

OPTIMIZACIÓN DE LA TRANSFORMACIÓN GENÉTICA CON *Agrobacterium rhizogenes*¹

Mónica Blanco*, Roberto Valverde^{2/*}, Luis Gómez*

Palabras clave: Transformación genética, *Agrobacterium rhizogenes*, acetosiringona, floroglucinol.

Keywords: genetic transformation, *Agrobacterium rhizogenes*, acetosyringone, phloroglucinol.

RESUMEN

Para optimizar la eficiencia en la transformación genética con *Agrobacterium rhizogenes*, secciones de zanahoria fueron inoculadas con la cepa de *Agrobacterium* A4TC y co-cultivadas con acetosiringona, floroglucinol y una combinación de ambos. La acetosiringona es uno de los compuestos fenólicos que liberan los tejidos vegetales como respuesta a heridas, el cual induce la transferencia del T-ADN de la agrobacteria a la planta. El floroglucinol es también un compuesto fenólico; sin embargo, ejerce un efecto sinérgico con las auxinas, inhibiendo parcialmente la actividad de las citocininas. La mayor eficiencia en la transformación (75%) se obtuvo con el uso de acetosiringona (100 mM) en combinación con floroglucinol (25 mg l⁻¹). En general, 6 días de co-cultivo, independientemente de los tratamientos, fue el tiempo que indujo el mayor porcentaje de transformación. La inclusión de 100 mg l⁻¹ de kanamicina resultó un mecanismo eficiente para discriminar entre raíces transformadas y no transformadas. En adición, este trabajo presenta un novedoso sistema con el cual, una vez realizada la transformación, la bacteria puede ser eliminada completamente en 48 h con Cefotaxime en dosis de 500 mg l⁻¹.

ABSTRACT

Optimization of genetic transformation with *Agrobacterium rhizogenes*. To optimize the genetic transformation efficiency using *Agrobacterium rhizogenes*, carrot sections inoculated with the *Agrobacterium* strain A4TC were co-cultivated with acetosyringone, phloroglucinol, and a mix of both. Acetosyringone is one of the phenolic compounds produced by plant tissues in response to wounding, which induces the transfer of T-DNA from the agrobacteria to the plant. Phloroglucinol is also a phenolic compound; however, it has a synergistic action with auxins by partially inhibiting cytokinin activity. The highest transformation efficiency (75%) was obtained with acetosyringone (100 mM) in combination with phloroglucinol (25 mg l⁻¹). In general, a 6-day co-cultivation, independently of treatments, induced the best transformation rate. Inclusion of 100 mg l⁻¹ kanamicin efficiently discriminated transformed roots from non-transgenic ones. This paper also presents a novel bacterial elimination method, by which *Agrobacterium* can be completely eliminated in 48 h with Cefotaxime at a dosage of 500 mg l⁻¹.

1/ Recibido para publicación el 27 de agosto del 2002.
2/ Autor para correspondencia: Correo electrónico: robertov@cariari.ucr.ac.cr

* Laboratorio de Biotecnología de Plantas, Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

INTRODUCCIÓN

La transformación genética de especies vegetales es un mecanismo que hoy día es ampliamente utilizado dentro del campo del fitomejoramiento. Este sistema permite insertar genes foráneos dentro de un tejido vegetal receptor para la creación de plantas genéticamente modificadas, conocidas también como plantas transgénicas. Para realizar la transformación genética se utiliza diversas técnicas: *Agrobacterium* spp., biobalística, electroporación y microinyección, entre otras (Potrykus *et al.* 1998). Estas permiten el mejoramiento de especies y aumentan su valor, principalmente por la producción de plantas resistentes a plagas y enfermedades, tolerantes a herbicidas, con productos alimenticios de mejor calidad (modificación en los niveles de ácidos grasos o almidón) y plantas que son utilizadas como “bioreactores” para la síntesis de fármacos y aditivos alimenticios (Gelvin 2000, Balz *et al.* 1999, Zárate 1999, Gelvin 1998, Hosokawa *et al.* 1997, Gelvin 1990).

El proceso que emplea *Agrobacterium* spp., se utiliza principalmente por su facilidad y alto porcentaje de transformación en una gran variedad de especies vegetales. Este mecanismo de la biología molecular, para la transformación de plantas fue conocido a mediados de los años 70. A inicios de 1980, se comenzó a utilizar la habilidad de esta bacteria para generar plantas transgénicas y para la mitad de 1990 las plantas genéticamente modificadas mediante *Agrobacterium* spp. eran ampliamente conocidas en la mayoría de los países que realizaban trabajos de este tipo (Gelvin 2000). Sin embargo, hasta el momento es poco lo que se sabe acerca de los eventos de la transformación vegetal mediante *Agrobacterium* spp., particularmente el mecanismo de transferencia del T-ADN y la integración del T-ADN al genoma vegetal (Gelvin 2000, Kumar y Fladung 2001).

