



TESIS

**Regeneración *in vitro* y transformación genética de
albahaca (*Ocimum basilicum*)**

QUE PRESENTA:

Hilda Erendira Dimas Estrada

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Juan Florencio Gómez Leyva

REVISORES DE TESIS:

**Dra. Irma G. López Muraira
Dra. Paola Andrea Plameros Suárez**

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS EN AGROBIOTECNOLOGÍA

TLAJOMULCO DE ZÚÑIGA, JALISCO. DICIEMBRE, 2018.

ÍNDICE GENERAL

| | Pág |
|---|-----|
| ÍNDICE DE FIGURAS | i |
| ÍNDICE DE CUADROS | ii |
| RESUMEN | iii |
| ABSTRACT | iv |
| ABREVIATURAS | v |
| 1. JUSTIFICACION | 1 |
| 2. HIPÓTESIS | 2 |
| 3. OBJETIVO GENERAL | 2 |
| 4. OBJETIVOS ESPECIFICOS | 2 |
| 5. INTRODUCCIÓN | 3 |
| 6. ANTECEDENTES | 8 |
| 6.1 Generalidades de <i>O. basilicum</i> (Albahaca) | 8 |
| 6.2 Biotecnología vegetal en el mejoramiento genético | 9 |
| 6.3 Regeneración <i>in vitro</i> | 14 |
| 6.4 Estrés abiótico | 18 |
| 6.5 Transformación genética | 18 |
| 6.6 Marcador de selección | 20 |
| 6.7 Factores de transcripción | 21 |
| 7. MATERIALES Y MÉTODOS | 24 |
| 7.1 Establecimiento <i>in vitro</i> de albahaca | 24 |
| 7.2 Regeneración vía organogénesis directa de albahaca | 25 |
| 7.3 Evaluación de resistencia de albahaca a glufosinato de amonio | 25 |
| 7.4 transformación mediante <i>A. tumefaciens</i> | 25 |
| 7.5 Obtención del plásmido | 25 |
| 7.6 Extracción de ADN por CTAB | 27 |
| 7.7 Análisis por PCR de plantas transformadas de albahaca | 27 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 8 | RESULTADOS Y DISCUSIONES | 28 |
| 8.1 | Obtención de las semillas de albahaca | 28 |
| 8.2 | Albahaca <i>in vitro</i> | 29 |
| 8.3 | Ensayo con diferentes concentraciones de hormona | 31 |
| 8.4 | Ensayo de resistencia de albahaca al herbicida BASTA | 33 |
| 8.5 | Transformación genética de la albahaca | 35 |
| 9 | CONCLUSIONES | 43 |
| 10. | LITERATURA CONSULTADA | 44 |

RESUMEN

La albahaca (*Ocimum basilicum*) es una planta muy importante dentro de las hierbas aromáticas. Se ha popularizado su uso en la gastronomía y se ha encontrado que tiene diversos usos medicinales aliviando algunos malestares como pueden ser los dolores de cabeza, problemas gastrointestinales y antibacteriano. Tiene propiedades bioquímicas importantes como son actividad antioxidante debido a sus compuestos flavonoides y fenólicos, además de que acumula monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanoides. La principal problemática del cultivo son las enfermedades fungosas, el incremento a la tolerancia de factores abióticos como la salinidad y el uso eficiente del agua son de los mayores retos a los que el cultivo de albahaca se enfrentará. En el presente trabajo se estableció cultivo *in vitro* de albahaca y su regeneración vía organogénesis directa como una herramienta para producir plantas transgénicas. Se realizó la transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens* con un factor de transcripción de amaranto, el factor nuclear NF-Y cuya estructura tridimensional presenta brazos, uno de los cuales es capaz de encontrar una sección específica de ADN y reconocerla y el otro brazo es usado para unir RNA polimerasa específica. Se logró una transformación genética y la regeneración de plantas transgénica evaluada por PCR. Se continuara con la evaluación de los posibles efectos en la fisiología y bioquímica de la planta de albahaca transformada.

ABSTRACT

Basil (*Ocimum basilicum*) is a very important plant within aromatic herbs. Its use in gastronomy has been popularized and it has been found that it has different medicinal uses alleviating some discomforts such as headaches, gastrointestinal and antibacterial problems. It has important biochemical properties such as antioxidant activity due to its flavonoid and phenolic compounds, as well as accumulating monoterpenes, sesquiterpenes and phenylpropanoids. The main problem of the crop are the fungal diseases, the increase in the tolerance of abiotic factors such as salinity and the efficient use of water are the biggest challenges to which the cultivation of basil. In the present work, *in vitro* cultivation of basil was established and its regeneration via direct organogenesis as a tool to produce transgenic plants. Genetic transformation was carried out by *Agrobacterium tumefaciens* with an amaranth transcription factor, the nuclear factor NF-Y whose three-dimensional structure has arms, one of which is able to find a specific section of DNA and recognize it and the other arm is used to bind specific RNA polymerase. A genetic transformation and the regeneration of transgenic plants evaluated by PCR was achieved. We will continue with the evaluation of the possible effects on the physiology and biochemistry of the transformed basil plant.

ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------------|-------------------------------------|
| At | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> |
| BA | Benziladenina |
| EtOH | Etanol |
| Cl | Hipoclorito de sodio |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de hidrógeno |
| MS | Murashige y Skoog |
| LB | Medio de cultivo Luria-Bertani |
| Rf | Rifampicina |
| Sp | Espectinomicina |
| Cft | Ceftriaxona |
| Tris | Trishdroximetilaminometano |
| pH | Potencial hdrógeno |
| M | Moles |
| EDTA | Acido etilendiaminotetraacético |
| SDS | Dodecilsulfato sódico |
| μl | Microlitro |
| ml | mililitro |
| NaOH | Hidróxido de sodio |
| CH ₃ COOK | Acetato de Potasio |
| CH ₃ COOH | Ácido acético glacial |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| CTAB | Bromuro de hexadeciltrimetilamonio |
| TA | Temperatura ambiente |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |

ÍNDICE DE FIGURAS

| FIGURA | | Pág |
|---------------|--|------------|
| 1 | Plantas de albahaca <i>Ocimum basilicum</i> en campo | 3 |
| 2 | Esquema del gen transferido de <i>A. tumefaciens</i> a la planta | 7 |
| 3 | Fotografías de <i>A. tumefaciens</i> al microscopio electrónico | 10 |
| 4 | Transferencia de ADN de bacteria a la planta | 11 |
| 5 | Orden de las regiones del plásmido Ti de <i>A. tumefaciens</i> | 12 |
| 6 | Genes reporteros en la transformación de plantas | 21 |
| 7 | Factores de transcripción en respuesta al estrés abiótico | 23 |
| 8 | Plantas de albahaca crecidas en el invernadero | 29 |
| 9 | Semillas de albahaca germinadas en medio MS sin reguladores de crecimiento | 30 |
| 10 | Plántulas con sistema radicular vigoroso | 31 |
| 11 | Ensayo con diferentes concentraciones de BA | 32 |
| 12 | Ensayo del efecto de glufosinato de amonio sobre plántulas de albahaca | 34 |
| 13 | Cepa de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV2260 | 35 |
| 14 | Gel de agarosa 1.2 % para la observación del plásmido vector | 36 |
| 15 | Obtención de la cepa GV2269 de <i>A. tumefaciens</i> conteniendo el factor de transcripción NFY | 38 |
| 16 | Obtención de una colonia independiente de <i>A. tumefaciens</i> en medio LB en estría cruzada | 40 |
| 17 | Gel de Agarosa 1.2% para la observación de ADN plasmídico de diferentes cepas de <i>A. tumefaciens</i> | 40 |
| 18 | Producto de PCR de ADN plasmídico | 41 |
| 19 | Explantos de hojas cotiledonales de albahaca en medio de regeneración sin antibióticos | 41 |
| 20 | Explantos de hoja de albahaca en medio de regeneración sin antibiótico | 42 |
| 21 | Extracción de ADN de albahaca de plantas potencialmente transformadas | 41 |
| 22 | Producto de PCR de plantas de albahaca potencialmente transformadas | 42 |

ÍNDICE DE CUADROS

| CUADRO | | Pág |
|---------------|---|------------|
| 1 | Cultivo de hierbas aromáticas en México | 4 |
| 2 | Porcentaje obtenido en la desinfección de semillas de albahaca | 30 |
| 3 | Formación de brotes en diferentes concentraciones de BA | 32 |
| 4 | Efecto del glufosinato de amonio a diferentes concentraciones sobre la albahaca | 34 |

1 JUSTIFICACIÓN

La albahaca es una planta muy popular por sus propiedades tanto gastronómicas como farmacéuticas, sin embargo es vulnerable a temperaturas altas y también a heladas, además es sensible a enfermedades fungosas que causan daño en sus hojas y en su sistema vascular. Otra situación que enfrenta esta planta es la tolerancia a herbicida. Debido a que no existe un programa de mejoramiento genético para conferir nuevas propiedades bioquímicas y tolerancia a diversos factores bióticos y abióticos en la albahaca *Ocimum basilicum*, el presente proyecto plantea una estrategia novedosa para acelerar el proceso por el cual esperamos establecer las bases biotecnológicas e incorporar mediante la transformación genética genes de interés comercial y así obtener plantas resistentes a enfermedades, con interés culinario, agroindustrial y medicinal. Otra técnica con la que contamos es la regeneración *in vitro* que es otra de las herramientas que se tienen para la reproducción de esta planta conservando sus propiedades. Ya que en la actualidad hay pocos reportes de regeneración y transformación genética para la albahaca, la información generada en el presente trabajo aportará un avance significativo en el conocimiento de esta especie.

2 HIPÓTESIS

Las plantas de albahaca *Ocimum basilicum* regeneradas *in vitro* y transformadas por medio de *Agrobacterium tumefaciens* muestran resistencia al herbicida BASTA (glufosinato de amonio) en condiciones *in vitro*.

3 OBJETIVO GENERAL

Establecer un sistema de regeneración *in vitro* y transformación genética vía *Agrobacterium* para albahaca (*Ocimum basilicum* L.)

4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Establecer un sistema de regeneración y micropropagación *in vitro* para la producción de plantas de albahaca var. Nunifar.
2. Establecer un sistema de producción de plántulas *ex vitro* para su adaptación en condiciones de invernadero.
3. Desarrollar un sistema para la transformación genética con *Agrobacterium tumefaciens*.
4. Evaluar la expresión de genes introducidos mediante PCR
5. Evaluar la tolerancia a la sequía de las plantas transformadas con el factor NF-Y

5 INTRODUCCIÓN

La albahaca (*Ocimum basilicum* L.) es una planta originaria de Asia meridional específicamente de la India (Viera y Simon, 2000) y ha sido encontrada en regiones templadas y tropicales del sur de Asia. El género *Ocimum* presenta distribución en África y América Central (Darrah, 1998). Su cultivo como hierba culinaria se desarrolló a partir del siglo XVII en el sur de Francia, siendo también frecuente en Marruecos, Madagascar e Isla de Reunión.

Es una planta anual, herbácea, tallos erectos y ramificados, es frondosa, hojas de 2 a 5 cm suaves oblongas, opuestas, pecioladas, lanceoladas y ligeramente dentadas, flores dispuestas en espigas, sus colores varían de verde, blancas, amarillas y hasta púrpuras (Fig. 1). De las más de 40 variedades de albahaca *Ocimum basilicum* es la más conocida y cultivada (Contreras y Gómez, 2008)



Fig 1. Plantas de albahaca *Ocimum basilicum* en campo

Su clasificación taxonómica es:

Reino.- Plantae

Phylum.- Magnoliophyta

Clase.- Magnoliopsida

Orden.- Lamiales

Familia.- Lamiaceae

Género.- Ocimum

Especie.- basilicum

Los países productores de esta planta son España, Italia, Francia, Egipto y México. Particularmente en México se tienen reportes de que de las 8351 ha que se destinan a la producción comercial de hierbas aromáticas, el cilantro ocupó el 71%, la manzanilla el 10% y la albahaca el 5% ésta última ocupando una superficie sembrada de 441.5 ha con un rendimiento de 8.20 ton ha⁻¹ a un precio de 13,769.00 por ton. (SIAPA, 2012).(Cuadro 1)

Cuadro 1. Cultivo de hierbas aromáticas producidas en México

| Cultivo | Sup. Sembrada (ha) | Rendimiento (t ha) | Precio/t (pesos) |
|------------|--------------------|--------------------|------------------|
| Albahaca | 441.5 | 8.20 | 13,769 |
| Cilantro | 5,931.5 | 9.21 | 3,659 |
| Manzanilla | 869 | 1.62 | 10,465 |

Económicamente hablando la albahaca produce anualmente 100 ton de aceite esencial a nivel mundial con un valor comercial como hierba de maceta de alrededor de los 15 millones de dólares por año. Actualmente su uso se ha popularizado en el área de la gastronomía y por sus altos beneficios medicinales, se emplea para combatir algunas enfermedades como la depresión, insomnio, jaqueca y ayuda a la digestión.

