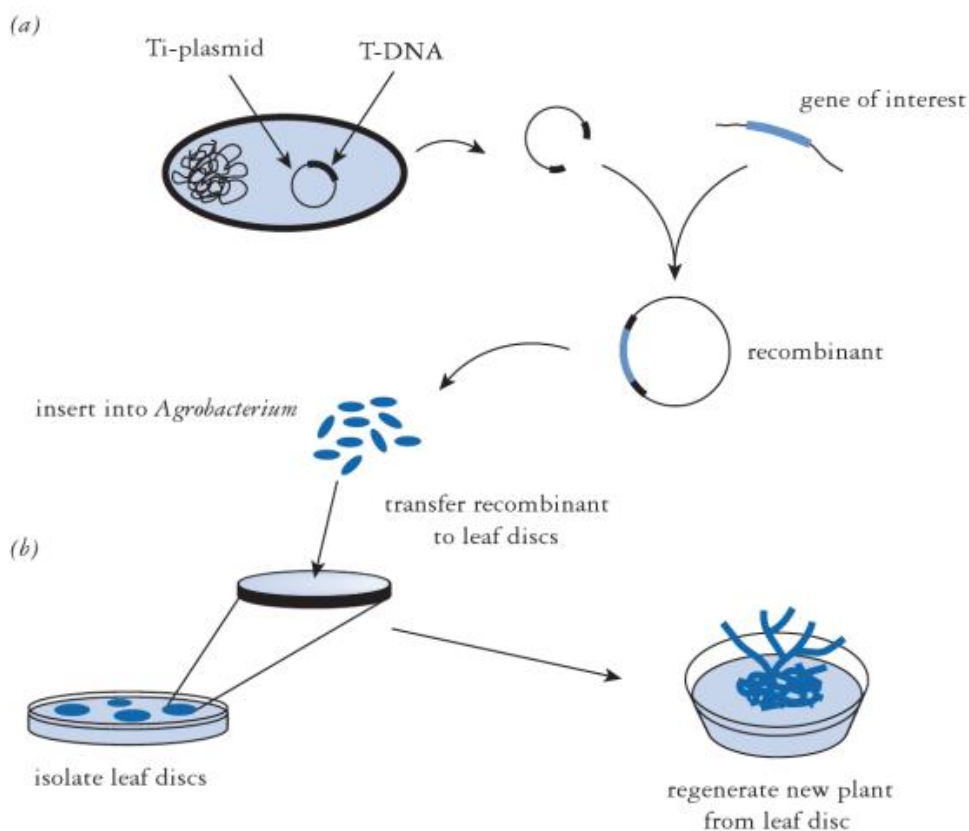
La transformación genética bacteriana es el proceso por el cual una bacteria competente incorpora ADN exógeno heredable que puede o no integrarse en el genoma; esta ocurre naturalmente en algunas especies pero también puede inducirse artificialmente en condiciones de laboratorio (Lorenz y Wackernagel, 1994). La transformación genética en plantas se basa en el mismo principio de incorporar genes exógenos, pero requiere del uso de vectores que modifiquen el ADN de la planta, tales como calumovirus, geminivirus o *Agrobacterium tumefaciens*. También pueden utilizarse técnicas de transferencia directa, mediante biolística (Anami *et al.*, 2013; Nicholl, 2008).

La transformación de plantas mediada por *A. tumefaciens* ha sido ampliamente utilizada en dicotiledóneas, ya que es un método rápido sencillo y eficiente de transformación (Arencibia *et al.*, 1998), cuyas ventajas incluyen la integración de bajo número de copias de los genes y largas secuencias de los mismos, permitiendo mayor estabilidad de expresión, reduciendo el silenciamiento inespecífico (Enríquez-Obregón *et al.*, 1997; Joyce *et al.*, 2010; Zhangsun *et al.*, 2007). Actualmente el método de *A. tumefaciens* ha sido aplicado a varias monocotiledóneas, entre ellas arroz y caña de azúcar (Arencibia *et al.*, 1998).

Una desventaja de la transformación mediada por *A. tumefaciens* es que naturalmente no infecta plantas monocotiledóneas (cereales y gramíneas), que constituyen los cultivos blanco para el mejoramiento (Nicholl, 2008). Varios compuestos pueden activar los genes de virulencia de *A. tumefaciens* (como la Acetosiringona), que aumentan la eficiencia de transformación y pueden en algunos casos posibilitar la transformación de monocotiledóneas. Se han reportado varios experimentos con transformaciones exitosas de caña de azúcar, trigo, arroz, sorgo y pasto varilla (Fursova *et al.*, 2012; Gelvin, 2003; Mann *et al.*, 2012; Sheikholeslam y Weeks, 1987; Zhangsun, 2007).

La transformación mediada por *A. tumefaciens* consta de tres pasos generales: a) Clonación del gen en un vector, b) Infección del material vegetal, y c) Regeneración de transformantes. El proceso requiere el uso de técnicas de cultivo de tejidos para la preparación del material vegetal previo a la infección y la regeneración posterior (Anami, *et al.*, 2013; Bent, 2000; Nicholl, 2008).

Figura 6. Esquema de transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de plantas a partir de discos foliares. a) Clonación del gen de interés en vector e infección del tejido vegetal por *A. tumefaciens*; b) Regeneración de transformantes putativos.



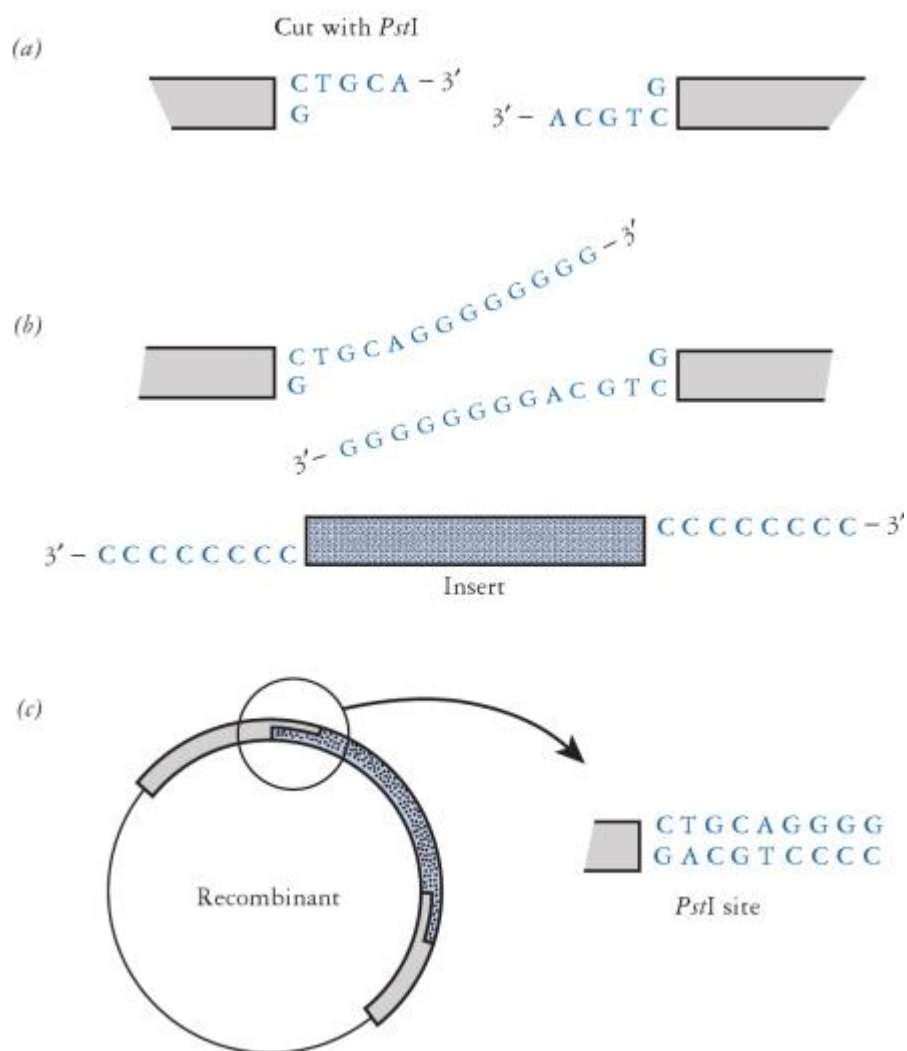
(Adaptado de Nicholl, 2008).

1. Clonación del gen en un vector. La finalidad de la transgénesis es transferir rasgos importantes a un organismo que anteriormente no los presenta (resistencia a herbicidas por ejemplo) codificados en genes. La clonación de un gen requiere de la formación de fragmentos de ADN que se unen a un vector para su propagación y selección. Estos fragmentos pueden generarse mediante síntesis de ADNc a partir de ARNm o por digestión con enzimas de restricción del ADN genómico. Otro enfoque es su producción por reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) si se conoce el gen (Curtis, 2004; Nicholl, 2008).