El proceso de transformación se inicia cuando *Agrobacterium* spp. percibe señales químicas de las células dañadas de la planta, las cuales son consideradas como inductoras de la respuesta de virulencia. Entre estas señales químicas se encuentran, azúcares neutros y ácidos, hi-

drocarburos aromáticos monocíclicos, como acetosiringona, α -hydroxyacetosiringona, coniferyl alcohol y vainillina; y monosacáridos neutros o ácidos como la glucosa y el ácido glucurónico (Humara *et al.* 1999, Hess *et al.* 1991, Bolton *et al.* 1986). Los compuestos fenólicos liberados por las células de la planta cuando ocurre una herida, sirven como inductores o co-inductores de los genes bacterianos *vir* (Stachel *et al.* 1986, Stachel *et al.* 1985), pero también pueden relacionarse con la síntesis de fitoalexinas y lignina (Gelvin 2000, Spencer y Towers 1988) tanto en plantas dicotiledóneas como monocotiledóneas (Usami *et al.* 1988). Compuestos fenólicos como la acetosiringona, son percibidos por la proteína sensora VirA. Una vez que la proteína VirA es auto-fosforilada ocurre la trans-fosforilación de la proteína VirG, lo que lleva a la activación de los transcritores de los genes *vir* (Gelvin 2000). Posterior a la introducción de la bacteria en las células de la planta, se da el procesamiento del plásmido Ti (inductor de tumores) o Ri (inductor de raíces) y la subsiguiente transferencia del T-ADN de la bacteria a la planta (Gelvin 2000, Baker *et al.* 1997). El floroglucinol es un compuesto fenólico de importancia para procesos como el enraizamiento. Su acción está relacionada con una actividad sinérgica con las auxinas, inhibiendo en parte, la actividad de la citoquininas y estimulando la de las auxinas (De Klerk *et al.* 1999, Gaspar *et al.* 1996). Se ha encontrado, que la presencia de floroglucinol en medios de cultivo mejora ampliamente el enraizamiento de los brotes (George 1993).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la acetosiringona y el floroglucinol en la eficiencia en la transformación genética de zana-horia mediante *Agrobacterium rhizogenes*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica.

Como explante se utilizó secciones de raíz de zanahoria de aproximadamente 1 cm de diámetro, con cambium vascular. La desinfección de los explantes se realizó mediante los procedimientos de rutina con NaOCl al 2% 40 min⁻¹. Una vez desinfectadas las secciones de zanahoria fueron colocadas en el medio de Murashige y Skoog (1962) (MS) con 0,8% de agar.

Cepa de *Agrobacterium rhizogenes*

Se utilizó el vector binario A4TC que posee el gen reportero β-glucuronidasa (GUS) y el gen de selección NPT II (resistencia a la kanamicina), esta cepa fue gentilmente cedida por el Biological Research Center, Institute of Plant Biology, Hungría.

La cepa de *A. rhizogenes*. fue establecida en un medio de crecimiento bacterial compuesto por: extracto de carne 1 g l⁻¹, extracto de levadura 2 g l⁻¹, peptona 5 g l⁻¹, NaCl 5 g l⁻¹, agar 15 g l⁻¹, pH= 7,2-7,4. Este medio fue suplementado con 100 mg l⁻¹ de kanamicina (Sigma®).

Previo a la inoculación, la cepa conservada a 4°C se puso a crecer en platos Petri con el medio de crecimiento bacterial mencionado anteriormente. Luego de 3 días en la oscuridad y a temperatura ambiente, se observó el crecimiento de colonias definidas y de color uniforme. De estas colonias se tomó 1 asada, la cual se diluyó en 1 ml de agua destilada estéril para preparar la suspensión bacterial.

Transformación

Los explantes de zanahoria fueron inoculados mediante incisiones en el floema, el xilema

y el cambium vascular con un bisturí previamente sumergido en la suspensión bacterial (10⁸ células ml⁻¹). Luego de la inoculación los explantes fueron colocados en el medio MS (1962) con los tratamientos que se presenta en el cuadro 1, para cada tratamiento se utilizó 4 explantes. Además, se incluyó un testigo, el cual consistió de un grupo de 4 explantes, los cuales fueron inoculados con la bacteria y puestos a crecer en un medio de cultivo desprovisto de acetosiringona o floroglucinol. Las condiciones de cultivo fueron total oscuridad y 25°C.