Entre las propiedades bioquímicas de la albahaca están sus propiedades antioxidantes debido a sus compuestos flavonoides y fenólicos. Esta planta acumula monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanoides. El principal compuesto de los aceites esenciales son los monoterpenos oxigenados y derivados de fenilpropanoides. La variedad individual de las lamiaceas dificulta su uso con propósitos farmacéuticos por su heterogeneidad genética y bioquímica (Shetty, 1997; Vieira et al, 2001). Por estas propiedades y su importancia comercial es preponderante producir la albahaca de manera orgánica y bajo condiciones controladas, por lo que el uso de técnicas como la regeneración *in vitro* y la transformación genética, se vuelven herramientas clave para la producción de esta planta.

Regeneración *in vitro*

El cultivo *in vitro* es considerado un medio efectivo de multiplicación rápida de plantas de las cuales se quiere obtener una alta uniformidad en la progenie. El interés de esta técnica se ha incrementado por la propagación a larga escala de plantas aromáticas y de interés medicinal. (Sahoo et al., 1997). La técnica de reproducción de tejidos vegetales es el cultivo *in vitro*, cuya ventaja es que se realiza en condiciones 100% asépticas y en la que a partir de un pequeño segmento inicial se puede regenerar en un lapso corto una gran cantidad de plantas genéticamente iguales a la planta madre siempre y cuando a este cultivo se le hayan agregado componentes físicos y químicos en situaciones controladas en un medio de cultivo (Osorio, J., 2014). Existen pocos reportes de regeneración *in vitro* de explantes de *Ocimum basilicum* (Sahoo, et al., 1997; Phippen and Simon, 2000; Saha, et al; 2010). Esta micropropagación provee los medios para clonar especies de plantas en particular y proveer las bases para la manipulación y selección genética.

Marcador de selección

El glufosinato de amonio es un herbicida, no selectivo, es ampliamente utilizado en la agricultura ya que sólo actúa sobre partes verdes de la planta (BayerCropScience, 2005). Lo que la hace mortal para las plantas, es que contiene al isómero L de la fosfotricina, el cual es el que le confiere su acción herbicida y su función es inhibir la actividad de la enzima glutamina sintetasa, ésta interviene en la asimilación del nitrógeno y esto causa que se alcancen niveles tóxicos de amonio en las células de las plantas. Se le conoce por diferentes nombres como BASTA, Liberty, Finale y Rely (BayerCropScience, 2005). La resistencia a este herbicida ha sido desarrollada a través de un sistema de detoxificación. El glufosinato de amonio es un herbicida de amplio espectro que se usa para controlar importantes malezas como varias especies de la familia convolvulaceae y también a *Sesbania bispinosa*, *Polygonum pensylvanicum* y *Cyperus esculentus*, tiene acción similar al glifosato. Se aplica a plantas jóvenes durante su desarrollo para una completa efectividad.

Transformación genética por *Agrobacterium*

La biotecnología en términos generales es la utilización de organismos vivos o partes de éste con el objetivo de modificarlo y obtener una mejora u obtener un producto. La producción de una planta transgénica implica el desarrollo de un sistema de regeneración y de transformación. Existen diferentes razones para el desarrollo de plantas transgénicas, entre otras, que se les puede adicionar un gen o genes que generalmente mejora su valor tanto nutricional como económico además resistencia a estrés ambiental; otra característica de las plantas transgénicas es que pueden actuar como biorreactores para la producción barata de proteínas o metabolitos; en el caso de la albahaca se han realizado estudios para observar su potencial como fuente de metabolitos secundarios (Bhuvaneshuari, et al, 2015) además de que la transgénesis de plantas proporciona medios eficaces para el estudio de la acción de genes durante el desarrollo y otros procesos biológicos de las plantas (Carranza Domínguez, D.)

La tecnología del DNA recombinante es una herramienta para la manipulación de DNA de plantas. Existen diferentes métodos de transferencia de DNA. Uno de los sistemas que se utilizan para la transformación es el que se basa en el uso de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, ésta es una bacteria gram negativa que está en el suelo y es capaz de infectar a numerosas especies de plantas dicotiledóneas y a algunas monocotiledóneas y gimnospermas. Tras la infección es capaz de transferir una parte de la información genética que contiene en un plásmido y de integrarla en el genoma de la planta. Al plásmido se le conoce como plásmido Ti (Inductor de tumores) y a la región que se transfiere como T-DNA (DNA transferido).



Fig 2. El gen que va a ser transferido está compuesto por una secuencia codificante (el gen de interés) y por secuencias regulatorias. Las secuencias regulatorias son los promotores (P) que determinan el momento, lugar y nivel de expresión de cada gen y los terminadores (T), que indican la terminación de la transcripción.

6 ANTECEDENTES

6.1 *Ocimum basilicum* Albahaca

La albahaca (*Ocimum basilicum*) es una hierba perenne y es ampliamente utilizada como hierba ornamental o en los campos de cultivo en los países mediterráneos, sus aceites son usados para preparar agentes saborizantes y bebidas. También es utilizada en limpiezas dentales y preparaciones orales y como componente para perfumes. Posee acción insecticida y se usa como repelente de insectos, sus propiedades son efectivas contra las moscas y los mosquitos. La poca experiencia práctica que se tiene en propagación *in vitro* se tiene con especies tales como *Ocimum americanum* (Pattnaik y Chand, 1996), *Ocimum sanctum* (Singh y Seghal, 1999; Shazhad y Siddiqui, 2000). La información actual de regeneración por explantes de *Ocimum basilicum* se tiene por unos cuantos reportes (Sahoo et al., 1997; Pippen and Simon, 2000; Saha et al., 2010).

Estas plantas son importantes tanto como para remedios medicinales como para alimentación humana. Es tan importante que el 80% de la población de los países desarrollados usan la medicina herbal como remedio para sus necesidades de salud. Para realzar la importancia de las plantas en el descubrimiento de nuevos y seguros agentes terapéuticos se ha observado la actividad farmacológica de estas hierbas y sus constituyentes fitoquímicos convirtiéndose en un campo de actividad e investigación alrededor del mundo.

La palabra *Ocimum* viene del griego *ozo* que significa olor y es apropiado para las diversas especies del género *Ocimum* ya que son conocidas por su peculiar y fuerte olor en el campo. La palabra *basilicum* es del latín traducida al griego como *basilikon* que significa rey y por esta misma razón la hierba es llamada “Hierba royal” en francés.

De acuerdo a diferentes estudios existen diferentes combinaciones de aceites esenciales que hacen que las variedades de *Ocimum* tengan diferentes fragancias, estas variedades químicas se han encontrado en diferentes regiones del mundo, pero de acuerdo a un estudio la composición básica de aceites esenciales es de eucalyptol (1.79%), linalool (12.63%), α -terpineol (0.95%), eugenol (19.22%), β -elemene (2.68%), α -bergamotene (3.96%), α -guaiene (2.33%), germacrene D (8.55%), cubenol (1.78%), tau-cadinol (15.13%), camphor (0.70%),

bornil acetate (1.97%), β -cariophyllene (0.61%), α -cariophyllene (1.67%), elixen (2.59%), β -cadinene (0.80%), α -copaene (0.33%), metil eugenol (0.76%), β -farnesene (0.58%), epibiciclosesquiphelandrene (0.76%), tau muralol (0.96%), α -bisabolol (0.35%), δ -gurjunene (5.49%) and δ -cadinene (5.04%) (Khair et al., 2012)

6.2 Biotecnología vegetal en el mejoramiento genético

El uso de organismos vivos o partes de éste, para modificarlo y obtener un producto y así realizar una mejora para algún objetivo en particular es conocido como Biotecnología. Estos procedimientos biotecnológicos se llevan a cabo utilizando técnicas de ingeniería genética y cultivo de tejidos vegetales *in vitro*.

A las plantas resultantes de estos procedimientos se les llama transgénicas. Básicamente se introduce ADN foráneo en el genoma de sus células, al expresarse éste ADN le otorga a la planta carácter nuevo y "mejorado". La Biología Molecular y la Ingeniería Genética en plantas, se inician con el descubrimiento y estudio de la bacteria *A. tumefaciens* (De Cleeney, 1976)

Actualmente se conocen diferentes sistemas de transferencia de ADN, los directos y los basados en vectores biológicos, de éstos últimos están los que se basan en virus vegetales y los que utilizan *Agrobacterium rhizogenes* y *Agrobacterium tumefaciens*.

- A. *tumefaciens* es una bacteria Gram negativa, es móvil, en forma de bastón y es una bacteria del suelo, está muy relacionada con la bacteria N-fixing *rhizobium* la cual forma nódulos en las raíces en plantas leguminosas (Ream, 2002)

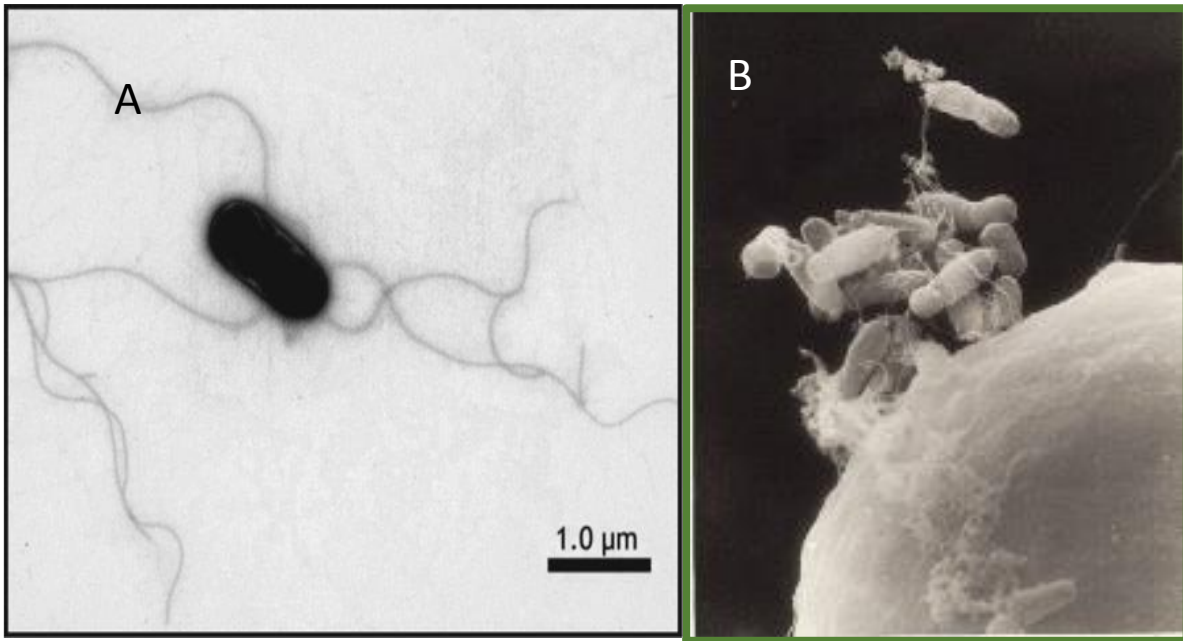


Fig. 3. A) *Agrobacterium tumefaciens* al microscopio electrónico. B) *Agrobacterium tumefaciens* adhiriéndose a células de zanahoria. (De Jeon, 2008).

Tanto *A. tumefaciens* (Fig 3) como sus especies relacionadas *A. rhizogenes* y *A. vitis* son patógenos reconocidos de plantas, las cuales tienen la capacidad de que pueden integrar su material genético de manera estable dentro del genoma del hospedero que en este caso sería una planta (Tzfira y Citovsky, 2000)

Las plantas transgénicas constan de genotipos que expresan características de interés mediante la integración en el genoma vegetal de segmentos de DNA foráneo que proviene de cualquier otro origen. Este DNA extraño altera las características de la planta de interés mediante la modificación dirigida de su genoma al añadir, eliminar o modificar a alguno o algunos de sus genes. (Danilova, 2007; Karimi et al., 2007). Desde el descubrimiento de que *A. tumefaciens* provoca la formación de tumores en plantas, esta bacteria ha sido fundamental para su uso como herramienta en la ingeniería genética de plantas. Este proceso sucede de manera natural en la planta al ser sometida a una herida (Fig 4)

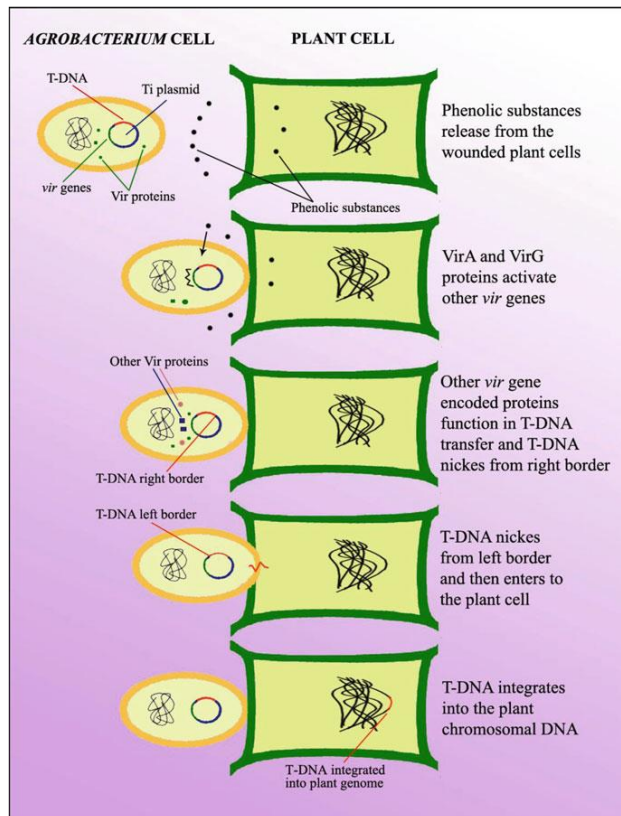


Fig. 4 Transferencia natural del gen de *Agrobacterium tumefaciens* a una célula de la planta (Ozcan et al., 2004)

Se sabe que durante el proceso de infección que provoca *A. tumefaciens* en la planta, ésta introduce parte de su ADN al cual se le llama ADN de transferencia (ADN-T) y este es integrado dentro del genoma de la planta. Este ADN-T es expresado en la planta y entonces provocan o inducen la formación de tumores y así la síntesis de unos derivados de aminoácidos llamados opinas.