Una vez obtenidos los fragmentos de ADN estos deben ser unidos a un vector mediante su ligación con ADN Ligasa; según la forma en la que se obtuvo los fragmentos puede ser mediante ligación de extremos romos, ligación de extremos cohesivos y "Homopolymer tailing" [Figura7]. También pueden usarse adaptadores y linkers para convertir extremos

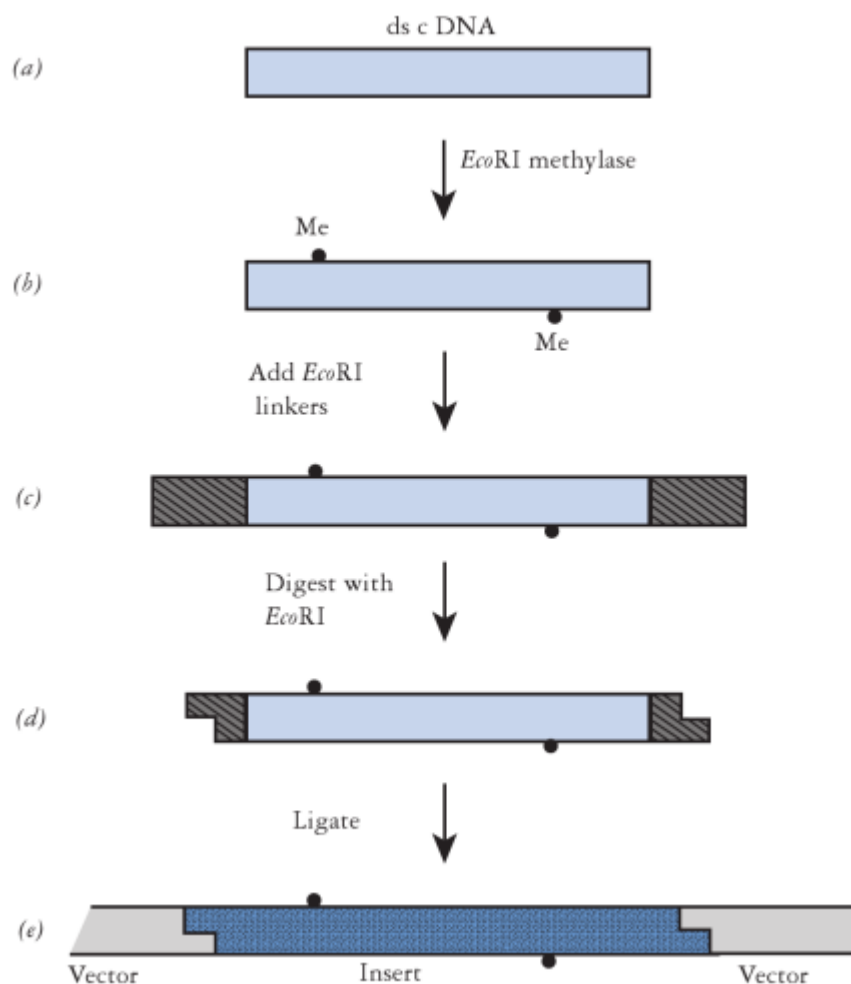
romos en extremos cohesivos [Figura8] (Nicholl, 2008). La clonación se realiza inicialmente en *Escherichia coli*, una vez que se confirmó la presencia del gen de interés y su amplificación en *E. coli*, se transfiere el vector con el gen a *A. tumefaciens* (Nicholl, 2008).

Figura 7. Ejemplo de Homopolymer tailing. a) El vector es cortado con *Pst*I; b) Utilizando transferasa terminal se agrega una terminación con residuos dG al vector y residuos dC al ADN a insertar; c) Utilizando ADN ligasa se ligan ambos fragmentos.



(Adaptado de Nicholl, 2008).

Figura8. Ejemplo del uso de linkers con EcoRI como enzima de restricción. A)El ADN de interés se trata con metilasa específica para la enzima de restricción; b)Los sitios de corte internos son protegidos; c)Se adicionan los linkers a los extremos del ADN mediante ligación con ADN ligasa; d)Al digerir con la enzima de restricción se obtienen los extremos cohesivos que e)se ligan al vector mediante ADN Ligasa.



(Adaptado de Nicholl, 2008).

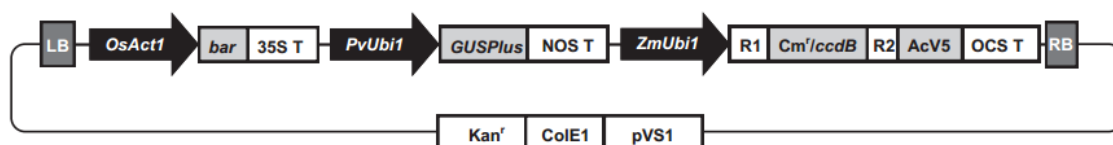
Los vectores utilizados en la transformación mediada por *A. tumefaciens* son los vectores binarios, consistentes en el plásmido Ti sin la región de transferencia y un plásmido basado en vectores de clonación de *E. coli* o vectores Gateway. El sistema de clonación Gateway explota el sistema de recombinación del fago lambda (λ) utilizando un vector donador y un vector receptor; el vector receptor con el ADN clonado se convierte en el vector de destino (Anami *et al.*, 2013; Mann *et al.*, 2012). Los vectores Gateway utilizan un cassette attR1-Cm^r-ccdB-attR2 que consiste en los sitios de recombinación flanqueando el gen de resistencia a Cloranfenicol (Cm^r) (Mann *et al.*, 2012) y un gen codificante para una proteína que interfiere

con la ADN girasa que sirve como selección negativa (*ccdB*) permitiendo que solo *E. coli* con un vector conteniendo ADN clonado sobreviva (Anami *et al.*, 2013).

El vector que se utilizará en el proyecto es un vector Gateway de la serie pANIC (nombrados así por *Panicum virgatum*, el pasto varilla), específicamente pANIC 6E. Los vectores pANIC tienen promotores eficientes para plantas monocotiledóneas, contrario al promotor 35S del virus del mosaico de coliflor (CaMV), comúnmente usado en transformación de dicotiledóneas, con menor expresión en monocotiledóneas (Mann *et al.*, 2012).

El vector pANIC 6E contiene resistencia a Kanamicina como marcador de selección bacteriana. La selección en planta presenta más marcadores: resistencia a bialaphos, un agente herbicida con fosfotricina como compuesto activo (también puede utilizarse glufosinato y su presentación comercial BASTA®; sistema GUSPlus™ como gen reportero (gen de la proteína beta-glucuronidasa optimizada para ensayos enzimáticos de expresión en plantas con X-glcA como sustrato y un color azul como el resultado); y, la presencia del epítipo AcV5 para ensayos inmunoserológicos (CambiaLabs, s.f.; Dennehey *et al.*, 1994; Mann, 2012).

Figura9. Diagrama del vector pANIC6E para sobreexpresión. LB: borde izquierdo; OsAct1: promotor de Actina1 de *Oryza sativa*; bar: gen de resistencia a bialaphos; 35S T: secuencia terminadora 35S; PvUbi1: promotor de poliubiquitina 1 de *P. virgatum*; GUSPlus: secuencia del sistema GUSPlus™; NOS T: secuencia terminadora de la sintasa de nopalina; ZmUbi1: promotor de ubiquitina 1 de *Zea mays*; R1 y R2: sitios de recombinación; Cm^r: gen de resistencia a cloranfenicol; ccdB: gen de toxina que ataca ADN girasa; AcV5: epítipo; OCS T: secuencia terminadora de la sintasa de opalina; RB: borde derecho; Kan^r: gen de resistencia a kanamicina; ColE1: origen de replicación en *E. coli*; pVS1: origen de replicación en *A. tumefaciens*.



(Adaptado de Mann, 2012).

El último paso en la clonación del gen es la transformación de *A. tumefaciens* con el plásmido que contiene los bordes del T-DNA, esto puede hacerse mediante shock térmico o electroporación con las respectivas bacterias competentes [Ver protocolos en el sitio de Pikaard Laboratory].

2. **Infección del material vegetal.** Una vez *A. tumefaciens* contiene tanto el plásmido Ti sin T-DNA como el plásmido que contiene la región de transferencia, se lleva a cabo la infección del material vegetal con la bacteria y el posterior co-cultivo del material vegetal infectado. Este proceso depende del material vegetal utilizado y suele llevarse a cabo en oscuridad (Anami *et al.*, 2013; Zhangsun *et al.*, 2007). El método de inmersión floral (Floral Dip) involucra la sumersión de las flores en una solución de *A. tumefaciens* y las plantas transformadas son seleccionadas a partir de las semillas sin el uso de cultivo de tejidos (Bent, 2000).

3. **Regeneración de transformantes.** El último paso en la transformación de plantas es la regeneración del tejido vegetal infectado mediante técnicas de cultivo de tejidos para la obtención de plantas desarrolladas y la selección de las transformadas mediante marcadores de selección en el vector utilizado (Nicholl, 2008).

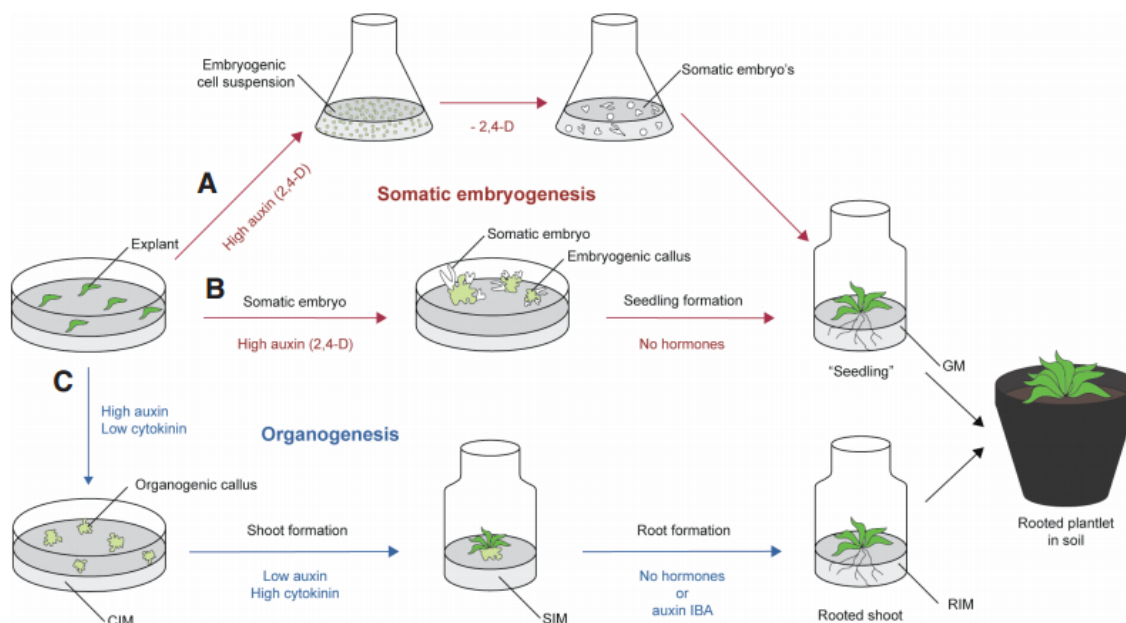
Los explantes utilizados en la transformación pueden regenerarse mediante embriogénesis somática u organogénesis. La embriogénesis somática consiste en la formación de embriones a partir de células somáticas de la planta mediante la aplicación de altas concentraciones de auxinas, en caña de azúcar se puede utilizar 2,4-D. La organogénesis consiste en la formación de callo a partir del tejido vegetal para inducir la competencia organogénica; a continuación se induce la formación de brotes y raíz a partir del callo [Figura 10] (Anami *et al.*, 2013; Arencibia *et al.*, 1998). Kalunke y colaboradores (2009) desarrollaron un método de regeneración de caña de azúcar transgénica en un solo paso mediante el uso de 2,4-D en el co-cultivo y su ausencia en la regeneración, sin embargo las plántulas obtenidas fueron quimeras y no crecían por completo.