Los explantes de zanahoria previamente inoculados fueron co-cultivados con la acetosiringona durante períodos de 2, 4, 6 y 8 días. Posterior al tratamiento, cada explante se colocó en un medio MS, sin los reguladores de crecimiento y se evaluó su comportamiento durante 4 semanas. La eficiencia en la transformación se definió como el número de explantes transformados entre el número de explantes co-cultivados (total)x100=%.

Eliminación de la agrobacteria y sensibilidad al antibiótico

La eliminación de la bacteria se realizó mediante 2 mecanismos:

- Se utilizó un medio líquido MS suplementado con 500 mg l⁻¹ de Cefotaxime (Clafórán, Hoechst) y 100 mg l⁻¹ de kanamicina (Sigma®). Las raíces fueron colocadas en este medio selectivo durante 2 ciclos consecutivos de 24 h cada uno, en agitación constante y a la oscuridad. Luego fueron transferidas a un medio MS fresco sin

Cuadro 1. Concentraciones de acetosiringona y floroglucinol evaluadas para promover la transformación de explantes de zanahoria.

Producto	Concentración				
Acetosiringona (mM)*	0	50	100	200	
Floroglucinol (mg l ⁻¹)**	0	0,25	5	25	50
Acetos. (mM)+Florog. (mg l ⁻¹)	100+0	100+0,25	100+5	100+25	100+50

*Acetosiringona=3',5'-Dimethoxy-4'-hydroxy-acetophenone (Aldrich Chem. Co.).

**Floroglucinol como 1,3,5-trihydroxybenzeno (Sigma®).

reguladores de crecimiento y a los 8 días una porción de raíz se maceró y ralló sobre el medio de crecimiento bacterial, de esta forma se comprobó la eliminación de la bacteria de las raíces de zanahoria transformadas.

- Se utilizó diferentes concentraciones del producto comercial Plant Preservative Mixture (PPM) (Plant Cell Technology, Inc.). Las raíces se colocaron en 4 diferentes concentraciones del producto: 1 ml l⁻¹, 2,5 ml l⁻¹, 5 ml l⁻¹ y 10 ml l⁻¹; luego de 8 días en la oscuridad y en agitación constante el proceso se repitió por un período igual. Posteriormente, las raíces se colocaron en un medio MS sólido suplementado con 2 ml l⁻¹ de PPM y se dejó durante 8 días más. Luego, una porción de la raíz se maceró y ralló sobre el medio de crecimiento bacterial, como en el caso anterior. En ambas pruebas no solo se tomó en cuenta la completa eliminación de la agrobacteria, sino también la sobrevivencia del explante y su posterior crecimiento.

Ensayo de β-glucuronidasa

La actividad de la β-glucuronidasa se analizó al colocar una porción de las raíces utilizadas en 500 μl de buffer de fosfato (0,2 M NaH₂PO₄, 0,2 M Na₂HPO₄ y Tritón x-100 al 10%) que contenía 250 μl de la solución X-Gluc. (10 mg de 5-bromo-4-cloro-3-indoyl- β-D-glucoronide en 250 μl de N-N-dimetilformamide). Las raíces

fueron incubadas durante 2 h al vacío a temperatura ambiente.

Verificación de la transformación genética

La verificación de la transformación genética se logró mediante: La capacidad de las raíces de crecer en un medio selectivo (100 mg l⁻¹ de kanamicina) y el análisis histoquímico (tinción X-Gluc.) de la expresión del gen GUS.

RESULTADOS

Para un mejor entendimiento de este trabajo, cabe aclarar que tanto la resistencia a la kanamicina como la presencia del gen GUS, son evidencia de la transformación genética pero no una prueba contundente. Pues para determinar la integración del gen al genoma de la planta se debe realizar pruebas moleculares como PCR o Southern Blot.

Efecto de la acetosiringona

La adición de la acetosiringona al medio de cultivo indujo una mayor transformación de los tejidos de zanahoria. La utilización de 100 mM de acetosiringona dio como resultado la transformación del 50% de los explantes, seguido por los tratamientos con 50 y 200 mM, donde la transformación fue de 43,75 y 37,5% respectivamente. En el tratamiento testigo se obtuvo únicamente un 12,5% de transformación (Cuadro 2).