El ADN de transferencia está localizado en el plásmido llamado Plásmido inductor de tumor (Ti), éste además contiene los genes *vir* los cuales son necesarios en la transferencia del ADN de la bacteria al ADN de la planta. Actualmente se sabe que sólo las secuencias borde del ADN-T son cruciales para la transferencia se lleve a cabo, esta información es básica, ya que permitió

el diseño de vectores (Fig 5) para la transformación genética de plantas mediada por el uso de especies de *Agrobacterium* (Garfinkel et al., 1981; Zambryski et al., 1983)

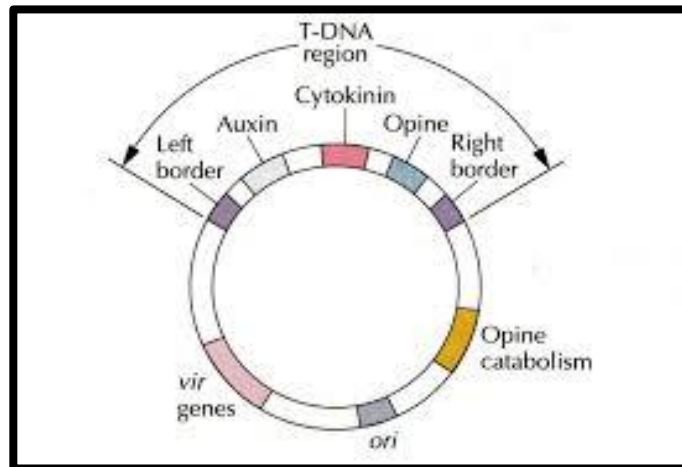


Fig 5. Orden de las regiones génicas del plásmido Ti de *Agrobacterium*

En el caso de la albahaca se han realizado estudios para observar su potencial como fuente de metabolitos secundarios (Bhuvaneshwari et al., 2015) para el estudio de la acción de genes durante el desarrollo y otros procesos biológicos de las plantas (Carranza Domínguez Diana)

Otro uso importante que se le ha dado a la albahaca particularmente a sus semillas, es la extracción del mucílago para el tratamiento de aguas residuales que contienen colorantes (Solanki et al., 2013). Las semillas de la albahaca al mojarse se hinchan y producen un mucílago que es una fuente de polisacáridos y éstas se pueden utilizar en un proceso llamado coagulación-floculación el cual es un proceso efectivo y económico para el tratamiento de aguas residuales contaminadas con tintes y colorantes (Solanki et al., 2013).

Como ya se mencionó anteriormente *O. basilicum* es una fuente de agente coagulante altamente efectivo para el tratamiento de aguas residuales con colorantes utilizados en la industria textil, particularmente con el colorante rojo congo, sin alterar el pH del agua y con muy bajos niveles de tóxicos liberados al ambiente (Sorour et al., 2013).

O. basilicum es la hierba culinaria más importante cultivada en Estados Unidos, es una fuente esencial de aceites y oleorrecinas las cuales son usadas en la elaboración de comidas, sabores, perfumes y productos de aromaterapia (Garibaldi et al; 1997). Los fenilpropanoides son los componentes mayormente encontrados en aceites esenciales encontrados en clavo, nuez moscada, canela y especies de *Ocimum*, se usa especialmente con prooxidante y antioxidante en cosméticos y productos alimenticios (Atsumi, 2005).

La albahaca es originaria de Asia Meridional, pertenece a la familia de las lamiaceas y tiene amplios y variados usos debido a sus propiedades. Es específicamente de la India (Viera and Simon, 2000) y ha sido encontrada en regiones templadas y tropicales del Sur de Asia. El género *Ocimum* presenta distribución en África y América Central (Darrah, 1998)

Su propagación se puede llevar a cabo por estacas o semillas, se puede reproducir en distintos tipos de climas, áridos y semiáridos, esto se relaciona con el fotoperiodo, así como en un gradiente altitudinal de 0 a 1000 m (Enciso, 2004). La albahaca se diferencia entre sí por la diferencia en su color, tamaño, y sabor, debido a estas diferencias se conocen alrededor de 50 especies. (Sánchez y Lucero, 2012)

Es una planta vulnerable a altas temperaturas y heladas. Los agentes causales de enfermedades fungosas en las hojas y afectaciones vasculares en las plantas son: *Cercospora ocimicola*, *Curvularia* sp, *Fusarium* sp y *Alternaria* sp. Además del combate a enfermedades fungosas, el incremento a la tolerancia de factores abióticos como la salinidad y el uso eficiente del agua son de los mayores retos a los que el cultivo de albahaca se enfrentará durante las siguientes décadas.

Los estados más importantes en México que son los principales productores de hierbas aromáticas de exportación al cumplir con los protocolos de buenas prácticas agrícolas o certificación orgánica son: Morelos, Baja California Sur, Baja California, Edo. de México, Nayarit, Oaxaca, Puebla y Tlaxcala (Pérez et al., 2012).

Ocimum basilicum es la hierba culinaria más importante cultivada en Estados Unidos, es una fuente esencial de aceites y oleorrecinas las cuales son usadas en la elaboración de comidas, sabores, perfumes y productos de aromaterapia (Garibaldi et al., 1997). Se emplea para

combatir algunas enfermedades como la depresión, insomnio, jaqueca y ayuda a la digestión. Entre las propiedades bioquímicas se conoce que tiene actividad antioxidante debido a sus componentes flavonoides y fenólicos. La planta acumula monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanoides. El principal compuesto de los aceites esenciales, son los monoterpenos oxigenados.

Los fenilpropanoides son los componentes mayormente encontrados en aceites esenciales encontrados en clavo, nuez moscada, canela y especies de *Ocimum*, se usa especialmente como prooxidante y antioxidante en cosméticos y productos alimenticios (Atsumi y Tonosaki, 2005).

La demanda por la albahaca fresca ha llevado a un sistema de producción en campo e invernadero, sin embargo, se han reportado grandes pérdidas debido a patógenos y pesticidas (Simon et al., 1990; Juliani et al., 2008) por lo que se requiere de una agricultura ecológica, biodinámica y biológica. En la actualidad existe una gran demanda de alimentos sanos y frescos y que no contengan contaminantes o patógenos (Pérez et al., 2012)

6.3 Regeneración *In vitro*

El cultivo *in vitro* es una técnica cuya ventaja es que se realiza en condiciones 100% asépticas y en la que a partir de un pequeño segmento inicial se puede regenerar en un lapso corto una gran cantidad de plantas genéticamente iguales a la planta madre, siempre y cuando a este cultivo se le hayan agregado componentes físicos y químicos en condiciones controladas. Esta es la razón por la que se utiliza cuando es necesario obtener una alta uniformidad en la progenie. El interés en esta técnica se ha incrementado, entre otras razones por el interés de propagar a gran escala plantas de interés medicinal y aromático (Sahoo et al., 1997).

Se pueden nombrar diferentes ventajas del cultivo *in vitro*:

- Permite controlar las condiciones ambientales, debido a su independencia de los mismos (luz, temperatura y humedad controlada)
- Permite estudiar diversos procesos fisiológicos

- Evita el riesgo de contaminación por patógenos ya que se realiza en medios esterilizados
- Se pueden obtener una gran cantidad de individuos en espacios reducidos
- Permite la obtención de individuos uniformes
- Facilita el transporte del material

Una parte importante de esta técnica es el explante el cual se define como un tejido vivo separado de su propio órgano o planta original y se transfiere a un medio artificial de crecimiento, este explante está condicionado por el sistema de regeneración que se va a utilizar. El objetivo principal de toda investigación es obtener excelentes resultados, por lo que se recomienda utilizar explantes jóvenes. Es importante saber qué tamaño de explante se va a utilizar y esto dependerá de la especie, entre mayor sea el tamaño la respuesta de regeneración será mayor pero esto incrementa el peligro de contaminación. (Mroginski et al., 2004).

Por otra parte uno de los problemas más grandes que se tiene con esta técnica es el de la contaminación por diferentes microorganismos, los cuales compiten por los nutrientes del medio en el que se desarrolla la planta, por lo que se recomienda realizar una desinfección del explante a utilizar. También es recomendable que el material, instrumentos y medio sean esterilizados. Este medio de cultivo debe incluir los nutrientes necesarios (macro y microelementos y fuentes de carbono), compuestos orgánicos (vitaminas) y reguladores de crecimiento. El medio más comúnmente utilizado es el medio Murashige y Skoog en 1962, conocido comúnmente como MS, éste se suplementa con sacarosa como fuente de carbono.

Se tienen estudios de unos cuantos reportes de regeneración múltiple de explantes de *Ocimum basilicum* L. (Sahoo et al., 1997; Phippen y Simon, 2000). Ekmekci y Aasim (2014), reportaron el desarrollo de un protocolo de regeneración de albahaca de Turkia. Después de la desinfección de las semillas, se aislaron explantes de epicotilo, hipocotilo y punta de brote de 12 a 14 días crecidas *in vitro* en medio MS conteniendo 0.80-2.40 mg L⁻¹ con o sin 0.10 mg L⁻¹ de IBA adicionado con 1.0 mg L⁻¹ PVP y 3.0 g L⁻¹ de carbón activado. La frecuencia de

regeneración de explantes de epicotilo, hipocotilo y punta de brote tuvieron un rango de 75.0-100, 25.0-83.33 y 66.67-100% respectivamente. El máximo número de explantes de epicotilo (3.22) y de punta de brote (3.58), se observaron en medio MS conteniendo 2.40 mg L⁻¹ de TDZ-0.10 mg L⁻¹ IBA, por otro lado para el máximo número (5.17) explantes de hipocotilo

Shivani, (2016) reporta que se han realizado trabajos con raíces transformadas que sirven como sistemas modelos en investigación de micorrizas para examinar las diferencias y similitudes entre ontogénesis micorrícica natural e *in vitro* así como la producción de propágulos micorrícicos en condiciones axénicas, evaluación de dependencia hospedera, asimilación de nutrientes y estudios genotípicos. (Declerck et al., 1996; Tiwari y Adholeya, 2002; Toussaint et al., 2004; Kumari et al., 2013).

Srivastava et al. (2016) desarrollo un Sistema de crecimiento *in vitro* para la selección de cultivares de élite (alta producción de ácido rosmarínico) en cultivares de *Ocimum basilicum* seguido por su transformación mediada por *Agrobacterium rhizógenes* para la selección de tres líneas de raíces transformadas para una alta producción de ácido rosmarínico.

Shahzad et al. (2012), desarrollaron un sistema de microporopagación para el desarrollo de explantes de *Ocimum basilicum* usando explantes nodales. Para el crecimiento de los nodos se utilizó medio Murashige y Scroog con reguladores de crecimiento 6-benziladenina y 2-isopentanyl adenina.

Bicca et al. (2003), reportaron la microporopagación de *Ocimum basilicum* utilizando hojas cotiledóneas de plantas germinadas *in vitro*, los cotiledones de semillas fueron usados como explantes iniciales en medio MS con 0.2 mgL⁻¹ NAA (1 Acido naftalenacético) en combinación con 0-5 mg L⁻¹ BA (6 benzil aminopurina) y dejados a 28 ±1 °C por fotoperiodos de 16 h y 48 μmol.m-2 s⁻¹ densidad de flujo, por 45 días. Los resultados de este trabajo demostraron que la más alta eficiencia de formación de brotes después de 45 días ocurrió en el medio que contenía 5 mg L⁻¹ de BAP y 0.2 mg L⁻¹ de NAA. En este trabajo se pudo observar que la presencia de NAA inhibió La formación de raíces cuando hubo una combinación de diferentes concentraciones de citoquinina (BA, 1 a 5 mg L⁻¹. La más alta concentración de BAP indujo un incremento en el número de explantes con brotes y el más alto número de brotes cotiledonales.