El cultivo de tejidos del material vegetal debe realizarse en un medio específico que cumpla con los requerimientos nutricionales de una célula vegetal, además de instalaciones adecuadas que proporcionen los estímulos ambientales necesarios (como luz y temperatura) para la regeneración del tejido. El medio utilizado es el formulado por Murashige y Skoog en 1962 cuya composición puede observarse en los Anexos (Murashige *et al.*, 1962).

Durante el proceso de regeneración en la transformación de discos foliares de caña de azúcar, estos son transferidos a medio MS0.6 tras un lavado triplicado en agua destilada estéril (Snyman *et al.*, 2006). Estudios previos (no publicados) realizados durante el año 2013 en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Universidad del Valle de Guatemala identificaron un punto crítico en este proceso; durante la regeneración del material vegetal, *A. tumefaciens* presentaba un sobrecrecimiento en el medio que llevaba a la invasión del tejido

vegetal evitando su crecimiento, problema que hoy en día sigue presentándose en los experimentos de transformación realizándose en la Estación Experimental de CENGICAÑA.

Figura10. Regeneración de material vegetal mediante cultivo de tejidos. A: embriogénesis somática en cultivo líquido; B: embriogénesis somática mediante cultivo de callo, los embriones se cortan para la formación de la plántula; C: regeneración por organogénesis.



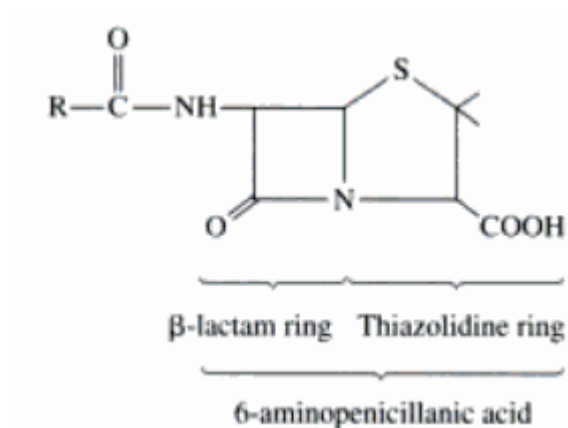
(Adaptado de Anami *et al.*, 2013).

D. ANTIBIÓTICOS

Los antibióticos comúnmente utilizados para inhibir *A. tumefaciens* son la timentina y carbenicilina (Joyce *et al.*, 2010; Snyman *et al.*, 2006; Zhangsun *et al.*, 2007). Timentina es un antibiótico compuesto de ticarcilina (una penicilina) y ácido clavulánico (GlaxoSmithKline, 2013), cuyo uso no está aprobado en Guatemala, su compra requiere de muchos trámites costosos y que requieren tiempo, por lo que se utilizará Augmentin®.

Los beta-lactámicos inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana mediante su unión a las proteínas de unión a la penicilina (PBPs por sus siglas en inglés), evitando que estas enzimas realicen los entrecruzamientos entre peptidoglicanos gracias a su similitud estructural con el péptido terminal D-alanil-D-alanina en los pentapéptidos del peptidoglicano. Los beta-lactámicos más famosos son las penicilinas [Figura11] (Lemke *et al.*, 2013; Roberts *et al.*, 1996).

Figura11. Estructura base de las penicilinas. El anillo betalactámico se encuentra fusionado a un anillo de tiazolidina con una cadena lateral unida mediante un enlace amida.



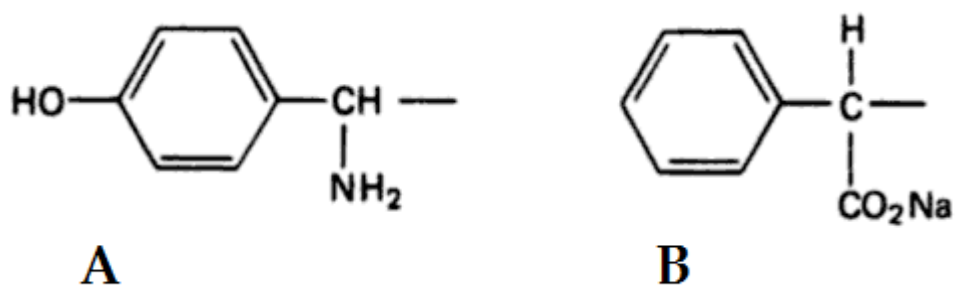
(Adaptado de Craig *et al.*, 2004).

1. Carbenicilina. Se encuentra contenida dentro del grupo de las penicilinas antipseudomonas. Su administración no incluye el ácido clavulánico, por lo que no actúa contra bacterias que presentan beta-lactamasas (Roberts *et al.*, 1996).

2. Augmentin®. Augmentin® es un agente antibiótico compuesto por amoxicilina y ácido clavulánico en una composición de 5:1. La amoxicilina es un beta-lactámico de la familia de las aminopenicilinas análogo a la ampicilina. La adición del ácido clavulánico aumenta el espectro de actividad a organismos que sintetizan beta lactamasas debido a su actividad de inhibidor irreversible de muchas beta-lactamasas [Figura13] (GlaxoSmithKline, 2013; Lemke *et al.*, 2013).

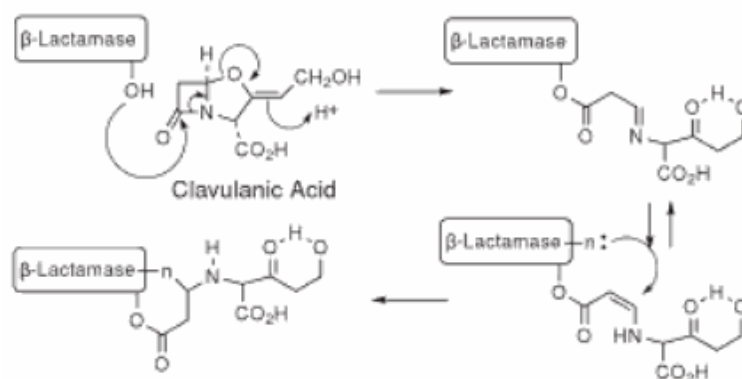
Augmentin® ha sido utilizado como antibiótico alternativo para suprimir el crecimiento de *A. tumefaciens* en el proceso de regeneración de material vegetal tras la transformación en tomate y en el crecimiento de callo de arroz índica (Ieamkhang *et al.*, 2005; Pérez *et al.*, 2013).

Figura12. Cadenas laterales de amoxicilina (A) y carbenicilina (B). Las cadenas laterales otorgan a las penicilinas el distinto espectro, estabilidad y cinética.



(Adaptado de Scholar y Pratt, 2000).

Figura13. Posible mecanismo para la inhibición irreversible de las β -lactamasas por el ácido clavulánico.



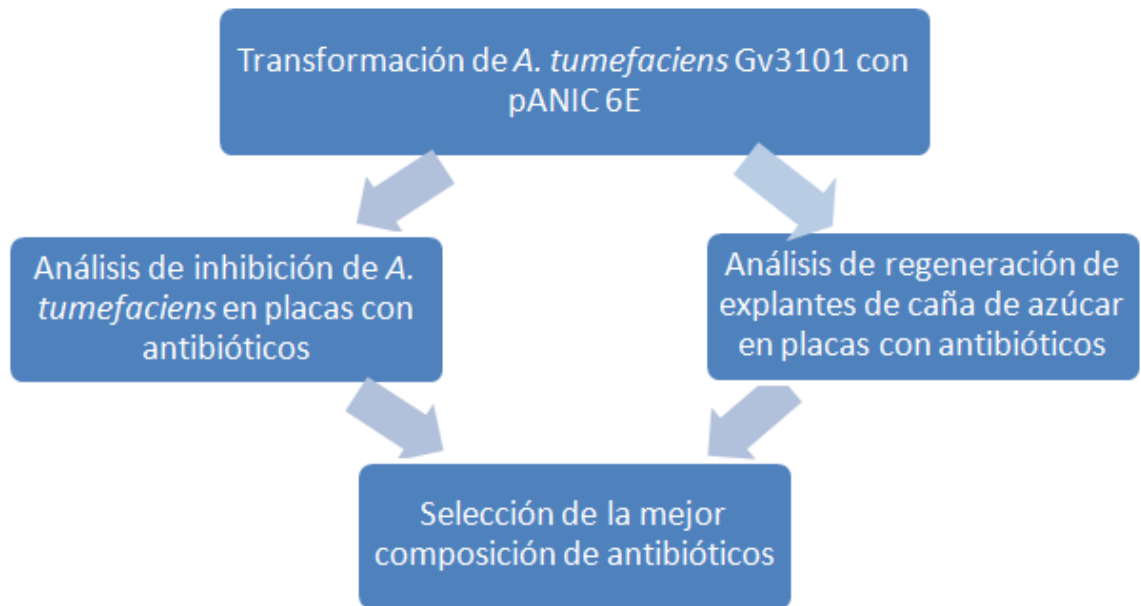
(Adaptado de Lemke *et al.*, 2013).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

A. PROCEDIMIENTO

El procedimiento del proyecto se resume en el siguiente diagrama de flujo:

Figura14. Diagrama de flujo de la metodología del proyecto



1. Composición de medios de cultivo utilizados

- a. Medio YEP: 10g/L extracto de levadura, 10g/L peptona y 5g/L NaCl; llevar a pH 7.0 y autoclavar. Si es sólido se debe agregar 7.5g/L Agar-Agar
- b. MS0.6: 4.3g/L Murashige and Skoog (MS) salts, 1X Gamborg's vitamin solution, 30g/L sacarosa, 0.6mg/L 2,4D y 10g/L Agar-Agar; llevar a pH 5.8 y autoclavar.