Cuadro 2. Efecto del co-cultivo con acetosiringona, floriglucinol y su combinación en la eficiencia de transformación de explantes de zanahoria inoculados con A4TC.

Acetosiringona (mM)		50	100	200	Total*
Transformación (%)		43,75	50	37,5	43,75
Floriglucinol (mg l ⁻¹)	0,25	5	25	50	Total*
Transformación (%)	0	6,25	31,25	31,25	17,19
Acetos. (mM) + Florig. (mg l ⁻¹)	100+0,25	100+5	100+25	100+50	Total*
Transformación (%)	37,5	37,5	75	56,25	51,56

Testigo=12,5% de transformación.

*Respecto al total de las concentraciones.

Al evaluar el efecto del tiempo de co-cultivo (2, 4, 6 y 8 días) de los explantes con la acetosiringona sobre la eficiencia en la transformación, se encontró que cuando los explantes son co-cultivados con este producto por un período de 6 días es cuando, en general, se obtiene el mayor porcentaje de transformación (Figura 1). La evolución en el tiempo de la transformación mostró que con la concentración de 50 mM los eventos de transformación se observan en su totalidad durante la semana 1, cuando la concentración aumenta a 100 mM algunos explantes muestran indicios de transformación durante la semana 1 y otros durante la 1 a la 3. En el caso de la concentración de 200 mM la transformación fue evidente a partir de la semana 2. En contraste, el tratamiento testigo mostró 6,25% de transformación en la semana 2 y otro 6,25% en la semana 4.

En términos generales hubo un 43,75% de transformación cuando los explantes fueron co-cultivados con acetosiringona (Cuadro 2).

Efecto del floroglucinol

Con la aplicación de floroglucinol se obtuvo en total solo un 17,19% de explantes transformados. De los 4 tratamientos, en los de 25 y 50 mg l⁻¹ se obtuvo un 31,25% de transformación en cada uno; mientras que en el de 5 mg l⁻¹ un 6,25% y en el de 0,25 mg l⁻¹ 0% (Cuadro 2). La transformación, aunque poca, ocurrió mayormente en los explantes en co-cultivo por 6 días y a partir de la semana 3.

Efecto de la acetosiringona+floroglucinol

En vista de que la concentración de 100 mM de acetosiringona fue la que indujo una mayor transformación de los explantes, dicha concentración se seleccionó para utilizarla en mezcla con diferentes concentraciones de floroglucinol (0,25, 5, 25 y 50 mg l⁻¹). Los resultados obtenidos con el uso de ambos productos muestran que el proceso de transformación mejoró en casi un 8% con respecto a la adición de solo acetosiringona y prácticamente en un 40% con respecto al testigo (12,5%) (Cuadro 2). La figura 2 muestra el aspecto de las secciones de zanahoria emplea-

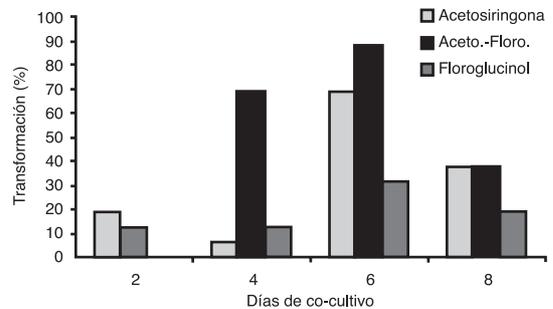


Fig. 1. Eficiencia de la transformación, obtenida con diferentes períodos de co-cultivo de los tejidos infectados con *Agrobacterium rhizogenes*. Resultados a las 4 semanas de evaluación.

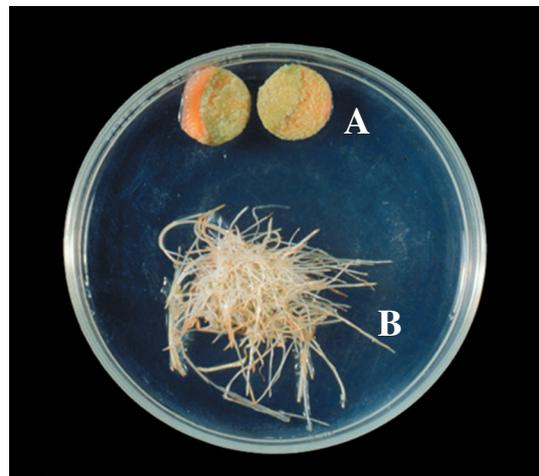


Fig. 2. Transformación de zanahoria con *Agrobacterium rhizogenes* A4TC. Secciones de zanahoria sin transformar (A) y una sección transformada (B), nótese la alta proliferación de raíces.

das antes y después de la transformación, puede observarse la gran cantidad de raíces producidas.