Ilhan et al. (2008), reportaron la actividad antimicrobiana de extractos de cloroformo, acetona y dos diferentes concentraciones de extracto de metanol en *O. basilicum*. Estos estudios se realizaron con plantas *in vitro* contra 10 bacterias y 4 cepas de levaduras para el método de difusión de disco. Los resultados indicaron que los extractos de metanol de *O. basilicum* mostraron actividad antimicrobiana contra los organismos estudiados. Mientras que los extractos de cloroformo y acetona no tuvieron efecto, los extractos de metanol presentaron zonas de inhibición contra cepas de *Pseudomona aeruginosa*, *Shigella sp*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y dos diferentes cepas de *E. coli*.

Karuppiah, (2016) reportó una estandarización de cultivo *in vitro* de *Ocimum basilicum* y *Ocimum tenuiflorum* para incrementar la distribución de eugenol., en comparación con las plantas crecidas en campo. El eugenol se cuantificó usando un método optimizado de HPLC y se midió su relación con el contenido de fenólicos totales (TPC). También gracias a este estudio se reportó que los embriones somáticos y las hojas de crecidas *in vitro* de ambas especies (OB y OT) contenían cantidades similares de eugenol ($85 \mu\text{g g}^{-1}$ aproximadamente) que es un número más alto que las cantidades encontradas en las plantas crecidas en campo que fue de $30.2 \mu\text{g g}^{-1}$ y $25.1 \mu\text{g g}^{-1}$ respectivamente. Estos resultados también determinaron que las plantas crecidas *in vitro* fueron más ricas en TPC que las crecidas en campo. Por lo que se concluyó que las albahacas crecidas *in vitro* de ambas especies son recomendadas para el aumento del aceite esencial eugenol.

Spiridon et al. (2003) demostraron que los cultivos en suspensión pueden ser una fuente eficiente en la producción de ácido rosmarínico. La suspensión derivada de hojas de albahaca (*O. basilicum*) tuvo una acumulación de ácido rosmarínico por encima de 10 mg g^{-1} en peso seco, con un valor 11 veces mayor que el cultivo de callos de las plantas donadas. Las células inmobilizadas acumularon menos de 15 mg g^{-1} de ácido rosmarínico.

6.4 Estrés abiótico

El estrés abiótico se puede considerar que es un impacto negativo de los factores a los que se les puede llamar no vivos sobre organismos vivos en un medio ambiente específico. Estos factores deben influir en este medio ambiente alterando de manera negativa el desempeño de la población o incluso afectar la fisiología de cada individuo significativamente. Las plantas muestran una respuesta cuando son expuestas a cualquier tipo de estrés, a esto se le llama resistencia o por el contrario mostrar mecanismos que le permiten reaccionar de manera positiva a este estrés y reparar el impacto del daño que ha ocurrido por lo que muestra tolerancia (Levitt, 1980; Bray et al., 2000)

Nobuhiro et al. (2005) reportó que a nivel mundial existen grandes pérdidas en la agricultura a causa del estrés abiótico, por lo que las plantas necesitan adaptarse a estas condiciones adversas tales como las sequías, la salinidad, el calor e incluso el uso de herbicidas,. Estas respuestas que presentan las plantas a estos cambios fisiológicos suceden a nivel transcriptómico, celular y fisiológico (Atkinson y Urwin, 2012)

La adaptación de las plantas está mediada por complejas redes de factores de transcripción y de otros genes regulatorios que controlan múltiples vías de enzimas de defensa y proteínas. En los últimos años las plantas aromáticas han tenido una creciente demanda de sus productos. Desde etapas tempranas las plantas cultivadas deben enfrentar condiciones de estrés abiótico que influye en la germinación y emergencia de la plántula (Mokhberdoran et al., 2009).

6.5 Transformación genética

Molphe (2017), considera que existen tres factores que afectan a la agricultura actualmente, uno sería el constante crecimiento de la población humana y el aumento en la expectativa de vida, en segundo lugar ya no se pueden abrir nuevas áreas para la agricultura para evitar la pérdida de áreas naturales las cuales se han visto reducidas por crecimiento indiscriminado de las poblaciones urbanas y por último, el cambio climático está obligando a cambiar las prácticas agrícolas. Por todo lo anterior el uso de las plantas transgénicas es una herramienta indispensable para satisfacer la demanda de productos alimenticios en la realidad actual.

Como reporta De Cleene y De Ley (1976), la ingeniería genética en plantas se inició con el descubrimiento de una bacteria del suelo, que en su mayoría afecta a las dicotiledóneas a las cuales dentro de su ciclo inserta genes extraños en las plantas ocasionando que se expresen en forma de proteína. Esta bacteria denominada *A. tumefaciens* es una bacteria Gram negativa y provoca la formación de tumores generalmente en la unión del tallo con la raíz, a estos tumores se les conoce como agalla de la corona.

Armin, (1947) cultivó tejido de la agalla libre de bacteria y observó que los tumores crecían *in vitro* en un medio básico carente de auxinas y citoquininas, por lo que se pudo observar que la bacteria introducía en sus células un “principio tumorígeno”. Fue en 1974 cuando Jeff Schell, Marc Van Maontangu y sus colaboradores observaron que este principio tumorígeno se refiere a la transferencia de un fragmento de DNA al que se le llamó T-DNA que se localizaba dentro de un plásmido al que se le llamó Ti (Inductor de tumores), observaron que este T-DNA se integraba al genoma nuclear de la planta y su expresión inducía los tumores en la planta dándole este fenotipo característico.

La ingeniería genética permite acelerar procesos y ofrece la oportunidad de otorgar a una planta cierta característica en particular, generalmente de mejoramiento, en un solo paso. Esta parte de la genética comprende una serie de técnicas que se complementan con las técnicas convencionales de mejoramiento genético (Jauhar, 2006; Livermore, 2002).

La producción de plantas transgénicas es un proceso complicado que involucra varias etapas:

- Identificación y aislamiento del gen de interés
- Desarrollo de la construcción quimérica
- Método para la introducción del DNA de manera estable en el genoma de la célula vegetal
- Sistema de cultivo de tejidos que permita regenerar plantas completas
- Procedimiento para la distinción de los individuos transformados de los no transgénicos
- Método analítico para detectar el gen foráneo y su producto en la planta transformada.

La estrategia de adaptación de las plantas depende principalmente de la regulación temporal y espacial de los genes de transcripción a través de los factores de transcripción (TFs) (Roy, 2008).

Para llevar a cabo la transformación genética existen diferentes sistemas de transferencia de DNA, los directos y los indirectos que están basados en vectores biológicos, entre estos últimos se encuentran los virus vegetales y los basados en *Agrobacterium rhizógenes* y *Agrobacterium tumefaciens*. Estas bacterias contienen en su interior moléculas muy pequeñas llamadas plásmidos, es ADN circular capaz de replicarse en forma autónoma, esto lo hace de manera independiente al cromosoma, los plásmidos más pequeños existen en las células bacterianas en un número elevado de hasta 100 copias por célula. Estos se pueden usar como “vectores” para introducir en ellos cualquier fragmento de ADN de interés y de esta forma amplificarlo de forma natural dentro de la bacteria en la que el plásmido se replica (Caballero et al., 2003)

6.6 Marcador de selección

El marcador de selección en el presente trabajo es el glufosinato de amonio conocido comercialmente como BASTA. Se requiere de un marcador de selección ya que para poder establecer un sistema de transformación genética es necesario que la construcción que se pretende introducir tenga genes marcadores que permitan la selección de los tejidos transformados. Los genes marcadores más utilizados para la transformación genética son los *neo* y *hpt* que confieren resistencia a los antibióticos kanamicina e higromicina y el gen *bar* o *pat* a los herbicidas que tienen como ingrediente activo la fosfinotricina (Miki y McHugh, 2004). Actualmente se tiene el conocimiento de que el primer gen marcador registrado en la genética de plantas fue el gen de resistencia a kanamicina, lo que permitió seleccionar células transformadas y así poder regenerar a partir de ellas plantas enteras en medios de cultivo que contuvieran a la kanamicina. Para la identificación de células transgénicas se necesitan genes marcadores que se introduzcan entre los bordes del T-DNA de *Agrobacterium* en su correspondiente módulo de expresión.

Generalmente los genes de selección suelen ser un antibiótico o un herbicida que añadido al medio de cultivo mata células no transformadas. El gen *nptII* o de la neomicina fosfotransferasa es el marcador de selección que más se utiliza actualmente (Neyoy Siari, 2012)

Otro tipo de marcadores son los marcadores informadores, (Fig. 6) estos otorgan a la célula una característica física que la hace distinguible a las no transformadas. Por lo general los genes marcadores informadores codifican enzimas que cuando el sustrato es apropiado junto con el medio con las células vegetales, producen una reacción en las células transformadas que permite su fácil identificación.

| Genes reporteros | Abreviatura | Origen | Detección |
|--|--------------------|--------------------------|---|
| β-glucuronidasa | <i>gus/uidA</i> | <i>E. coli</i> | Fluorométrico (cuantitativo) o histoquímico (<i>in situ</i>), no radiactivo |
| Proteína de fluorescencia verde | <i>GFP</i> | <i>Aequorea victoria</i> | Fluorescencia, no destructiva |
| Cloranfenicol acetiltransferasa | <i>Cat</i> | <i>E. Coli</i> | Ensayo radiactivo sensitivo, semi cuantitativo |
| Luciferasa | <i>Luc</i> | <i>Photinus pyralis</i> | Luminiscencia |
| Luciferasa | <i>luxA, luxB</i> | <i>Vibrio harveyi</i> | Luminiscencia |

Fig 6. Ejemplos de Genes reporteros y como ayuda a detectar células vegetales transformadas

6.7 Factores de transcripción

Se sabe que en cada célula debe existir un programa de regulación de la expresión génica que se adapte a sus funciones particulares y su entorno. Parte muy importante de este programa son los factores de transcripción.

Se considera a los factores de transcripción como proteínas que se especializan en reconocer secuencias específicas en la región reguladora de los genes. Esta unión regula la expresión y producción de la proteína codificada por este gen. (Bojorquez, 2003). Estos factores de transcripción regulan diversas vías metabólicas que permiten restaurar la homeostasis en las

plantas durante periodos de estrés y esto aumenta la probabilidad de éxito. Gracias a estas características son buenos candidatos para la obtención de plantas genéticamente modificadas para que estas puedan resistir a condiciones desfavorables (Reguera et al., 2012). En el genoma de las plantas aproximadamente el 7% de las secuencias codificantes son factores de transcripción (Udvardi et al., 2007)

Los factores de transcripción tienen la capacidad de unirse a secuencias cortas conservadas que están dentro de cada uno de los promotores de los genes. Se sabe que algunos de estos factores son comunes en varios genes y se pueden encontrar en una cierta variedad de promotores que causan que se usen de manera constitutiva, por otro lado existen otros factores que son bastante específicos por lo que su utilización está bastante regulada.

Existen diferentes familias de factores de transcripción las cuales son importantes en la transducción de señales en una planta sometida a estrés abiótico (Fig. 7) Actualmente se sabe que estos factores de transcripción funcionan como centro de redes de respuesta acompañados de proteínas que permiten la formación de una red dinámica que les permite fungir como nodos entre diversas vías (Lindemose et al., 2013).

Una de las familias de factores de transcripción es la familia del Factor Nuclear Y (NF-Y). También se le conoce como proteína asociada al grupo Hemo (HAP) y como factor de unión a la caja CCAAT. Se considera que es importante regulador en numerosos procesos de desarrollo en plantas y respuesta a estrés, está compuesto de tres subunidades, NF-YA, NF-YB y NF-YC (Petroni et al., 2012)

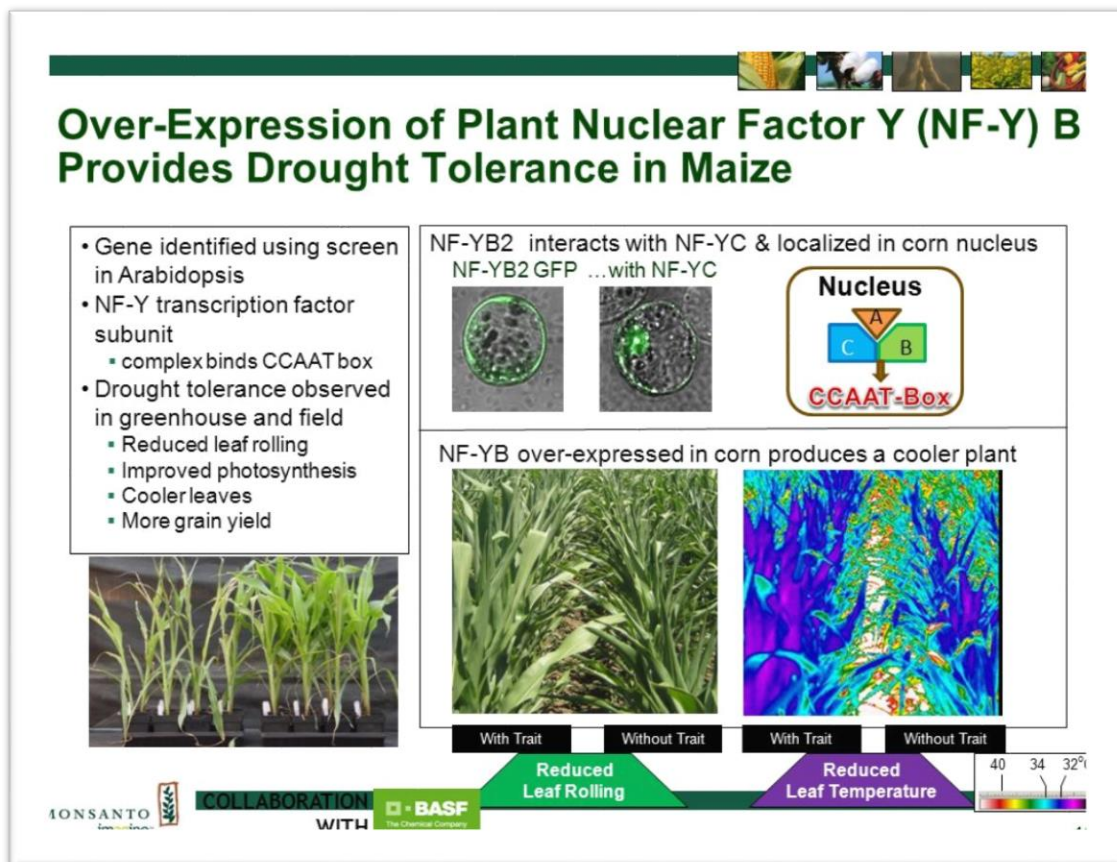


Fig 7. Ejemplo de cómo los factores de transcripción intervienen en el comportamiento de las plantas en respuesta a un estrés abiótico como el calor y el exceso de agua

7 MATERIALES Y MÉTODOS.

7.1 Establecimiento de albahaca *in vitro*

Se utilizaron semillas de albahaca, var. Nunifar, las cuales fueron colectadas de plantas adultas crecidas en el invernadero del laboratorio de Biología Molecular. Se probaron tres tratamientos para la desinfección los cuales se llevaron a cabo en la campana de flujo laminar y todo el proceso en frascos de vidrio estériles.