2. Preparación de antibióticos

- a. Carbenicilina: Preparar solución stock de 100mg/mL con agua destilada y filtrar con 0.2µm. Refrigerar a -20°C.
- b. Augmentin (Amoxicilina + ácido clavulánico): Preparar solución stock de 50mg/mL y filtrar con 0.2µm. Usar fresco (GlaxoSmithKline, 2013).

3. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*. Se utilizó el procedimiento descrito en un sitio de la Universidad de Indiana (Pikaard, s.f.) para la cepa *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 para insertar el plásmido pANIC 6E. Se modificó el medio utilizado para el crecimiento (LB) por YEP. Para confirmar la transformación se extrajo el ADN plasmidial del producto de transformación y se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE durante 45 minutos a 100 voltios; como tinte de ADN se adicionó a cada muestra Gel Red en una concentración de 30X. Se visualizó en un transiluminador con luz UV.

4. Cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*. Se inoculó una colonia de *A. tumefaciens* transformada con pANIC 6E a un tubo con 5mL de medio YEP y se dejó incubando overnight a 28°C y 250rpm. Se sembró 0.5mL de la solución de bacterias en las placas de MS0.6 del experimento adicionando 0.5mL de medio YEP para diluir.

5. Cultivo del Material Vegetal (Caña de azúcar). Los explantes de caña de azúcar fueron transferidos al medio MS0.6 con las composiciones experimentales de antibiótico durante dos semanas a 18°C con fotoperíodo de 16h.

6. Conteo bacteriano. Se contó el número de colonias de *A. tumefaciens* utilizando un contador bacteriano, el dato se reportó en Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

7. Análisis de material vegetal. Después de dos semanas de incubación, los explantes fueron observados para detectar crecimiento de brotes. La presencia de brotes se consideró como un explante regenerado. Además se analizó la cantidad de brotes por explante que se reportó como un número entero de 1 a 3; donde 1 es tres o menos brotes por explante, 2 es de 4 a 10 brotes por explante, y 3 es más de 10 brotes por explante.

8. Experimentación. El experimento consistió en dos fases: la primera es la inhibición de *Agrobacterium tumefaciens* mediante el uso de antibióticos; la segunda es la regeneración de la caña de azúcar en medios con antibióticos.

a. Primera fase: se trabajó con una placa de cada concentración por cada antibiótico. Se realizaron tres réplicas. El control negativo fue una placa sin antibiótico. El control positivo fue una placa sin bacterias.

b. Segunda fase: para determinar si el antibiótico y la concentración utilizada no interferirán con el desarrollo de la caña de azúcar, se debe realizar el mismo procedimiento de la primera fase, con el material vegetal. Se trabajó un número variable de discos por nivel. El control negativo fue una placa sin antibiótico.

B. RECURSOS HUMANOS

1. **Tesista:** Luis David Archila Dubón, estudiante de quinto año de la Licenciatura en Bioquímica y Microbiología, practicante y tesista del área de Biotecnología del Centro de Estudios en Biotecnología de la Universidad del Valle de Guatemala campus Central.

2. **Asesora:** Dra. Pamela Pennington, Catedrática del departamento de Bioquímica y Microbiología del campus central de la Universidad del Valle de Guatemala. Investigadora del Centro de Estudios en Biotecnología y del Centro de Estudios en Salud. Especialista en el área de Fisiología y Biología Molecular Bacteriana.

3. **Asesor:** Dr. Julien Assali, Catedrático del departamento de Bioquímica y Microbiología del campus central de la Universidad del Valle de Guatemala. Investigador del Centro de Estudios en Biotecnología y especialista en el área de Biología Molecular y Biotecnología de Plantas.

C. RECURSOS MATERIALES Y FINANCIEROS

Cuadro1. Presupuesto del proyecto de investigación

Descripción	Monto	Monto	Monto
	a Financiar	Contrapartida	Total
PUBLICIDAD, IMPRESIÓN Y ENCUADERNACIÓN			
Impresión, encuadernación y reproducción	Q500.00		Q500.00
PRODUCTOS DE PAPEL, CARTÓN E IMPRESOS			
Papel de escritorio	Q500.00		Q500.00
PRODUCTOS QUÍMICOS Y CONEXOS			
Elementos y compuestos químicos		Q10,000.00	Q10,000.00
Insecticidas, fumigantes y similares	Q250.00		Q250.00
Productos medicinales y farmacéuticos		Q7,500.00	Q7,500.00
OTROS MATERIALES Y SUMINISTROS			
Útiles de oficina	Q500.00		Q500.00
Útiles de limpieza y productos sanitarios		Q350.00	Q350.00
Útiles menores médico-quirúrgicos y de laboratorio		Q30,000.00	Q30,000.00
TOTAL	Q1,750.00	Q52,635.00	Q54,385.00

D. CRONOGRAMA

Cuadro2. Calendarización de actividades del proyecto

Actividad	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
Transformación <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	X					
Crecimiento <i>A. tumefaciens</i> en placas con antibióticos		X				
Crecimiento caña de azúcar en placas con antibióticos		X	X	X	X	

E. ENFOQUE DE INVESTIGACIÓN

Se sigue un enfoque cuantitativo ya que involucra el uso de variables de investigación, en este caso la concentración de antibióticos para evaluar la inhibición de *A. tumefaciens* y regeneración de caña de azúcar.

F. TIPO DE INVESTIGACIÓN

Correlacional, ya que se pretende establecer una relación entre la composición de antibióticos y la inhibición de *A. tumefaciens* y la regeneración de caña de azúcar.

G. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

Es un diseño experimental puro, ya que hay una manipulación de variables asignadas a un grupo experimental y un grupo control de manera aleatoria.

H. POBLACIÓN O UNIVERSO DEFINIDO

La cepa de *A. tumefaciens* utilizada es GV3101, transformada con plásmido pANIC 6E. El material vegetal fueron discos foliares de caña de azúcar variedad CG03-025 que son propagados en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Estación Experimental del Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar (CENGICAÑA).

I. MUESTRA

Se trabajó con un cultivo líquido de *A. tumefaciens* proveniente de una sola colonia aislada de la transformación con pANIC 6E. Se utilizó un total de 8 unidades experimentales de discos foliares por réplica; cada unidad experimental constaba de un bote con una cantidad variable de material vegetal (entre 4 y 9 explantes). Los discos foliares provienen del Laboratorio de Cultivo de Tejidos de CENGICAÑA y fueron cultivados durante dos semanas en medio MS con 2,4-D, sembrados específicamente para este experimento.

J. HIPÓTESIS DE TRABAJO

La combinación de amoxicilina y ácido clavulánico tiene un mayor porcentaje de regeneración de explantes de caña de azúcar en relación al tratamiento con carbenicilina.

K. ANÁLISIS DE RESULTADOS

En la inhibición de *A. tumefaciens*, se contó el número de UFC creciendo al finalizar la incubación y el resultado obtenido se comparó con el control sin antibiótico. No fue necesario ningún análisis posterior.

Los resultados de la regeneración de los explantes de caña de azúcar fueron analizados mediante un "Índice de Regeneración (I_R)" que considera tanto el porcentaje de regeneración como la cantidad de brotes por explante en proporciones similares:

$$I_R = \frac{(\%Regeneración)}{10} + [(Brotos por explante) * 3.3]$$

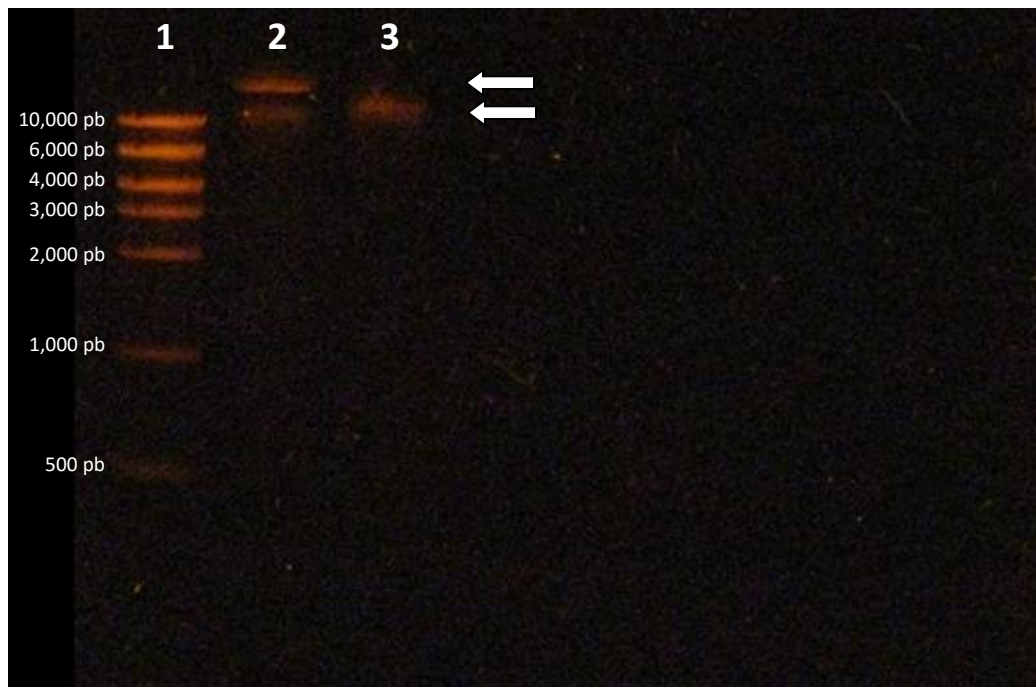
Se trabajó con tres réplicas para determinar si los resultados son estables y precisos. Para determinar si hay diferencias significativas entre los tratamientos se utilizó un Análisis de Varianza y posteriormente se aplicó una prueba Tukey para determinar individualmente que tratamientos son significativamente distintos entre sí.