Al evaluar en detalle el efecto de los tratamientos (Cuadro 2), se obtuvo que fue la mezcla de 100 mM de acetosiringona + 25 mg l⁻¹ de floroglucinol donde se obtuvo la mayor cantidad de explantes transformados (75%). Cuando se adicionó 50 mg l⁻¹ de floroglucinol la transformación fue de un 56,25%; las mezclas con 0,25 y 5 mg l⁻¹ de floroglucinol solo indujeron un 37,5% de transformación cada una.

El período de co-cultivo del explante con la mezcla por 6 días, nuevamente fue el que indujo la mayor transformación en las semanas 1 y 3, en la semana 4 la transformación es casi nula.

Sensibilidad al antibiótico

Se confirmó que con la aplicación de una concentración de 100 mg l⁻¹ de kanamicina, los explantes supuestamente transformados mostraron un crecimiento normal. Por el contrario, los explantes no transformados iniciaron un proceso de necrosis del tejido hasta su muerte (datos no mostrados).

Ensayo de β-glucuronidasa

La expresión del gen quimérico GUS fue analizada histoquímicamente mediante la tinción con X-Gluc. Este sustrato genera un precipitado azul en el sitio de actividad de la enzima. En este trabajo se observó que en las raíces, que sobrevivieron al tratamiento con kanamicina y crecieron en un medio desprovisto de reguladores de crecimiento, se formó los precipitados azules característicos de la tinción X-Gluc.

Eliminación de la bacteria

En esta fase se utilizó tanto Cefotaxime como kanamicina. Con el antibiótico Cefotaxime, se eliminó de las raíces la agrobacteria en un 100% en el período descrito. En tanto que el uso de la kanamicina, por ser este el agente de selección, básicamente lo que hizo fue eliminar los tejidos no transformados. La aplicación de 100 mg l⁻¹ de kanamicina produjo un necrosamiento gradual y muerte de los explantes no transformados, mientras que los transformados crecieron normalmente. Cuando se utilizó PPM en una concentración de 5 ml l⁻¹ hubo una eliminación total de la agrobacteria, mientras que las concentraciones menores fueron insuficientes ya que durante el rallado posterior al tratamiento se pudo observar crecimiento bacterial. La concentración de 10 ml l⁻¹ resultó tóxica tanto para la bacteria como para el explante.

DISCUSIÓN

Con el objetivo de optimizar el porcentaje de transformación genética con *Agrobacterium rhizogenes*, se evaluó 2 reguladores de crecimiento, diferentes tiempos de co-cultivo y su respuesta en un período de 4 semanas en secciones de zanahoria. Se utilizó ésta planta debido a la susceptibilidad natural que posee para ser infectada con cepas silvestres de *Agrobacterium* spp. Dicha susceptibilidad es conocida desde hace aproximadamente 30 años (Syrkin y Bulka 1989, Pawlicki *et al.* 1992).

En el presente estudio, con el uso de 100 mM de acetosiringona se obtuvo un incremento en la transformación del 37,5% con respecto al testigo. Esto concuerda con otras investigaciones donde se indica que la utilización de compuestos fenólicos durante el proceso de transformación con *Agrobacterium* mejora el porcentaje y la velocidad de la transformación (Matsumoto y Fukui 1998, Blount *et al.* 2001, Microbial World 2001, Lupotto *et al.* 2001). En este caso particular, lo que ocurre es que el aumento en la cantidad de fenoles logra una mayor inducción de los genes *vir*; dado que la acetosiringona es una de las sustancias fenólicas que la planta libera naturalmente cuando sufre heridas.

Es importante mencionar que cuando explantes infectados son co-cultivados con acetosiringona por períodos menores a 6 días, la eficiencia en la transformación es muy baja, sin importar la concentración del producto utilizado. Esto sugiere que la agrobacteria requiere de un estímulo constante por un período definido, para que el mecanismo de infección y transferencia del T-ADN por el plásmido Ri (inductor de raíces) se active y funcione de una manera eficiente.