Tratamiento 1: consistió en lavar las semillas con agua destilada estéril y jabón comercial durante 5 min, posteriormente se pasaron a un frasco con EtOH al 70% durante 1 min. El siguiente lavado se realizó con Cl al 10% durante 10 min dividido en 5 min reposando y 5 min llevados al sonicador. Las semillas se pasaron a un frasco con H₂O₂ 5% durante 3 min y finalmente se realizaron tres lavados con agua destilada estéril. En este proceso se utilizó gasa estéril para ir colando las semillas a cada frasco.

Tratamiento 2: se realizó un lavado de semillas con agua estéril y jabón (comercial) en un frasco de vidrio estéril durante 3 min. Las semillas se escurren y cuelan a través de una gasa estéril y se vacían en otro frasco que contiene EtOH 70% se agita levemente procurando que el alcohol haga contacto con cada semilla y se dejan reposar durante 5 min.

Se vuelven a escurrir las semillas utilizando otra gasa estéril para posteriormente pasarse a otro frasco que contiene Cl al 10% durante 5 min., sellando el frasco se llevan al sonicador por otros 5 min. Por último se realizaron tres lavados con agua destilada estéril durante dos min cada enjuague.

Tratamiento 3: las semillas se lavaron con jabón comercial y agua destilada estéril, se pasaron por una gasa estéril a un frasco con EtOH 70% por 1 min. Se volvió a pasar por una gasa estéril hacia un frasco con Cl al 10% por 10 min reposando y 10 min más en el sonicador. Se enjuagó al final tres veces con agua destilada estéril.

Terminado este proceso las semillas se sembraron en botes de plástico de ½ litro conteniendo medio MS sólido estéril. Se llevaron al cuarto *in vitro* a una temperatura de 28°C durante 23 días

7.2 Ensayo de concentración de fitorreguladores

Para conocer la concentración de la hormona Benzil Adenina (BA) que es necesaria para el crecimiento de plántulas de albahaca provenientes de explantes cotiledonales se tomaron las plántulas *in vitro* de 30 días de edad, se cortaron explantes de aproximadamente 5 mm y se pasaron a medio MS estéril al que se le adicionó diferentes concentraciones de BA, 5mg L⁻¹, 10 mg L⁻¹, 15 mg L⁻¹ y el testigo. Dejándolas en el cuarto *in vitro* a 28 °C con periodos de luz de 12 x 8 durante 21 días.

7.3 Ensayo resistencia de *Ocimum basilicum* al herbicida BASTA (Glufosinato de amonio)

Se preparó medio MS sólido y se vació en frascos de vidrio estériles, se agregaron 25 ml en cada frasco y se realizaron tres repeticiones de cada una de las concentraciones. Las semillas se colocaron en el Medio MS que contenía las concentraciones analizadas las cuales fueron de 0, 0.14, 0.28 y 0.56%. Las plántulas se dejaron durante 30 días en el cuarto *in vitro* a 28°C. Este procedimiento se llevó a cabo en la campana de flujo laminar.

7.4 Transformación genética

7.4.1 Obtención del plásmido

Se utilizó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 para extraer el plásmido pB7WG2D (Karimi et al., 2002). Se prepararon 250 ml de medio LB más Rifampicina (Rf) 50 mg/L + 3.75 g de Agar bacteriológico, el medio estéril se vació a cajas Petri hasta que el medio gelificó posteriormente se sembró la bacteria con una asa bacteriológica y se incubaron a 28°C durante 48 h en oscuridad. Pasado este tiempo la bacteria se sembró en 100 ml de medio LB líquido + Rf 50 mg/L y se vació a tubos de 15 ml, se incubó a 28°C durante toda la noche con movimiento constante. Posteriormente se centrifugó el tubo durante 5 min, se desechó el sobrenadante y la pastilla resultante se resuspendió en Agro wash + 5 µl de Lauril Sarcosil al 10%, se dejó en hielo por 5 min, se centrifugó nuevamente, se aspiró el sobrenadante, la pastilla resultante se resuspendió en 95 µl de solución 1 (Glucosa 20%, 1.25 ml Tris 1 M pH 8, 1.0 ml 0.5 M EDTA pH

8) se agitó en el vortex, en este punto se agregaron 5 μl de solución de lisozima 50 mg mL^{-1} y se dejó 5 min en hielo. Se agregaron 200 μl de Solución 2 (2.5 μl de SDS 10% (1% final), 12.5 ml NaOH 0.4 M (0.2 M final) Agua MQ), se mezcló suavemente por inversión y se dejó media hora a temperatura ambiente (TA). Se agregó 150 μl de solución 3 (11.8 g de Acetato de Potasio (CH_3COOK), 3 M, 4.6 g ácido acético glacial (CH_3COOH) 2M final). Se mezcló suavemente y se centrifugó por 10 min. En tubos nuevos se vierte el sobrenadante. Se agregó 450 μl fenol:cloroformo 1:1, se mezcló hasta formar una emulsión, se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min. Se transfiere la parte de arriba a nuevos tubos etiquetados. Se agregó etanol puro 95% (grado molecular) en un volumen 1:2 respecto a la muestra obtenida. Se centrifugó por 15 min, se retiró el sobrenadante y la pastilla se secó al aire. Se resuspendió en 100 μl de TRIS 10 μM . Se almacenó a -20°C . La calidad de la muestra obtenida se observó en un gel de agarosa al 1 %.

7.4.2 Transformación de *Ocimum basilicum* mediante la bacteria *A. tumefaciens*

Para realizar la transformación de la albahaca se sembró la cepa GV2260 de *A. tumefaciens* portadora del gen NFY en medio LB sólido + Rf 50 mg L^{-1} + Sp 100 mg L^{-1} y se dejó a 28°C durante 48 h en oscuridad a manera de estría cruzada. Pasado este tiempo se seleccionó una colonia independiente y se sembró en 5 ml de medio de cocultivo que consiste en LB líquido + Rf 50 mg L^{-1} + Sp 100 mg L^{-1} , se incubó a 28°C en agitación constante hasta obtener una OD de 0.6, esto sucedió en 24 h aproximadamente. Posteriormente estos 5 ml de medio se transfirieron a 50 ml del mismo medio en un matraz y se dejaron durante 48 h en agitación constante a 28°C . La muestra se pasó a tubos de 50 ml y se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 10 ml de medio de cocultivo MLC (MS + Tween 20 al 0.01% + acetociringona 250 μM).

Se tomaron las plántulas de albahaca de 23 días y se cortaron las hojas en cuadritos de 5 mm aproximadamente con bisturí estéril. Los explantes se colocaron en 50 ml de medio MLC que contenían la bacteria y se dejaron a 28°C en agitación durante 30 min, 60 min y 90 min. Al término de estos tiempos los explantes se lavaron en papel filtro estéril y posteriormente se pasaron a cajas Petri con papel filtro estéril humedecido con medio MS al 50 %. Se dejaron en

oscuridad por tres días. Los explantes se enjuagaron con agua estéril y se mantuvieron en medio MS líquido + 500 mg L⁻¹ de Ceftriaxona durante 12 h en agitación constante. Los explantes se pasaron a cajas Petri conteniendo medio MS + 5 mg L⁻¹ BAP + 30 mg L⁻¹ Glutamina + 250 mg L⁻¹ Ceftriaxona. Se incuban durante 5 días observando que no haya contaminación de bacteria.

7.4.3 Extracción de DNA mediante el método CTAB

Se tomaron 0.1 a 0.3 gr de tejido y se maceró en un mortero estéril, se agregó 1 ml de amortiguador de extracción (CTAB) precalentado a 60°C y se agregaron 30 µl de β mercaptoetanol, la muestra se pasó a un nuevo tubo de 1.5 mL. La muestra se incubó durante 60 min a 60°C agitando cada 10 min, pasado este tiempo se dejó a TA. Se agregó cloroformo y se mezcla suavemente hasta formar una emulsión. Se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo y se agregó 1 volumen de isopropanol frío. Se incubó a -20 °C durante 15 min. Se centrifugó a TA a 5000 rpm durante 6 min. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se lavó con etanol 70 % frío, la pastilla se resuspendió y se centrifugó nuevamente. La pastilla obtenida se resuspendió en 300 µl de agua MQ. Se incubaron a 37 °C durante 30 min. Se almacenó a -20 °C. La calidad del DNA se observó en un gel de agarosa al 0.8%.

7.4.4 PCR del ADN extraído de las plantas transformadas de Albahaca

Para conocer si las plantas fueron transformadas o no, se realizó un PCR utilizando el ADN extraído anteriormente de las hojas cotiledonarias de las plántulas expuestas a *Agrobacterium tumefaciens*. Para llevar a cabo el PCR se preparó una mezcla en la que se incluyeron: 8.85 µl de agua inyectable, 1.25 µl de Buffer, 0.25 µl de dNTP, 0.5 µl de oligo 1, 0.5 µl de oligo 2, 0.15 µl de Taq. Se agregaron 11.5 µl de este mix a cada tubo para pcr (0.5 µl) más 1 µl de ADN de la albahaca. Se llevó al termociclador con un programa. Para verificar los resultados de este PCR se preparó un gel de agarosa al 1.2% corrido en una cámara de electroforesis con buffer SB por un tiempo de 20 min a un voltaje de 100 V.

8 RESULTADOS Y DISCUSION

8.1 Obtención de las semillas de albahaca (*Ocimum basilicum*)

Para la obtención de semillas nuevas para los experimentos a realizarse se preparó una mezcla de Peat-Moss + Agrolita en una proporción de 4:1 en bolsas de polietileno, esta preparación se humedeció con agua potable y se llevó a la autoclave.

Con el suelo estéril se llenó una charola de germinación de 60 pozos y se sembraron de 4 a 5 semillas por pozo. Se humedeció con un atomizador y la charola se dejó a reposar durante 6 días en oscuridad en condiciones de temperatura ambiente. Las plántulas germinadas se sembraron en macetas con la misma mezcla de suelo anteriormente usada y se llevaron al invernadero. Se obtuvo un porcentaje de germinación del 50 % aproximadamente. Después de dos meses las plantas se pasaron a macetas de 20 L y dejadas bajo malla sombra. Las semillas de las plantas adultas se recolectaron a los dos meses de haber sido sembradas en estas macetas. Fig. 8.



Fig 8. Plantas de Albahaca *Ocimum basilicum* en invernadero.

8.2 Albahaca *in vitro*

El protocolo de desinfección de semillas resultó ser de mucha utilidad ya que las semillas presentaron un 75% de germinación sin problemas de contaminación (Fig. 9) Las semillas habían estado presentando contaminación por diferentes tipos de bacterias y hongos por lo que se decidió probar tres diferentes tratamientos. Los tiempos en cloro resultaron ser significativos para el resultado positivo de este ensayo. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) ha mostrado ser eficaz para la reducción de hongos en la desinfección de semillas de *Pseudotsuga menziesii* var *Glauca*, *Pinus ponderosa* y especies del género *Tillandsia* y arroz al haberse comprobado que tiene mayor grado de oxidación que el cloro, sus moléculas son degradables en agua y es bactericida, virucida y fungicida, sin embargo se debe tener cuidado con su uso en el cultivo *in vitro*, pues concentraciones del 10 al 20% produce quemaduras en explantes provocando su muerte (García et al., 2008)

En el presente trabajo el tratamiento 1, el porcentaje de semillas contaminadas fue el menor de los tres tratamientos y el porcentaje de semillas germinadas fue el más alto, sin embargo el tratamiento dos mostró el más bajo porcentaje de semillas sin germinar, por lo que probablemente el tiempo de las semillas en el cloro sea un tratamiento más agresivo en comparación con el H_2O_2 . Gracias a que el mayor porcentaje de semillas germinadas se dio en el tratamiento 1, se decidió seguir utilizando este método para desinfectar las semillas de la albahaca. Tabla 2.