VI. RESULTADOS

A. TRANSFORMACIÓN DE *A. TUMEFACIENS*

El gel de la extracción de ADN plasmidial del producto de transformación (teóricamente *A. tumefaciens* con plásmido pANIC6E) presenta dos bandas, una a nivel de 10,000pb y la otra por encima de la escalera (10,000pb) [flechas en Figura15]:

Figura15. ADN plasmidial extraído de *A. tumefaciens* transformada con pANIC6E. Pozo1: Mass DNA Ladder de New England BioLabs; Pozo2: extracción ADN plasmidial *A. tumefaciens* con pANIC6E; Pozo3: extracción ADN plasmidial *A. tumefaciens* con pEGAD.



B. INHIBICIÓN DE *A. TUMEFACIENS*

No se obtuvo crecimiento de *A. tumefaciens* transformada con pANIC6E en ninguna de las condiciones aplicadas.

Cuadro3. Inhibición de *A. tumefaciens* en MS0.6 con antibióticos

Concentración de antibiótico	Número de UFC de <i>A. tumefaciens</i>
Augmentin 250 µg/mL	0
Augmentin 500 µg/mL	0
Carbenicilina 250 µg/mL	0
Carbenicilina 500 µg/mL	0

C. REGENERACIÓN DE EXPLANTES DE CAÑA DE AZÚCAR

Después de dos semanas de incubación se analizaron los explantes de caña de azúcar obteniéndose los siguientes resultados:

Cuadro4. Regeneración de explantes de caña de azúcar en MS0.6 con antibióticos

Composición de antibióticos	Porcentaje de regeneración	Brotos por explante
Sin antibiótico [‡]	56±49%	1.7±1.5
A 250 µg/mL	90±9%	3.0±0
A 500 µg/mL	69±5%	3.0±0
A 250 µg/mL & C 250 µg/mL	64±13%	2.0±0
A250 µg/mL & C 500 µg/mL	35±14%	1.3±0.6
A 500 µg/mL & C 250 µg/mL	73±9%	1.3±0.6
A 500 µg/mL & C 500 µg/mL	46±4%	1.7±0.6
Kanamicina 50 µg/mL [‡]	58±40%	2.0±1.7

A = Augmentin; C = Carbenicilina.

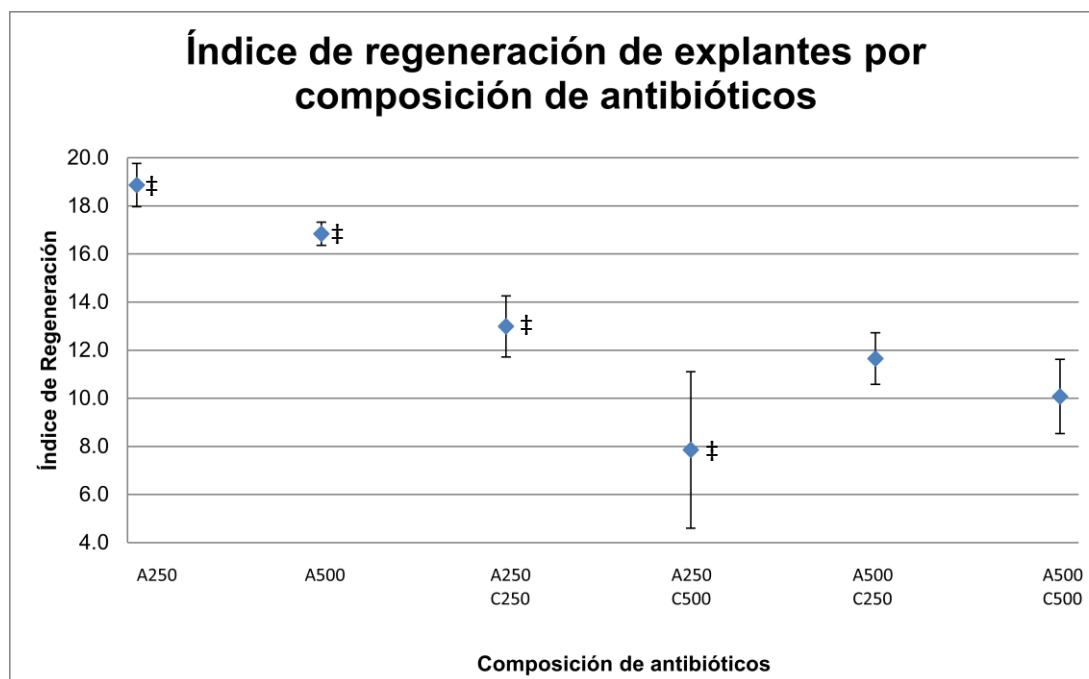
[‡]Una de las réplicas presentó altos niveles de contaminación [Figuras 26 y 27]

Cuadro5. Índice de regeneración (I_R) de caña de azúcar con cada condición

Composición de antibióticos	I_R
A 250 µg/mL	18.9±0.9
A 500 µg/mL	16.8±0.5
A 250 µg/mL & C 250 µg/mL	13.0±1.3
A250 µg/mL & C 500 µg/mL	7.9±3.3
A 500 µg/mL & C 250 µg/mL	11.7±1.1
A 500 µg/mL & C 500 µg/mL	10.1±1.5

A = Augmentin; C = Carbenicilina.

Figura16. Índice de regeneración de caña de azúcar con cada composición de antibióticos. Gráfico generado en Microsoft Excel 2007.

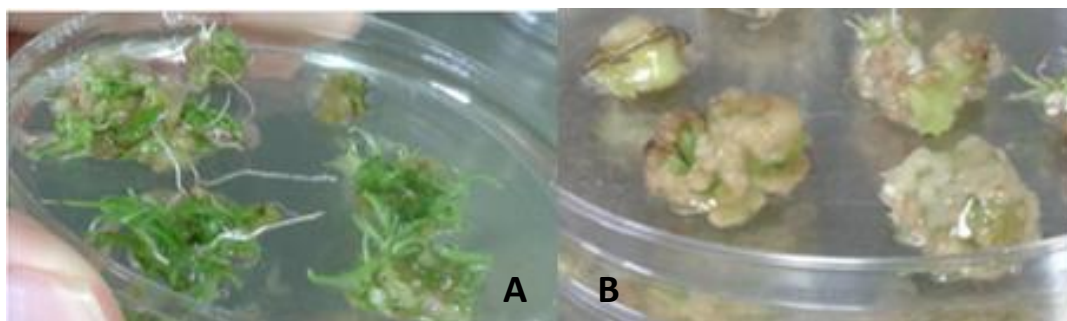


A = Augmentin; C = Carbenicilina. Los números indican la concentración en $\mu\text{g/mL}$

Las barras de error provienen de un triplicado. Hay una diferencia significativa en los promedios.

‡ Los datos son significativamente diferentes entre si. Análisis de dos colas con $\alpha=0.05$

Figura17. Explantes de caña de azúcar regenerados (A) y no regenerados (B) tras dos semanas de incubación



VII. DISCUSIÓN

A. TRANSFORMACIÓN DE *A. TUMEFACIENS*

Las condiciones de electroporación fueron óptimas y no se observó chispa durante el pulso eléctrico. En ambas diluciones el crecimiento fue muy alto, por lo que no pudo obtenerse la eficiencia de transformación, sin embargo, el crecimiento en los antibióticos de selección y la presencia del plásmido de interés (la banda por encima de las 10,000pb en la Figura15) confirman la transformación de *A. tumefaciens*. La cepa GV3101 no es sensible a ccdB (a diferencia de la cepa LB4404), lo cual permitió llevar a cabo el experimento con el vector vacío (a pesar de ser un vector Gateway) (Mann *et al.*, 2012; Thermo Fisher Scientific Inc, 2014).

Es probable que la segunda banda (alrededor de las 10,000pb) sea debido a la degradación del plásmido debido a un nick que pudo ocasionar un enrollamiento que aparentó un tamaño menor.

B. INHIBICIÓN DE *A. TUMEFACIENS*

La primera etapa del experimento consistió en determinar diferencias en la inhibición del crecimiento de *A. tumefaciens* por parte de Augmentin® comparado con Carbenicilina, esto para evaluar el uso de Augmentin® como alternativa para evitar el sobrecrecimiento de *A. tumefaciens* en la regeneración del tejido vegetal en la transformación.

Como se puede observar en la sección de resultados, los cuatro tratamientos aplicados inhibieron por completo el crecimiento de *A. tumefaciens* transformada con pANIC 6E; el control sin antibióticos presentó crecimiento masivo de la bacteria, por lo que se descarta la opción de pérdida de viabilidad del cultivo, además el cultivo líquido presentó un aumento en la turbidez tras la incubación Overnight confirmando el crecimiento de las bacterias. Ya que no hubo crecimiento en ninguna de las condiciones, no se realizó el experimento con combinaciones de antibióticos.

El resultado obtenido indica que no hay diferencia en la inhibición de *A. tumefaciens* para las concentraciones de antibiótico aplicadas al crecimiento en placa de la bacteria, por lo que Augmentin® es igual de eficiente que carbenicilina para la inhibición de *A. tumefaciens* transformado con pANIC 6E. Tomando en cuenta esta prueba, la elección del antibiótico depende del precio, disponibilidad y facilidad de uso.

C. REGENERACIÓN DE EXPLANTES DE CAÑA DE AZÚCAR

La segunda etapa del experimento fue determinar cómo afectan los antibióticos la regeneración de los discos foliares de caña de azúcar. Los discos foliares estuvieron sometidos a una incubación en oscuridad durante dos semanas en presencia de 2,4D (Molina *et al.*, 2012), encontrándose en la condición utilizada por CENGICAÑA para la infección con *A. tumefaciens*, siendo este el punto en el que se desea controlar el crecimiento de la bacteria mencionada.

Se probó el crecimiento en kanamicina para evaluar el uso de este antibiótico como presión de selección de *A. tumefaciens* transformada con pANIC 6E durante el cocultivo (período en el que se desea que la bacteria crezca). Sin embargo, la concentración utilizada fue demasiado baja, por lo que las cajas presentaron contaminación.