Con respecto al tiempo necesario para que el efecto de la transformación sea evidente, se encontró que concentraciones menores a 100 mM, considerada óptima en éste y otros estudios (Matsumoto y Fukui 2000, Rashid *et al.* 1996, Hun Park *et al.* 1996, Pawlicki *et al.* 1992, Spencer y Towers 1988), hacen que las raíces aparezcan 1 semana después de concluido el tratamiento con la acetosiringona y no aparezcan más explantes transformados durante las restantes 3

semanas. Por el contrario, cuando se usa concentraciones mayores a 100 mM, pareciera que hay un efecto inhibitorio de la transformación y las primeras raíces son evidentes hasta en la semana 2, después de la cual el proceso es decreciente hasta la semana 4.

Cuando se utilizó solo floriglucinol, el porcentaje de transformación fue muy bajo, indicativo de que la función de este regulador de crecimiento es más bien sobre otros procesos relacionados con el enraizamiento, que con la transformación genética como tal.

Una vez que se determinó la concentración de acetosiringona que permitió aumentar los eventos de transformación genética, se analizó el efecto combinado de ésta con el floriglucinol; el objetivo siempre fue mejorar la brotación y la calidad de las raíces. Básicamente, el objetivo se cumplió pues el porcentaje de transformación aumentó así como el crecimiento posterior de raíces a partir de una porción de la raíz transformada. Este hecho corrobora el efecto del floriglucinol sobre los procesos de enraizamiento, tanto como inductor de raíces cuando se usa en forma independiente o con un efecto sinérgico con las auxinas, sean éstas aplicadas en forma exógena o de producción endógena tal y como lo mencionan Gaspar *et al.* (1996).

El efecto combinado de la acetosiringona con el floriglucinol no solo aumentó la cantidad de eventos de transformación, sino que el tiempo de co-cultivo del explante con la mezcla para inducir la formación de raíces, se puede reducir a 4 días con un porcentaje de transformación bastante alto (68,75%), aunque es evidente que 6 días de co-cultivo dan como resultado el porcentaje más alto de transformación (Figura 1).

Una posible explicación al aumento en el porcentaje de transformación, cuando se usó el floriglucinol en mezcla con la acetosiringona, es que en algunas áreas del tejido de zanahoria pudo haber ocurrido la transformación, por inducción de la acetosiringona, pero la expresión del gen no fue lo suficientemente fuerte como para que la transformación fuera evidente. De ahí que el efecto del floriglucinol fue estimular el crecimiento de las raíces inducidas; evidencia de esto es que en el mejor tratamiento de acetosiringona-

+floriglucinol el porcentaje de transformación aumentó en el tiempo desde la semana 1 hasta la semana 3.

Prácticamente, en ninguno de los 3 tratamientos se observó la ocurrencia de transformación en la semana 4 de evaluación, según Pawlicki *et al.* (1992), esto no indica que la virulencia de *Agrobacterium* haya disminuido, más bien lo que podría suceder es que la población de agrobacterias ha aumentado a niveles tan altos que pueden matar los tejidos.

Pareciera que la optimización de la transformación con *Agrobacterium rhizogenes*, cuando se usa acetosiringona, es dependiente de la cepa de *Agrobacterium* que se utilice, la especie o cultivar de la planta, la edad de los tejidos y el tiempo de co-cultivo entre otros (Pawlicki *et al.* 1992). Esto podría explicar el éxito logrado en la presente investigación, en comparación con el trabajo de Pawlicki *et al.* (1992), aún cuando ambos estudios tienen en común el uso de acetosiringona y raíces de zanahoria. Evidentemente, en nuestro caso, la eficiencia de transformación también aumentó cuando se usó la acetosiringona en mezcla con el floriglucinol.

Respecto a la eliminación de la bacteria, el antibiótico Cefotaxime, conocido comercialmente como Claforán, una cefalosporina de tercera generación, es usado en medicina humana como un antibiótico de amplio espectro (Rosenstein 2000). En transformación genética en plantas su uso ha sido principalmente para la eliminación de plásmidos que poseen el gen de selección a la kanamicina.

En este trabajo, se varió el tiempo de aplicación de la Cefotaxime (500 mg l⁻¹) a 48 h con una renovación del medio con el antibiótico a las 24 h, lo cual está en desacuerdo con el tiempo de aplicación que se recomienda en diversos trabajos (Lupotto *et al.* 2001, Murakami *et al.* 1998, Hosokawa *et al.* 1997, Dong *et al.* 1996, Pawlicki *et al.* 1992, Syrkin y Bulka 1989) que es de 1 semana o más con 500 mg l⁻¹ de producto. El cambio que se realizó en el presente estudio, fue hecho con base en las indicaciones de productos farmacéuticos (Rosenstein 2000) y de fábrica (Hoechst); donde se especifica, que la efectividad del producto disminuye de 12 a 24 h después

de reconstituirse la forma liofilizada del antibiótico a temperatura ambiente. Este dato permite afirmar que luego de 24 h las agrobacterias que no han sido eliminadas totalmente del explante, pueden renovar su actividad, reproducirse e incluso crear mecanismos de resistencia en los días restantes, previos a la siguiente aplicación del antibiótico. En este caso, 2 aplicaciones en días consecutivos no solo eliminó completamente la agrobacteria, sino que se logró establecer un cultivo vegetal con características de crecimiento normal y en un tiempo mucho menor al recomendado en la literatura.