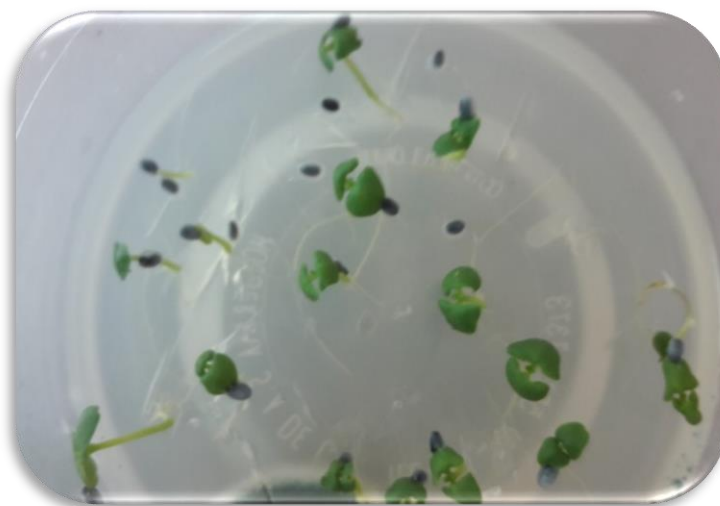


Fig 9. Semillas de albahaca germinadas en medio MS sin reguladores de crecimiento

Cuadro 2. Porcentajes obtenidos en la desinfección de semillas de albahaca

| | T1 | T2 | T3 |
|-------------------------------------|-------|-------|------|
| PORCENTAJE DE SEMILLAS CONTAMINADAS | 13.33 | 26.66 | 37.5 |
| PORCENTAJE DE SEMILLAS GERMINADAS | 72.5 | 66.66 | 50 |
| PORCENTAJE DE SEMILLAS SIN GERMINAR | 14.16 | 6.66 | 12.5 |

Como se puede observar se obtuvo un porcentaje aceptable de semillas germinadas sin contaminar con el tratamiento 1, al cual se le realizaron variantes del método utilizado por Rady, (2005) en el que las semillas se esterilizaron en EtOH al 70 % por 30 s y de ahí transferidas a una solución de Cloro al 25% conteniendo hipoclorito de sodio al 5.25 % durante 15 min para finalmente ser lavadas cuatro veces en agua destilada estéril.

Bicca et al. (2003), esterilizaron las semillas con solución de alcohol al 70 % por dos minutos y dejados tres veces en agua destilada estéril, seguido de 15 min en una solución de hipoclorito de sodio y finalmente lavados tres veces con agua destilada estéril. Estas semillas fueron sembradas en medio MS suplementado con 3% de sacarosa, 100 m L⁻¹ myo-inositol, 0.7 % agar a un pH de 5.8. Se pusieron 6 semillas por frasco en 35 frascos.

Rady and Nazif, (2005), utilizaron semillas de *O. americanum*, *L. varpilosum*, las cuales fueron donadas por el campo eperimental del Centro Nacional de Investigación, Giza, Egipto. Estas fueron esterilizadas en EtOH al 70 % por 30 s y transferidas a una solución de 25 % de cloro, conteniendo 5.25 % de hipoclorito de sodio por 15 min y finalmente se lavaron con agua destilada estéril.

Se estableció un sistema de regeneración de plantas a partir de explantes de hoja como paso previo a la transformación. Las plántulas generadas fueron individualizadas formando un sistema radicular vigoroso después de cuatro semanas en medio MS sin reguladores. Fig 10.



Fig 10. Plántulas de albahaca *in vitro* con un sistema radicular vigoroso

Se ha adquirido cierta experiencia en propagación *in vitro* de especies de *Ocimum*, algunas de estas especies son *Ocimum americanum* (Pattnaik and Chand, 1996), *Ocimum sanctum* (Singh y Seghal, 1999; Shahzad y Siddiqui, 2000). Sólo se tienen pocos reportes de regeneración de explantes *in vitro* de *O. basilicum* (Sahoo et al., 1997; Phippen and Simon, 2000; Saha et al., 2010). Los conocimientos previos sobre cultivo de tejidos de *Ocimum* son limitados, aunque se tienen reportes de que los explantes de hojas y explantes nodales o explantes axilares son buena fuente para lograr un buen número de plantas de explantes en particular (Pattnaik y Chand, 1996).

8.3 Ensayo con diferentes concentraciones de hormonas

Para conocer la concentración de hormona BA más adecuada para la obtención de plantas de albahaca se utilizaron tres diferentes concentraciones (Fig. 11) en las que se pudo observar la diferencia en el crecimiento de las plantas y determinar cuál sería la concentración más óptima en los siguientes experimentos a realizar. Como se puede observar en la fig 4, la concentración más adecuada fue la concentración de BA a 5 mg L^{-1} seguido de la concentración de 15 mg L^{-1} y por último la de 10 mg L^{-1} . Al mismo tiempo también se pudo observar un crecimiento moderado de las plantas con una respuesta del 100% (Tabla 3).

Es importante conocer las concentraciones adecuadas de las diferentes fitohormonas ya que se conoce que la hormona BA en concentraciones elevadas llega a inducir muerte celular programada por la aceleración de la senescencia lo cual confirma que la fenolización y vitrificación de los explantes está correlacionada directamente con el aumento de las Citocininas (Mahmoud, 2013)

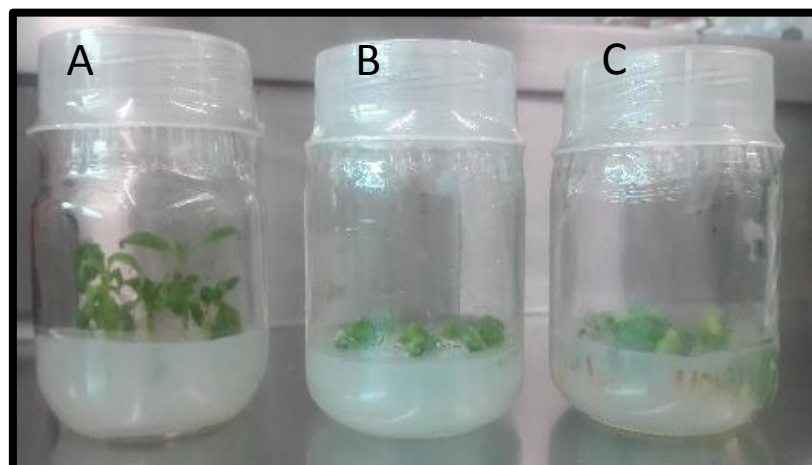


Fig 11. Ensayo con diferentes concentraciones de BA. A) 5 mg L⁻¹, B) 10 mg L⁻¹, C) 15 mg L⁻¹

Cuadro 3. Formación de brotes a las diferentes concentraciones de BA en medio MS a las plantas de albahaca in vitro.

| BA mg L ⁻¹ | No. DE BROTES | RESPUESTA | OBSERVACIONES |
|-----------------------|---------------|-----------|----------------------|
| 0 | 0 | 0 | No hay crecimiento |
| 5 | 9±1.2 | 100% | Crecimiento moderado |
| 10 | 5±0.7 | 100% | Crecimiento moderado |
| 15 | 6±1.0 | 80% | Crecimiento moderado |

Los resultados mostrados se asemejan a los reportados por Shahzad, (2012) en el que reporta que esta misma concentración de BA en los tejidos regenerados obtuvieron un número de explantes de 12.5 ± 2.17 . Estos resultados también son comparativos con los obtenidos por Bicca, (2003) en los que reporta un porcentaje de formación de callos cercano al 100% con esta misma concentración de BA de $5 \text{ mg}^{-1}\text{L}$.

Como lo menciona Sahoo et al. (1997), estas técnicas de regeneración *in vitro* para obtener uniformidad en la progenie son técnicas de propagación a gran escala que se han vuelto de gran interés y su uso se ha incrementado significativamente para la regeneración de plantas aromáticas y medicinales.

8.4 Ensayo de resistencia de la albahaca al herbicida basta

Para conocer el verdadero efecto del glufosinato de amonio sobre las plantas de *Ocimum basilicum* se realizó un ensayo utilizando plántulas de albahaca de 30 días de edad exponiéndolas a diferentes concentraciones de glufosinato de amonio (BASTA) el cual en su versión comercial se encuentra a una concentración del 28% y se observó que las plántulas expuestas a este herbicida mostraron un resultado esperado, ya que las plántulas expuestas a la concentración más alta del BASTA que fue de 0.56 % empezaron a presentar marchitez a los 10 días mientras que las expuestas a la concentración más baja (0.14 %) comenzaron a presentar marchitez hasta los 25 días (Tabla 4). Sin embargo, después de 30 días las plántulas expuestas al glufosinato de amonio en todas las concentraciones se observaron completamente marchitas a excepción de la plántula testigo (Fig 12). No se encontraron reportes de albahaca expuesta a diferentes concentraciones del glufosinato de amonio por lo que se tomaron en cuenta las concentraciones utilizadas por Gómez et al. (2010) para plantas de banano crecidas *in vitro* y se probaron concentraciones muy parecidas. Los resultados de ambos experimentos resultaron muy parecidos, aunque el experimento realizado con albahaca se realizó con más días de observación.

Es importante conocer la importancia del efecto del glufosinato de amonio en las plantas ya que se utiliza comúnmente como un desecante pre-cosecha y sus residuos también se pueden encontrar en alimentos ingeridos por los seres humanos. Entre estos alimentos se encuentran por ejemplo, las papas, arveja, habas, maíz, trigo y cebada. Otro dato que se debe conocer es que este producto químico se puede transmitir a los seres humanos a través de animales que se alimentan de pasto contaminado. Un dato importante es que se ha descubierto que la harina procesada de grano de trigo que contenía trazas de glufosinato retenía del 10 al 100% de los residuos de los productos químicos.

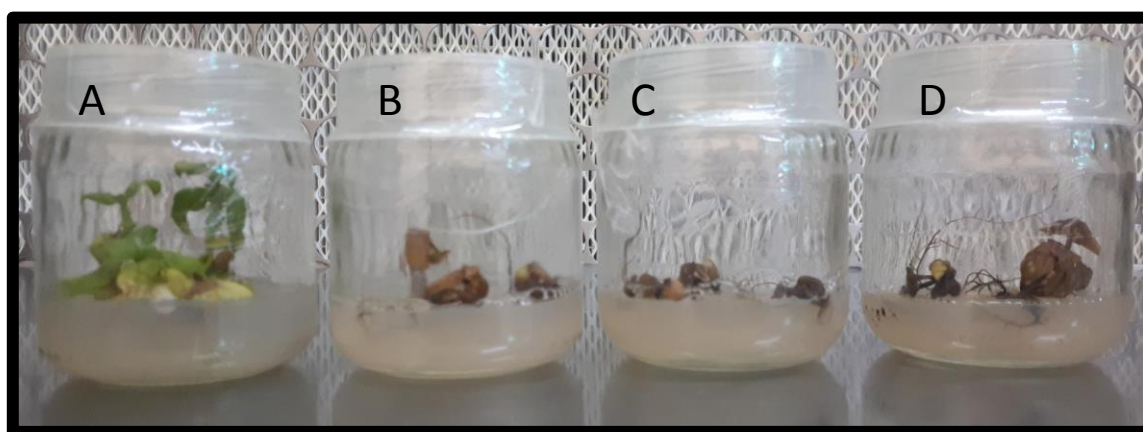


Fig 12. Ensayo del efecto de las diferentes concentraciones de glufosinato de amonio en la sobrevivencia en plántulas de albahaca. **A)** Testigo, **B)** 0.14%, **C)** 0.28% **D)** 0.56%

Cuadro 4. Efecto del glufosinato de amonio (BASTA) a diferentes concentraciones sobre plántulas de albahaca.

| | 0 | 0.14% | 0.28% | 0.56% |
|---------|------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 5 DIAS | SANA | SANA | SANA | SANA |
| 10 DIAS | SANA | SANA | ANA | MARCHITEZ EN LA ORILLA DE LAS HOJAS |
| 15 DIAS | SANA | SANA | MARCHITEZ EN LA ORILLA DE LAS HOJAS | SOLO EL TALLO SE OBSERVÓ VERDE |
| 20 DIAS | SANA | SANA | SOLO EL TALLO SE OBSERVÓ VERDE | TOTALMENTE MARCHITA |
| 25 DIAS | SANA | MARCHITEZ EN LA ORILLA DE LAS HOJAS | TOTALMENTE MARCHITA | TOTALMENTE MARCHITA |
| 30 DIAS | SANA | SOLO SE OBSERVÓ VERDE EN EL TALLO | TOTALMENTE MARCHITA | TOTALMENTE MARCHITA |