Para determinar la regeneración de los explantes se midió el porcentaje de regeneración del material vegetal y la cantidad de brotes por explante que se obtuvo al finalizar el período de incubación. Se utilizaron estos dos parámetros debido a que el proceso de transformación de caña de azúcar reporta porcentajes de eficiencia muy bajos (Arencibia *et al.*, 1998; Joyce *et al.*, 2010; Zhangsun *et al.*, 2007), por lo que no solo es importante obtener explantes regenerados, sino que además que estos explantes den lugar a una mayor cantidad de plántulas para aumentar el número de organismos putativamente transformados y asegurar el éxito de la transformación.

El índice de regeneración da una idea más completa sobre la regeneración de los explantes de caña de azúcar ya que toma en cuenta tanto el porcentaje de regeneración como la cantidad de brotes por explantes en niveles similares, lo que permitió realizar una mejor comparación de las condiciones utilizadas para la regeneración del material vegetal.

Los datos obtenidos para el porcentaje de regeneración y para el número de brotes por explante [Cuadro4] presentan una diferencia significativa según el ANOVA realizado [Cuadros 7 y 8]; por lo que se procedió a aplicar el índice de regeneración para cada tratamiento [Cuadro5]. Estos datos también parecen ser significativamente diferentes según el ANOVA realizado [Cuadro9].

Dos de los controles negativos (medio MS0.6 sin antibióticos) presentaron contaminación leve y uno presentó alta contaminación que impidió la regeneración de los explantes [Figuras 25 y 26]; el medio con 50µg/mL de Kanamicina presentó los mismos resultados [Figura27] por esta razón estas dos condiciones no se tomaron en cuenta para los ANOVAs. Además,

esto explica los valores tan altos de la desviación estándar para estos resultados. La contaminación se debe a la falta de selección debido a la ausencia de antibióticos en el control y a la baja concentración de kanamicina.

De no haberse contaminado las muestras mencionadas anteriormente, probablemente se habría regenerado un mayor porcentaje de los explantes; sin embargo, los resultados fueron consistentes, ya que se observó contaminación en los mismos tratamientos. Esto indica que el uso de antibióticos es imperativo en el proceso de regeneración de los explantes de caña de azúcar, al menos en las condiciones experimentales del laboratorio de la estación experimental de CENGICAÑA.

Una vez que el resultado del ANOVA indicó que hay una diferencia significativa entre las medias de los índices de regeneración, se procedió a analizar individualmente que muestras son significativamente distintas entre sí mediante el análisis de Tukey [Figura10]; el cual indica que no hay una diferencia significativa entre los resultados sinérgicos de nivel alto de Augmentin®.

Se puede observar que la presencia de carbenicilina tiene un efecto negativo en la regeneración de los explantes, como se muestra en la disminución de los índices de regeneración de los explantes incubados en medio con carbenicilina [Figura16]. El dato correspondiente al nivel bajo de Augmentin® con nivel alto de Carbenicilina presenta una desviación estándar alta, y el promedio obtenido es además el más bajo de todo el experimento.

D. OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE ANTIBIÓTICOS

El objetivo del experimento fue la optimización de la composición de antibióticos en el medio de regeneración de los explantes de caña de azúcar tras la infección con *A. tumefaciens* durante el proceso de transformación de discos foliares de caña de azúcar. Durante la incubación del material vegetal tras la infección, se espera que este pueda regenerarse y además de lugar a varios brotes nuevos para aumentar el número de organismos putativamente transformados y así incrementar la probabilidad de éxito de la transformación; por esta razón, el medio de regeneración debe permitir la regeneración de los explantes y evitar el sobrecrecimiento de *A. tumefaciens*, ya que la bacteria puede aumentar la mortalidad de los tejidos.

Zhangsun y colegas (2007) utilizan carbenicilina 500µg/mL para la eliminación de *A. tumefaciens* en el proceso de regeneración; experimentos previos (datos no publicados)

realizados en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Universidad del Valle de Guatemala y en la Estación Experimental de CENGICANA reportan contaminación bacteriana incluso con la concentración de carbenicilina utilizada, además de porcentajes de regeneración menores al 50% (dato provisto por el Ingeniero Molina). La carbenicilina tiene un alto costo, mayor que Augmentin®, y aunque ambos antibióticos tienen el mismo blanco de acción, son de distinto espectro; por lo que la sinergia podría resultar útil. El ácido clavulánico presente en Augmentin® puede además aumentar la eficacia de este antibiótico, haciéndolo una buena alternativa para la regeneración (leamkhang *et al.*, 2005).

Tomando en cuenta la concentración reportada (500µg/mL) para carbenicilina, se decidió usar esta concentración y la mitad para probar ambos antibióticos en la primer parte del experimento. Según el resultado obtenido, no hay diferencia entre la inhibición del crecimiento de *A. tumefaciens* para la composición de antibióticos, por lo que podría utilizarse los niveles bajos de cualquiera de los antibióticos; sin embargo, la inhibición de *A. tumefaciens* no es el único punto que debe tomarse en cuenta.

Como se mencionó anteriormente, es necesario asegurar que los explantes transformados puedan regenerarse exitosamente y den lugar a varias plántulas. El índice de regeneración toma en cuenta estos dos factores, dando una visión más completa sobre la regeneración de los explantes. Los índices de regeneración más altos son los obtenidos en los medios solo con Augmentin®, este antibiótico parece ser una mejor alternativa que carbenicilina en cuanto a la regeneración del tejido vegetal; sin embargo, el uso de un solo antibiótico puede dar lugar a resistencias, por lo que se recomienda utilizar la condición que contiene los niveles más bajos de Augmentin® y carbenicilina (250µg/mL). De acuerdo a los resultados obtenidos, no se recomienda utilizar una concentración de 500µg/mL de carbenicilina ya que los tratamientos con esta concentración presentaron los índices de regeneración más bajos y uno de ellos presentó una gran dispersión.

E. LIMITANTES DE LA INVESTIGACIÓN Y DIRECCIONES FUTURAS

La principal limitante en este estudio es el tiempo. Las técnicas de cultivo de tejidos involucran largos períodos de tiempo de incubación. La regeneración del tejido vegetal puede observarse en dos semanas; sin embargo, el tejido requiere de un mínimo de seis semanas para observar resultados de la transformación mediada por *A. tumefaciens*. Previamente se realizaron pruebas preliminares de transformación de discos foliares de caña de azúcar en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Universidad del Valle de Guatemala

con resultados desfavorables debido al sobrecrecimiento de *A. tumefaciens*, esto llevó a la realización del presente estudio con el objetivo de evitar pérdida de material vegetal, reactivos y tiempo.

El siguiente paso en la investigación es llevar a cabo un proceso de infección de discos foliares con *A. tumefaciens* transformada con pANIC6E para evaluar la inhibición de *A. tumefaciens* en un proceso de regeneración de tejido vegetal transformado aplicando las concentraciones de antibióticos con mejor índice de regeneración; esto no fue posible debido a que el procedimiento es muy extenso y se ve limitado por el tiempo.

El proyecto tenía contemplado el uso de Timentin® como alternativa de la carbenicilina; sin embargo, es un antibiótico cuyo uso no está aprobado por el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, e importarlo a Guatemala requiere de muchos trámites y gastos económicos que complicarían el proyecto. En experimentos posteriores podría incluirse el Timentin® como parte de las condiciones experimentales.

VIII. CONCLUSIONES

1. No hay diferencia en el uso de carbenicilina o augmentin para la inhibición del crecimiento de *A. tumefaciens* en medio MS0.6 sin la presencia de material vegetal.
2. No hay diferencia entre las concentraciones de los antibióticos aplicados al medio MS0.6 para la inhibición del crecimiento de *A. tumefaciens*.
3. La presencia de carbenicilina reduce significativamente el índice de regeneración de los explantes en comparación con el uso de solamente Augmentin®.
4. Según las condiciones del experimento, la composición óptima de antibióticos para maximizar la regeneración de caña de azúcar es Augmentin® 250µg/mL.
5. Según las condiciones del experimento, la composición de antibióticos recomendada para su utilización en la regeneración de caña de azúcar durante el proceso de transformación mediada por *A. tumefaciens* es Augmentin®250µg/mL y carbenicilina250µg/mL, para minimizar la generación de resistencias.
6. Augmentin® es una alternativa aceptable como inhibidor del crecimiento de *A. tumefaciens* en el proceso de regeneración de caña de azúcar.

IX. RECOMENDACIONES

1. Disminuir la cantidad de ADN plasmidial utilizado en la electroporación de *A. tumefaciens* GV3101 o bien sembrar una mayor dilución para determinar la eficiencia de transformación de la bacteria.
2. Realizar un ensayo de inhibición del crecimiento de *A. tumefaciens* en cultivo líquido midiendo OD600 para tener más datos y determinar si los resultados obtenidos son replicables por otro método.
3. Realizar el mismo experimento con otro tipo de tejido vegetal susceptible de ser infectado por *A. tumefaciens* como alternativas para transformaciones más eficientes.
4. Aumentar la concentración de Kanamicina a 100 y 250µg/mL para obtener mejores resultados.
5. Replicar el experimento en otras instalaciones para asegurar que los resultados sean replicables y mejorar las condiciones de esterilidad para evitar la contaminación de los explantes regenerados.
6. Realizar el análisis de regeneración e inhibición de *A. tumefaciens* utilizando Timentin® como otro antibiótico para evaluar su uso como alternativa y su efecto en sinergia.
7. Probar las condiciones más favorables en material vegetal infectado con *A. tumefaciens* para determinar cómo actúan los antibióticos en presencia de bacterias con bajo ritmo de replicación (las que se encuentran en los interiores del tejido vegetal).