Con el uso del PPM también se obtuvo resultados favorables, ya que se logró eliminar la agrobacteria en un período de un mes. El tiempo es mayor que en el caso anterior; sin embargo, este es un producto con el cual no hay riesgo de afectar las plantas, además, su valor económico es menor al de cualquier antibiótico de uso en humanos. Esta característica, de no afectar los tejidos, es de suma importancia en aquellos casos en que las raíces provengan de plantas muy sensibles al uso de antibióticos.

Para la selección del tejido transformado, se utilizó kanamicina (100 mg l^{-1}), debido a que el gen de la neomicina fosfotransferasa, el cual confiere la resistencia a la kanamicina, fue el marcador de selección del plásmido utilizado en este trabajo. La transferencia y la expresión de este gen quimérico en las células vegetales, puede seleccionarse por la habilidad de las células a crecer en presencia de concentraciones de kanamicina, que por lo general, son letales para células vegetales de tejidos no transformados.

En resumen, aún cuando el uso de la acetosiringona en concentraciones de 100 mM incrementó la eficiencia de transformación en un $37,5\%$ con respecto al testigo, el uso combinado de acetosiringona con el floriglucinol, logró aumentar la eficiencia en la transformación hasta un $62,5\%$ también con respecto al testigo. El uso del floriglucinol en forma independiente no pareciera tener un efecto importante sobre la transformación pero sí sobre la eficiencia de la misma. El tiempo de co-cultivo óptimo, de los tejidos infectados con estas sustancias fenólicas y sus mezclas, fue de 6 días. Por su parte, durante

las 4 semanas de evaluación, se encontró que después de la tercera semana el número de eventos de transformación es casi nulo. Finalmente, es claro que aunque los 2 tratamientos utilizados para eliminar la agrobacteria fueron efectivos, se considera ideal, aquel que elimina la bacteria completamente, en un tiempo menor y donde los tejidos transformados no sufren daño; el uso del antibiótico Cefotaxime cumplió con estos requisitos. El éxito en la optimización de la transformación fue evidente tras observar los resultados positivos de la prueba del GUS en las raíces transformadas, creciendo normal y abundantemente luego del proceso de selección en un medio suplementado con kanamicina. El crecimiento de las raíces transformadas en un medio líquido, en la figura 3, es una versión miniatura de un proceso, que de realizarse a escala industrial en



Fig. 3. Raíces transformadas de zanahoria creciendo en un medio líquido, sin que ocurra la proliferación de otros órganos.

Costa Rica, podría abastecer a las industrias farmacéutica o de agroquímicos nacionales, con la materia prima para la elaboración de medicamentos o plaguicidas, sin tener que comprar a otros países los productos elaborados con nuestras plantas nativas.