8.5 Obtención del plásmido

Se crecieron las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* para la extracción del plásmido utilizando la cepa GV2260 que contenía el plásmido pB7WG2D (Fig. 13)

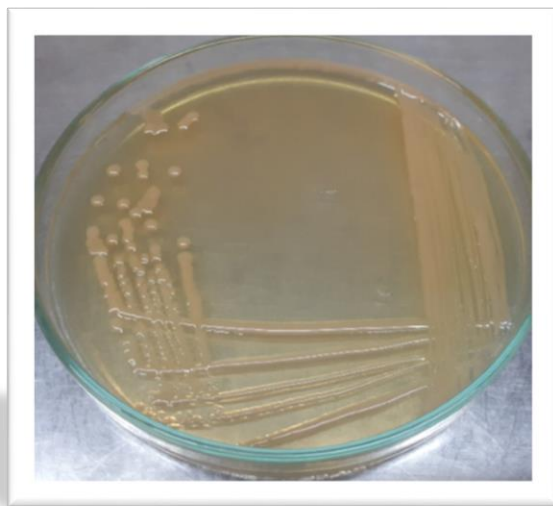


Fig. 13. Cepas de *A. tumefaciens* GV2260 de que contiene el gen factor nuclear NFY

De las cepas originales se realizó una siembra en estría cruzada en medio LB sólido + Rf + Espectinomicina de la cepa conteniendo el gen NFY, de la cual se obtuvo una colonia independiente para su crecimiento en medio LB sólido. Fig 13. La técnica de la siembra en estría es usada para aislar cepas puras en una placa Petri a partir de un inóculo o muestra de diferentes especies. La técnica consiste en, mediante un asa de siembra previamente esterilizada, rayar la superficie de cultivo de una caja Petri de forma que en cada pasada sea menor el número de células depositado, las +ultimas pasadas deberán depositar un número tan bajo de células que una vez incubadas, se formen colonias puras

El medio LB fue el medio elegido para crecer la bacteria. El plásmido pB7WG2D al tener un gen resistente a la Rifampicina, este antibiótico fue agregado al medio para asegurar que la cepa que se está utilizando sea la correcta. El caldo luria (Luria Bertani LB) o caldo LB contiene peptona de caseína y extracto de levadura que proporcionan al medio los nutrientes

necesarios para el desarrollo óptimo de la mayoría de los microorganismos. El cloruro de sodio ayuda a mantener el equilibrio osmótico. Se realizó el método de lisis alcalina para la obtención del DNA plasmídico Para su observación se preparó un gel de Agarosa al 1.2%. (Fig. 14)

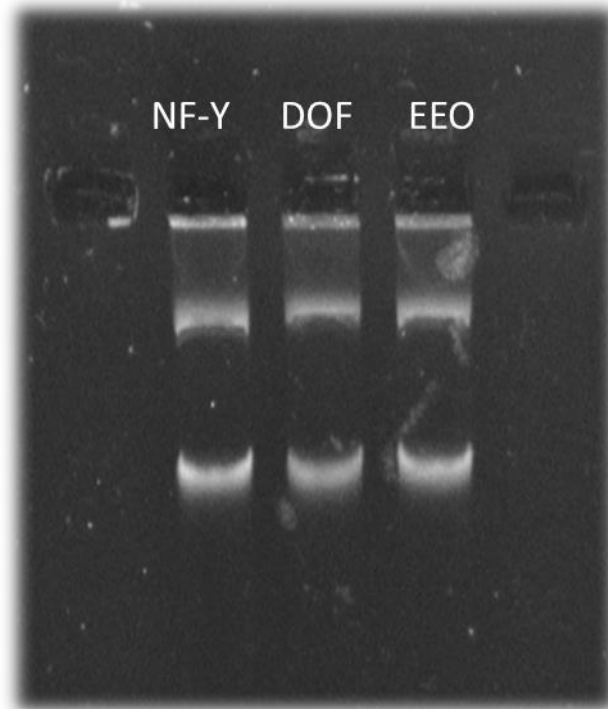


Fig. 14. Gel de Agarosa 1.2% para la observación del DNA plasmídico de las diferentes cepas de *Agrobacterium tumefaciens*.

Los plásmidos son usados como herramientas en la biotecnología y la biología molecular se requiere de un método exitoso para su extracción. Los plásmidos son de un tamaño pequeño comparado con los cromosomas y esto facilita su extracción y manipulación. Otras de sus propiedades son la replicación y la conjugación. Existen diferentes técnicas para aislar este ADN y una de las más usadas es la lisis alcalina. Este método aprovecha las diferencias en el tamaño y la superhelicidad que es el grado de torsión que sufre el ADN plasmídico en contraste con el cromosomal. Una de las situaciones que se busca durante el proceso de extracción es

desnaturalizar el ADN plasmídico y el cromosomal y posteriormente renaturalizarlo, esto con la finalidad de que el ADN cromosomal no se aparee tan rápido y pueda ser atrapado por complejos protéicos, los cuales precipitarán a diferencia del ADN plasmídico que rápidamente se renaturaliza y adquirirá su forma natural (Birnbom et al., 1986).

Posteriormente se realizó una PCR para la verificación de la obtención del DNA conteniendo los diferentes factores de transcripción utilizando los oligos correspondientes para cada uno de los factores (Fig 15). El programa que se utilizó en el termociclador fue el siguiente:

| Tiempo | Temperatura | |
|---------------|--------------------|-----------|
| 3 min | 94°C | 30 ciclos |
| 1 min | 94°C | |
| 1 min | 58°C | |
| 1.5 min | 72°C | |
| 7 min | 72°C | |
| ∞ | 4°C | |

El DNA plasmídico obtenido se utilizó como testigo positivo en los subsecuentes experimentos. Utilizando el método de lisis alcalina se pueden obtener entre 100-500 mg de ADN partiendo de 1.5 ml de cultivo de bacterias en fase exponencial con un moderado número de copias (10 a 20 por bacteria).

Por otro lado, la pureza y la cantidad del ADN dependerán de factores como, mayor tamaño del plásmido, menor cantidad y pureza del ADN, Mayor número de copias del plásmido, mayor cantidad de ADN y también de cepas que producen grandes cantidades de carbohidratos que disminuyen la pureza del ADN e interfieren con la actividad de las enzimas de restricción.

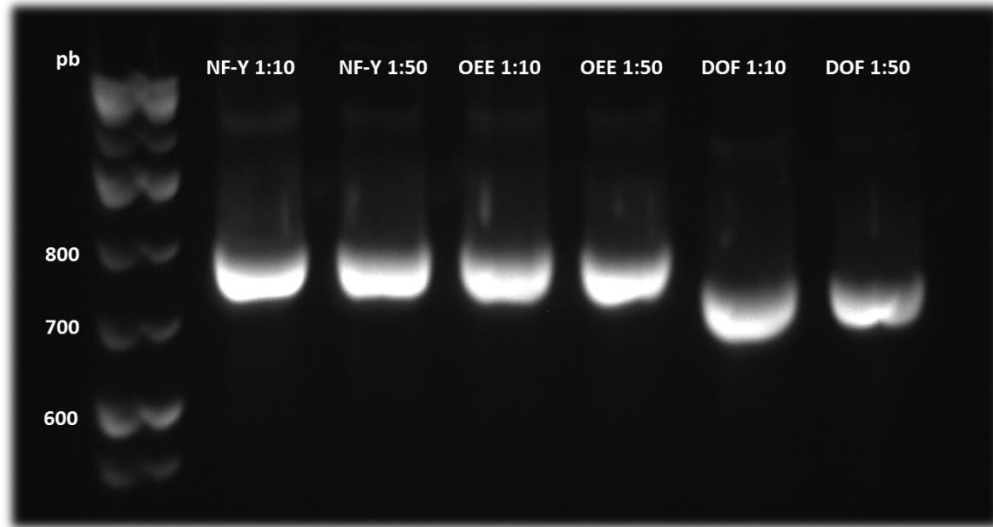


Fig. 15 Producto de PCR en el que el ADN plasmídico se replicó usando diferentes diluciones del plásmido (1:10 y 1:50) utilizando los Oligos R y F correspondiente a cada factor de transcripción

El medio LB fue el medio elegido para crecer la bacteria. El plásmido pB7WG2D al tener un gen resistente a la Rifampicina este antibiótico fue agregado al medio para asegurar que la cepa que se está utilizando sea la correcta

Chong et al. (2002), utilizaron las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* AT-2260 y EHA-105. Los cultivos bacterianos fueron previamente crecidos en medio de cultivo LB (10 g/L de triptona, 5 g L⁻¹ de extracto de levadura y 10 mg L⁻¹ de NaCl) durante 24 h. Posteriormente se pasaron a medio de inducción (sales AB 1X, 2mM NaH₂PO₄, 30 mM MES, glucosa 1%, 200 mM acetosiringona). Se estudiaron dos densidades ópticas (OD₅₀₀ y OD₆₀₀) para cada cepa. En este experimento las condiciones óptimas de cocultivo impidieron el crecimiento excesivo de la bacteria en los tiempos evaluados por lo que no se afectaron las células vegetales. Al estar en contacto la bacteria un mayor tiempo con el tejido vegetal tuvo una mayor transferencia de ADN a las células y por consiguiente una mayor expresión

En el presente trabajo se utilizaron tres tiempos distintos en los que los explantes de albahaca se agregaron a la solución que contenía la Bacteria *A. tumefaciens* que constaron de 30 min,

60 min y 90 min de los cuales al no tener resultados positivos con la transformación no hubo diferencia significativa.

8.6 Transformación genética de albahaca

La tecnología de la transformación genética se desarrolló en los últimos años del siglo pasado cuando se obtuvo de manera comercial una planta transgénica, que fue la del tabaco resistente al virus del mosaico, Y así se han ido liberando diferentes cultivos que resisten mayor vida de anaquel, son resistentes a herbicidas y algunos son resistentes al ataque de insectos. La albahaca, es una planta que es sensible a diferentes factores bióticos y abióticos, entre los que se encuentran principalmente hongos y factores abióticos como las altas y bajas temperaturas y los herbicidas.

En el presente trabajo se realizó la transformación de albahaca (*Ocimum basilicum*) mediada por *Agrobacterium tumefaciens* cuya cepa GV2260 conteniendo el plásmido pB7Wg2D (Karim et al., 2002) le otorgará resistencia al Glufosinato de amonio conocido como BASTA que es ampliamente usado en las prácticas agrícolas.

Se colocaron aproximadamente 150 explantes en medio MS fortificado con 5 mg/L BAP más Glutamina 30 mg/L y Ceftriaxona 250 mg/L (Fig. 16). Después de 10 días se seleccionaron los explantes cuyo tejido no estaba necrótico y se pasaron a medio de regeneración, ahora sin antibiótico y después de 25 días se pudieron ver brotes en algunos de los explantes (Fig. 17, A y B))

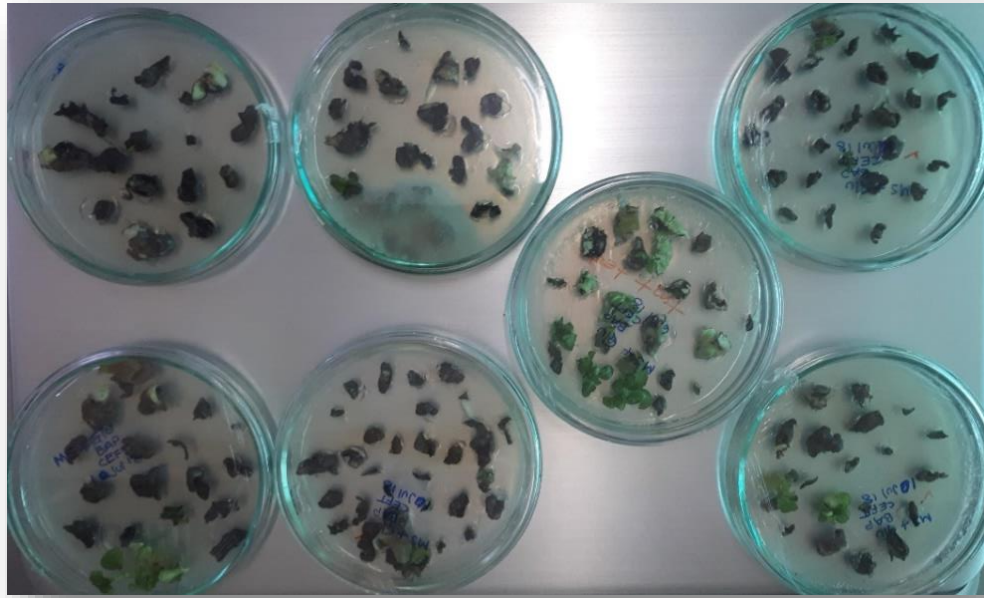


Fig. 16. Explantes de hojas cotiledonareas de albahaca en medio de regeneración MS después de 10 días