X. BIBLIOGRAFÍA

- Food and Beverage Online. 2011. *Transgenic sugarcane harvest first success in Brazil* EMBRAPA. <http://www.21food.com/news/detail35797.html> [10/03/13]
- Alimohammadi, Mohammad, *et al.* 2009. «Agrobacterium-mediated transformation of plants: Basic principles and influencing factors». *African Journal of Biotechnology* 8(20):5142-5148
- Anami, Sylvester, *et al.* 2013. «Higher plant transformation: principles and molecular tools». *The International Journal of Developmental Biology* 57:483-494
- Anderson, David y D. Sweeney. 2008. *Estadística para administración y economía*. 10°ed. Cengage Learning Editores: USA. 1056 págs
- Arencibia, A, *et al.* 1998. «An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum spp.* L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*». *Transgenic Research* 7:213-222
- Asazgua. 2012. *Economía Industria Azucarera de Guatemala*. <http://www.azucar.com.gt/economia.html> [10/03/13]
- Bent, Andrew. 2000. «Arabidopsis in Planta Transformation. Uses, Mechanisms, and Prospects for Transformation of Other Species». *Plant Physiology* 124(4):1540-1547
- CambiaLabs. (s.f.). *GusPlus Overview*. Cambia. http://www.cambia.org/daisy/bioforge_gusplus/3850.html [10/02/14]
- Collares, Daniela. 2011. *Embrapa 32rans primeiras plantas 32ransgénicas de cana-de-açúcar*. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. <http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2011/maio/4a-semana/embrapa-obtem-primeiras-plantas-transgenicas-de-cana-de-acucar/> [10/03/13]
- Craig, Charles, *et al.* 2004. *Modern Pharmacology with Clinical Applications*. 6°ed. Lippincott Williams & Wilkins: USA. 824 págs

Curtis, Ian. 2004. *Transgenic Crops of the World*. Springer. 454pp

Dan, Yinghui, *et al.* 2010. «Development of Efficient Plant Regeneration and Transformation System for Impatiens Using *Agrobacterium tumefaciens* and Multiple Bud Cultures as Explants». *BMC Plant Biology* 10:165

Dennehey, Briana, *et al.* 1994. «Comparison of selective agents for use with the selectable marker gene *bar* in maize transformation». *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 36(1):1-7

Enríquez-Obregón, G, *et al.* 1998. «Herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by *Agrobacterium*-mediated transformation». *Planta* 206:20-27

EUZÉBY. 2013. «List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet». *List of prokaryotic names with standing in nomenclature*. <http://www.bacterio.net/-copyright.html> [20/06/15]

Fauconnier, R y D. Bassereau. 1975. *La caña de azúcar*. España: Editorial Blume. 433 págs.

Fursova, Oksana, *et al.* 2012. «An efficient method for transient gene expression in monocots applied to modify the *Brachypodium distachyon* cell wall». *Annals of Botany* doi:10.1093/aob/mcs103

Gelvin, Stanton. 2003. «*Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool». *Microbiology Molecular Biology Reviews* 67(1):16-37

GEPLACEAE. 1987. *Uso alternativo de la caña de azúcar para energía y alimento*. México, D.F.: Publicación del Grupo de Países Latinoamericanos y del Caribe. 525 págs.

GlaxoSmithKline. 2013. Data Sheet Augmentin®. GlaxoSmithKline group. <http://www.medsafe.govt.nz/profs/datasheet/a/Augmentininj.pdf> [24/03/14]

GlaxoSmithKline. 2013. Data Sheet Timentin®. GlaxoSmithKline group. <https://www.gsksource.com/gskprm/htdocs/documents/TIMENTIN.PDF> [24/03/14]

- Goodner, B, *et al.* 2001. <<Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58>>. *Science* 294:2323-2328
- leamkhang, S, *et al.* 2005. <<Augmentin® as an alternative antibiotic for growth suppression of *Agrobacterium* for tomato (*Lycopersicon esculentum*) transformation>>. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 82:213-220
- Joyce, Priya, *et al.* 2010. <<Selection system and co-cultivation medium are important determinants of *Agrobacterium* –mediated transformation of sugarcane>>. *Plant Cell Rep* 29:173-183
- Kalunke, Raviraj, *et al.* 2009. <<*Agrobacterium* mediated transformation of sugarcane for borer resistance using *Cry 1Aa3* gene and one-step regeneration of transgenic plants>>. *Sugar Tech* 11(4):355-359
- Lemke, Thomas, *et al.* 2013. Foye's Principles of Medicinal Chemistry. 7° ed. Lippincot Williams & Wilkins: USA. 1520pp
- Lewin, Benjamin, *et al.* 2011. Genes X. 10° ed. Jones & Bartlett Learning: USA. 930pp
- Mann, D, *et al.* 2012. <<Gateway-compatible vectors for high-throughput gene functional analysis in switchgrass (*Panicum virgatum* L.) and other monocot species>>. *Plant Biotechnology Journal* 10:226-236
- Melgar, Mario, *et al.* 2012. *El Cultivo de la Caña de Azúcar en Guatemala*. Guatemala: CENGICAÑA. 512 págs.
- Molina, Luis, *et al.* 2012. <<Medición del efecto de la concentración de 2,4-D sobre la regeneración de plantas de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) variedad CG98-10 a partir de segmentos de hoja>>. CENGICAÑA.
- Murashige, Toshio, *et al.* 1962. <<A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures>>. *Physiologia Plantarum* 15:473-497

- Nicholl, Desmond. 2008. *An Introduction to Genetic Engineering*. 3^oed. Cambridge University Press: UK. 336pp.
- Pérez, Maylin, *et al.* 2013. <<Effective β -lactam antibiotics for *Agrobacterium tumefaciens* suppression in indica rice calli>>. *Revista Colombiana de Biotecnología* 15(2):89-96
- Pikaard, C. (s.f.). *Agrobacterium growth and transformation*. The Pikaard Laboratory. <http://sites.bio.indiana.edu/~pikaardlab/PDFs%20and%20protocol%20files%20agrotransform.html> [10/02/14]
- R Core Team. 2013. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- Roberts, Jay, *et al.* 1996. *Handbook of Pharmacology on Aging*. 2^o ed. CRC Press: USA. 400 págs.
- Scholar, Eric y W., Pratt. 2000. *The Antimicrobial Drugs*. 2^oed. Oxford University Press: USA. 607 págs.
- Scortecci, Katia, *et al.* 2012. <<Challenges, Opportunities and Recent Advances in Sugarcane Breeding>>. *Plant Breeding*. 3.0 license
- Sheikholeslam, Shahla y D., Weeks. 1987. <<Acetosyringone promotes high efficiency transformation of *Arabidopsis thaliana* explants by *Agrobacterium tumefaciens*>>. *Plant Molecular Biology* 8(4):291-298
- Sigma-Aldrich Co. 2014. *Murashige Skoog*. SIGMA-ALDRICH. <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/molecular-biology/plant-biotechnology/tissue-culture-protocols/murashige-skoog.html> [24/03/14]

- Snyman, S, *et al.* 2006. <<Refining the application of direct embryogenesis in sugarcane: effect of the developmental phase of leaf disc explants and the timing of DNA transfer on transformation efficiency>>. *Plant Cell Reports* 25:1016-1023
- Thermo Fisher Scientific Inc. 2014. *ElectroMAX™ A. tumefaciens LBA4404 Cells Specifications*. INVITROGEN™. <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/18313015> [28/05/14]
- UniProt. 2014. *Species Rhizobium radiobacter*. UniProt. <http://pir1.uniprot.org/taxonomy/358> [12/06/14]
- Williams, Otto y D. Nash. 1946. *Flora of Guatemala*. USA: Fieldiana Botany.
- Zambryski, P, *et al.* 1983. <<Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity>>. *The EMBO Journal* 2(12):2143-2150
- Zhang, Hanwen y H. Gutiérrez. 2010. *Teoría estadística: aplicaciones y métodos*. Universidad Santo Tomás: Colombia.
- Zhangsun, Dongting, *et al.* 2007. <<Improved Agrobacterium-mediated genetic transformation of GNA transgenic sugarcane>>. *Biologia, Bratislava* 62(4):386-293

XI. ANEXOS

Cuadro6. Composición del medio Murashige y Skoog para cultivo de tejidos de plantas. Adaptado de Sigma-Aldrich Co.

Componente	Concentración (mg/L)
Nitrato de amonio	1650.0
Ácido bórico	6.2
Cloruro de calcio anhidro	332.2
Cloruro de cobalto hexahidratado	0.025
Sulfato cúprico pentahidratado	0.025
EDTA disódico	37.26
Sulfato ferroso heptahidratado	27.8
Sulfato de magnesio	180.7
Sulfato de manganeso monohidratado	16.9
Ácido molibídico (sal sódica) dihidratado	0.25
Ioduro de potasio	0.83
Nitrato de potasio	1900.0
Fosfato monobásico de potasio	170.0
Sulfato de zinc heptahidratado	8.6
Myo-inositol	100
Ácido nicotínico	1.0
Piridoxina-HCl	1.0
Tiamina-HCl	10.0

Cuadro7. ANOVA de los porcentajes de regeneración de explantes de caña de azúcar.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor P</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.58547707	5	0.117095415	12.9011712	0.000175861	3.10587524
Dentro de los grupos	0.10891608	12	0.00907634			
Total	0.69439315	17				

ValorP=0.000176< α =0.05. Se rechaza Ho. Hay diferencia significativa entre los promedios de los porcentajes de regeneración de explantes de caña de azúcar.

Cuadro8. ANOVA de la cantidad de brotes por explante de caña de azúcar

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor P</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	8.94444444	5	1.788888889	10.73333333	0.000423041	3.10587524
Dentro de los grupos	2	12	0.166666667			
Total	10.94444444	17				

ValorP=0.000423< α =0.05. Se rechaza Ho. Hay diferencia significativa entre los promedios de de la cantidad de brotes por explante de caña de azúcar.

Cuadro9. ANOVA de los índices de regeneración de explantes de caña de azúcar

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor P</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	258.207602	5	51.64152032	18.5027395	2.87623E-05	3.10587524
Dentro de los grupos	33.4922428	12	2.791020233			
Total	291.699844	17				

ValorP=2.88E-05< α =0.05. Se rechaza Ho. Hay diferencia significativa entre los promedios de índices de regeneración de explantes de caña de azúcar.