LITERATURA CITADA

- BAKER B., ZAMBRYSKI P., STASKAWICZ B., DINESH-KUMAR S.P. 1997. Signaling in plant-microbe interactions. *Science* 276: 726-733.
- BALZ J., COURTOIS D., DRIEU J., DRIEU K., REY-NOIRD J., SOHIER C., POON B., TOUCHE A., PE-TIARD V. 1999. Production of ginkgolides and bilobalide by *Ginkgo biloba* plants and tissue cultures. *Planta Medica* 65: 620-626.
- BLOUNT J., SAMEER M., LLOYD S., HUHMANN D., DIXON R. 2001. Accumulation of acetosiringona in elicited tobacco cell suspension cultures expressing an alfalfa cinnamate 4-hydroxylase (C₄H) transgene. *In: line: <http://www.rycomusa.com/aspp2001/public/P39/0143.html>* (31/08/01, 11:30).
- BOLTON G., NESTER E., GORDON M. 1986. Plant phenolic compounds induce expression of the *Agrobacterium tumefaciens* loci needed for virulence. *Science* 232:983-985.
- DE KLERK G., VAN DER KRIEKEN W., DE JONG J. 1999. The formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 35: 189-199.
- DONG J., TENG W., BUCHHOLZ W., HALL T. 1996. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Javanica* rice. *Molecular Breeding* 2: 267-276.
- GASPAR T., KEVERS C., PENEL C., GREPPIN H., REID D., THORPE T. 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 32: 272-289.
- GELVIN S. 1990. Crown gall disease and hairy root disease. *Plant Physiology* 92: 281-285.
- GELVIN S. 1998. The introduction and expression of transgenes in plants. *Current Opinion in Biotechnology* 9: 227-232.
- GELVIN S. 2000. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 51: 223-256.
- GEORGE E. 1993. Plant propagation by tissue culture; the technology. 2 ed. England, Exegetics Ltd. v. 2, 574 p.
- HESS K., DUDLEY M., LYNN D., JOERGER R., BINNS A. 1991. Mechanism of phenolic activation of *Agrobacterium* virulence genes: development of a specific inhibitor of bacterial sensor/response systems. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 7854-7858.
- HOSOKAWA K., MATSUKI R., OIKAWA Y., YAMAMURA S. 1997. Genetic transformation of gentian using wild-type *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 51: 137-140.
- HUMARA J., LÓPEZ M., ORDAS R. 1999. Induction of a virulence response in *Agrobacterium tumefaciens* by exudates of *Pinus pinea* cotyledons. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 55: 175-181.
- HUN-PARK S., PINSON S., SMITH R. 1996. T-DNA integration into genomic DNA of rice following *Agrobacterium* inoculation of isolated shoot apices. *Plant Molecular Biology* 32: 1135-1148.
- KUMAR S., FLADUNG M. 2001. Controlling transgene integration in plants. *Trends in Plant Science* 6(4): 155-159.
- LUPOTTO E., REALI A., PASSERA S., CHAN M. 2001. Maize transformation with *Agrobacterium tumefaciens*. *In: line: <http://www.agron.missouri.edu/mn-1/72/67lupotto.html>* (31/08/01, 11:30).
- MATSUMOTO S., FUKUI M. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer to tea plant (*Camellia sinensis*) cells. *In: line: ss.jircas.offrc.go.jp/engpage/jarg/32-4/matsumoto/matsu.htm* (07/12/00, 18:24).
- MICROBIAL WORLD. 2001. Biology and control of crown gall (*Agrobacterium tumefaciens*). *In: line: <http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes/crown.htm>* (31/08/01, 11:30).
- MURAKAMI Y., OMOTO T., ASAI I., SHIMAMURA K., YOSHIHARA K., ISHIMARU K. 1998. Rosamarinic acid and related phenolics in transformed root culture of *Hyssopus officinalis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 53: 75-78.
- MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- PAWLICKI N., SANGWAN R., SANGWAN-NORREEL B. 1992. Factors influencing the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 31: 129-139.

- POTRYKUS I., BILANG R., FUTTERER J., SAUTER C., SCHROTT M., SPANGENBERG G. 1998. Genetic engineering of crop plants. *In: Agricultural Biotechnology*. Ed. by Arie Altman. Marcel Dekker, Inc. New York. 770 p.
- RASHID H., YOKOI S., TORIYAMA K., HINATA K. 1996. Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in Indica rice. *Plant Cell Reports* 15: 727-730.
- ROSENSTEIN E. 2000. Diccionario de especialidades farmacéuticas. Ediciones PLM, S.A. México. p. 1024.
- SPENCER P., TOWERS G.H.N. 1988. Specificity of signal compounds detected by *Agrobacterium tumefaciens*. *Phytochemistry* 27: 2781-2785.
- STACHEL S., NESTER E., ZAMBRYSKI P. 1986. A plant cell factor induces *Agrobacterium tumefaciens vir* gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 379-383.
- STACHEL S., MESSENS E., VAN MONTAGU M., ZAMBRYSKI P. 1985. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 318: 624-629.
- SYRKIN E., BULKA K. 1989. A simple, efficient method for the *Agrobacterium*-mediated transformation of carrot callus cells. *Plant Science* 61: 253-262.
- USAMI S., OKAMOTO S., TAKEBE I., MACHIDA Y. 1988. Factor inducing *Agrobacterium tumefaciens vir* gene expression is present in monocotyledonous plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 3748-3752.
- ZARATE R. 1999. Tropane alkaloid production by *Agrobacterium rhizogenes* transformed hairy root cultures of *Atropa baetica* Willk. (Solanaceae). *Plant Cell Reports* 18: 418-423.