Cuadro10. Prueba Tukey para índices de regeneración de explantes de caña de azúcar

<i>\$groups</i>			
<i>trt</i>	<i>means</i>	<i>M</i>	
1 A250	18.866667	a	
2 A500	16.840000	ab	
3 A1C1	12.986667	bc	
4 A2C1	11.650000	cd	
5 A2C2	10.076667	cd	
6 A1C2	7.853333	d	

A1 = Augmentin 250µg/mL; A2 = Augmentin 500µg/mL; C1 = Carbenicilina 250µg/mL; C2 = Carbenicilina 500µg/mL. Los tratamientos con el mismo dato en la columna M no son significativamente distintos entre si con α =0.05 y prueba de dos colas.

Figura18. Discos foliares de caña de azúcar regenerados en medio MS0.6 suplementado con Augmentin® 250 µg/mL.

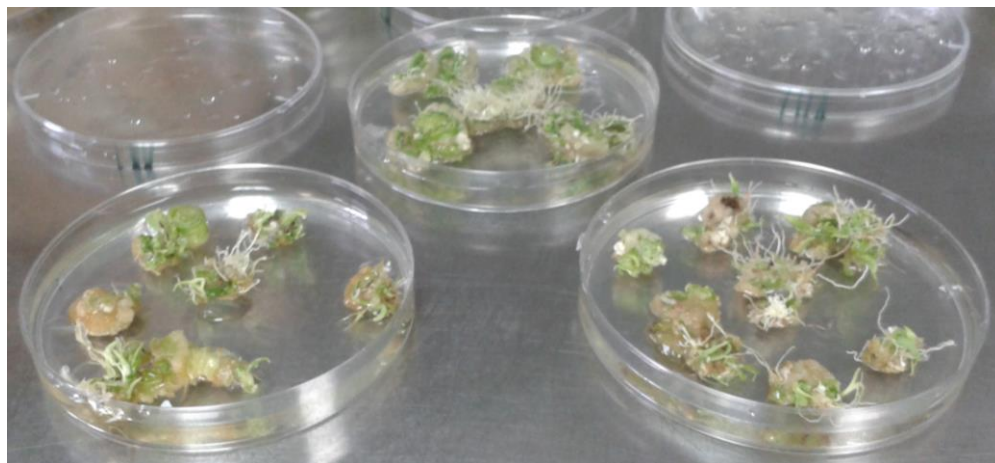


Figura19. Discos foliares de caña de azúcar regenerados en medio MS0.6 suplementado con Augmentin® 500 µg/mL.

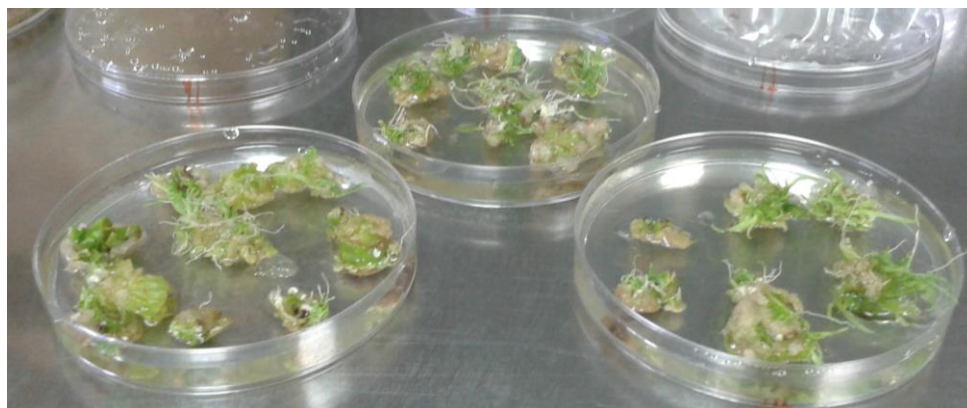


Figura20. Discos foliares de caña de azúcar regenerados en medio MS0.6 suplementado con Augmentin® 250 µg/mL y carbenicilina 250 µg/mL.



Figura21. Discos foliares de caña de azúcar regenerados en medio MS0.6 suplementado con Augmentin® 250 µg/mL y carbenicilina 500 µg/mL.

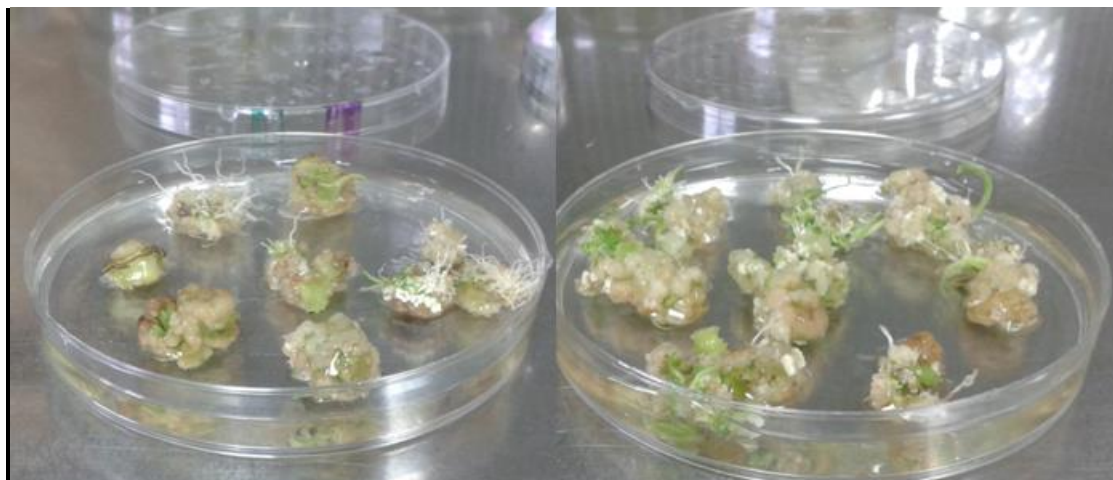


Figura22. Discos foliares de caña de azúcar regenerados en medio MS0.6 suplementado con Augmentin® 500 µg/mL y carbenicilina 250 µg/mL.

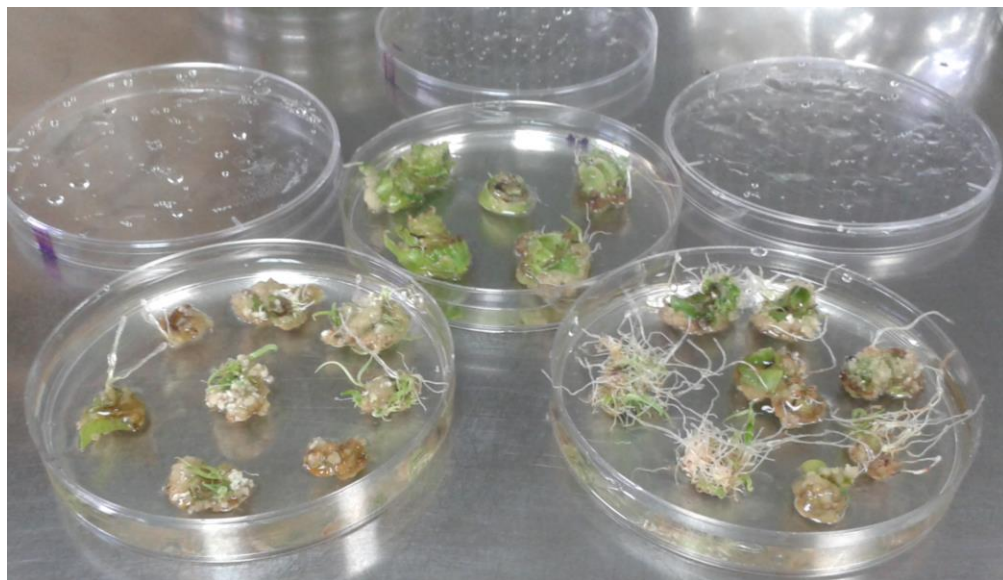


Figura23. Discos foliares de caña de azúcar regenerados en medio MS0.6 suplementado con Augmentin® 500 µg/mL y carbenicilina 500 µg/mL.



Figura24. Discos foliares de caña de azúcar regenerados en medio MS0.6 suplementado con



Figura25. Discos foliares de caña de azúcar regenerados en medio MS0.6 sin antibióticos. Controles levemente contaminados.

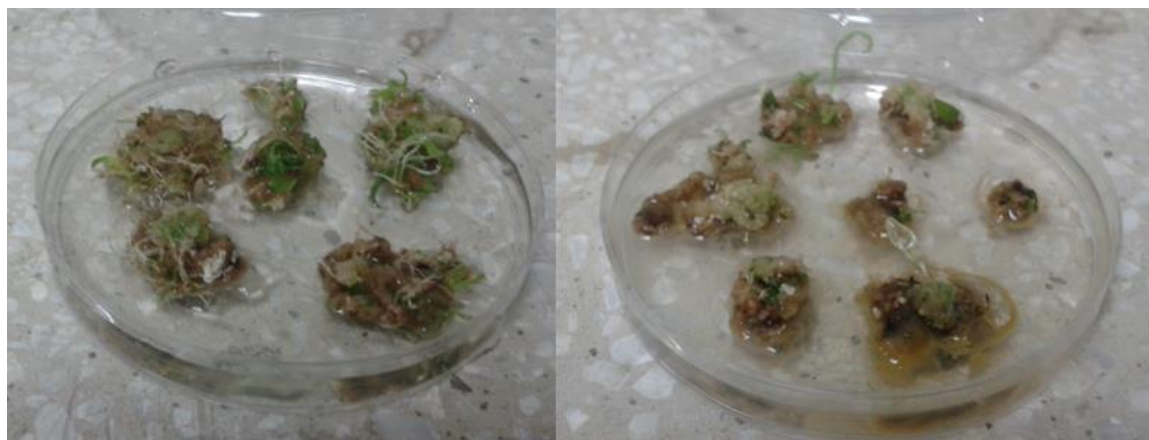


Figura26. Discos foliares de caña de azúcar regenerados en medio MS0.6 sin antibióticos. Control altamente contaminado.



Figura27. Discos foliares de caña de azúcar regenerados en medio MS0.6 suplementado con



Figura28. Discos foliares de caña de azúcar en incubación. Medio MS0.6 con distintas composiciones de antibióticos.