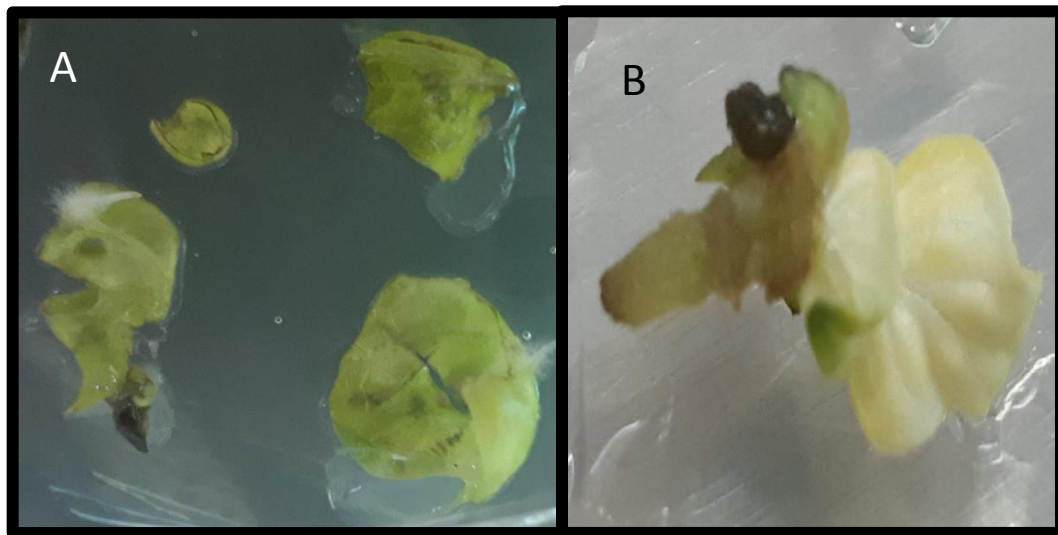


Fig. 17. Explantes de hoja de albahaca en medio de regeneración sin antibiótico. A) se observan pelos radiculares a los 10 días de ser sembrados. B) se observa crecimiento de brotes a los 25 días.

Después de 35 días los explantes se llevaron a medio MS en frascos de vidrio sin ningún tipo de hormona o antibiótico y se dejaron en el cuarto in vitro a 28°C. Las plántulas se dejaron hasta completar 40 días aproximadamente (Fig. 18) y se tomaron las hojas para realizar una extracción de ADN por el método CTAB (Fig. 19) y con la extracción de este ADN se realizó una PCR

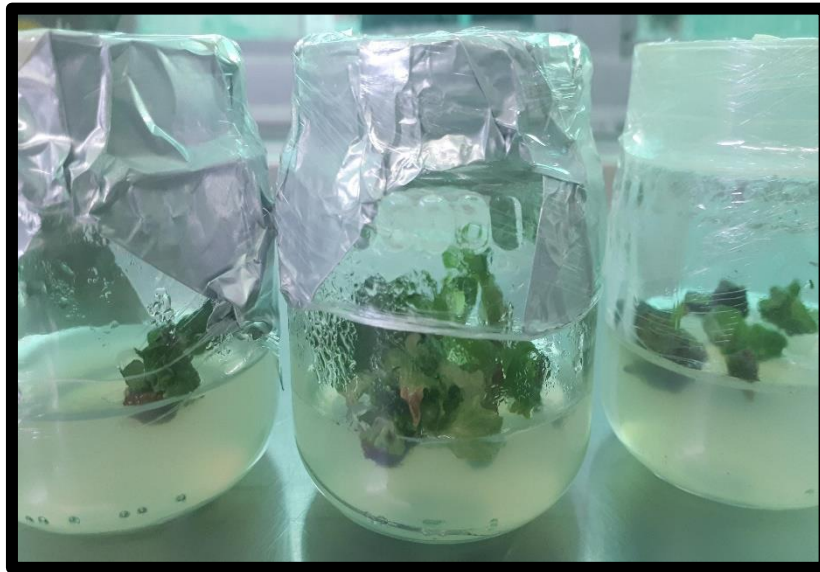


Fig. 18. Plantas completas de albahaca potencialmente transformadas

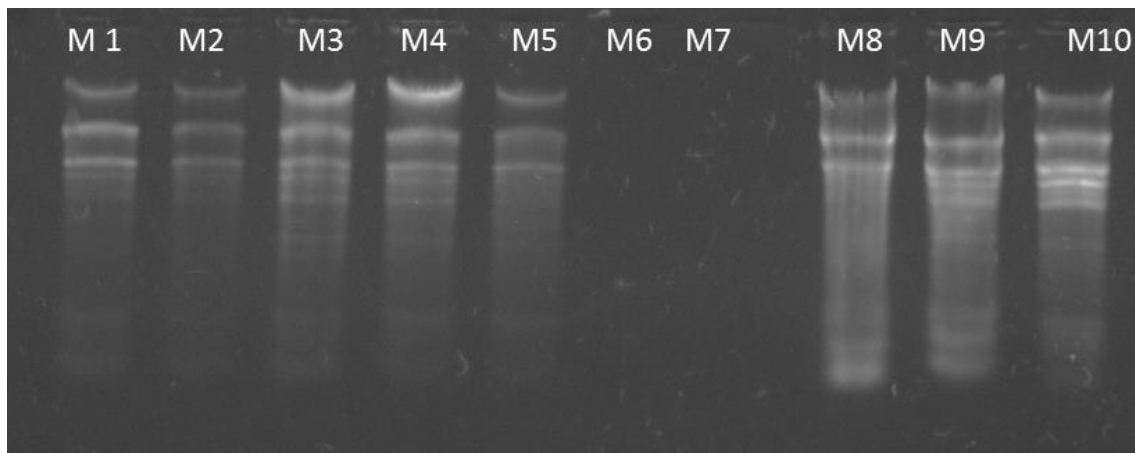


Fig. 19. Extracción de ADN de plantas potencialmente transformadas de albahaca

Se realizaron diferentes repeticiones del protocolo para la infección de los explantes de la albahaca, después de 30 días se observó crecimiento de pelos radiculares en algunos explantes y posteriormente se observó el crecimiento de las plantas, teniendo un porcentaje de 7.5% de plantas de albahaca completas. Se seleccionaron 5 plantas y se realizó una PCR logrando obtener una comprobación positiva de la transformación a la que fueron expuestos estos explantes en un gel de agarosa 1% presentando bandas con los tamaños esperados (893 pb) para plantas de albahaca transformadas con *A tumefaciens* que contenía el factor de transcripción NFY (Fig. 20). Se tienen pocos reportes de transformación de albahaca (*Ocimum basilicum*) por lo que los resultados presentados en este trabajo de tesis son una contribución importante para futuros trabajos. Sin embargo el porcentaje de transformación fue muy bajo por lo que se recomienda la repetición de estos protocolos.

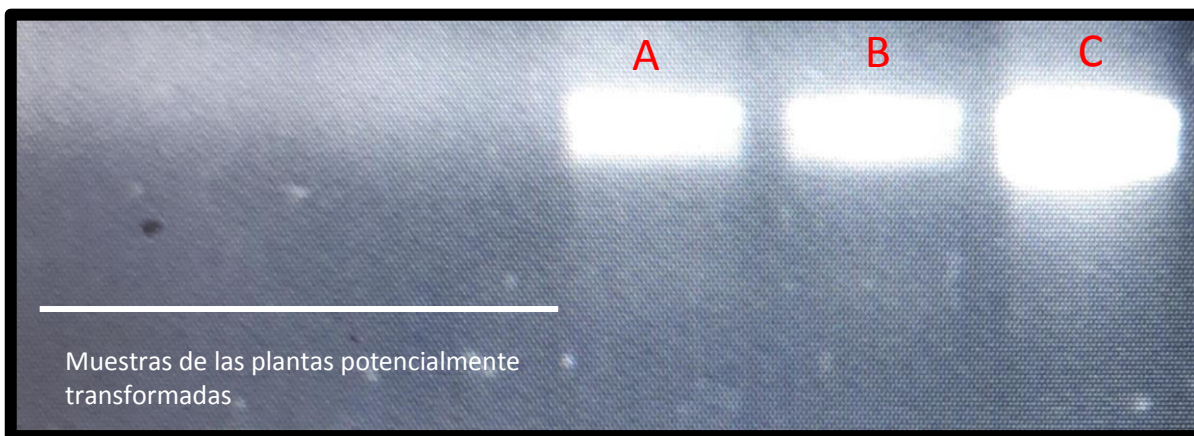


Fig. 20. Producto de PCR con las plántulas potencialmente transformadas. Producto amplificado de 893 pb correspondiente al gen del factor de transcripción NFY.

9 CONCLUSIONES

- Las plantas de albahaca (*Ocimum basilicum*) regeneradas *in vitro* pueden presentar problemas de contaminación aún en condiciones asépticas, sin embargo se logró reducir esta contaminación con el tratamiento con peróxido de hidrogeno que resultó ser un buen desinfectante para las semillas de albahaca logrando con este tratamiento el 75% de semillas germinadas sin contaminación
- La mejor concentración de BA para la inducción de brotes mediante organogénesis directa fue de 5 mg L⁻¹ con un promedio de 9 brotes por explante de hoja.
- El glufosinato de amonio o BASTA resultó altamente tóxico para las plantas de albahaca y eso se pudo observar con el ensayo de diferentes concentraciones del herbicida y concluir que cualquiera de las concentraciones resultó con la muerte de las plantas a los 10 días.
- La transformación de la albahaca (*Ocimum basilicum*) mediada con la bacteria *A tumefaciens* es un proceso con resultados positivos obteniendo un porcentaje del 4.5%, plantas transformadas

10. LITERATURA CONSULTADA

- Atkinson, N.J., Urwin, P.E. 2012. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *J Exp Bot.* 63: 3523-3543.
- Atsumi, T., Fujisawa, S., and Tonosaki, K., 2005. A comparative study of the antioxidant/prooxidant activities of eugenol and isoeugenol with various concentrations and oxidations conditions. *Toxicology in vitro*, 19(8), 1025-1033.
- Bhuvaneshwari, K., Ananda G., Malayandi J., Vaithyanathan G., Luigi M., Sungyoung L., Deok C.Y., Shanmugam G.. 2016. Can *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum tenuiflorum* L. culture be a potential source of secondary metabolites?. *Food Chemistry*. 194: 55-66.
- Bicca, D. L., Vera L. B., Eugenia J. B.I B., Fabiana K. S. and Márcia Wulff Schuch. 2003 *In vitro* propagation of *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae). *Acta Scientiarum. Biological Science*. 25: 435-437.
- Birnbom, H.C., 1986. A rapid alkaline extraction metho for the isolation of plasmid DNA. *Meth. Enzymol.* 100: 243-255
- Birnbom, H.C. and Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nuc. Acids. Res.* 7:1513-1523
- Braun, A. C. 1947. Thermal studies on tumor inception in the Crown gall disease. *Amer. Four. Bot.* 34:234-240.
- Bray, E.A., Bailey-Serres J., Weretilnyk E. (2000) Responses to abiotic stresses. In W Gruissem, B Buchanan, R Jones, eds, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, pp 1158–1249
- Chong, B., et al., 2002. Transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de suspensiones celulares embriogénicas del cultivar híbrido de plátano FHIA (AAAB). *Biotecnología Vegetal*. 2.
- Contreras, A., Gómez, C. 2008. Evaluación de tres variedades de albahaca y dos dosis de fertilización en producción hidropónica y en suelo. *Carrera de Ciencia y producción Agropecuaria*. Zamorano, Honduras. 13
- Darrah, H.H. 1980. *The cultivated Basils*. Buckeye Printing Co., MO. 82 p.

- De Cleene y De Ley. 1976. The Host range of Crown gall. J. Bot. Rev.42:389
- Declerck, S., Strullo D.G., Plenchette, C. 1996. In vitro mass-production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*, associated with Ri T-DNA transformed carrot roots. Mycol Res. 100:1237-1242
- Enciso, A.J. 2004. Producción y comercialización de Plantas aromáticas y especies desecadas. <http://www.almeriscan.com/ápices/default.htm>. 20oct.ISO9001.
- Garfinkel, D.J. et al. 1981. Genetic analysis of Crown gall: fine structure map of the T-DNA by site-directed mutagenesis. En: Cell. Vol. 27 (1981); p. 143-153.
- Gómez, K., Reyes V. M R., Barmúdez C. I., Chong P. B., Alvarado C. Y., 2010. Nuevo método para la selección rápida de plantas de banano (*Musa* spp. AAA cv. Grande naine) transformadas con gen *bar* procedente s de campo, empleando glufosinato de amonio. Revista Colombiana de Biotecnología. . 2.248-258
- Ilhan, K., Nazife Y., Mehlika B. 2008. Antimicrobial Activity of Various Extracts of *Ocimum Basilicum* L. and Observation of the Inhibition Effect on Bacterial Cells by Use of Scanning Electron Microscopy. Afr J Tradit Complement Altern Med. 5(4): 363-369
- Khair-ul-Bariyah, A.D. Ikram, M. 2012. *Ocimum basilicum*: A Review on Phytochemical and Pharmacological Studies. Pak. J. Chem. 2(2):78-85
- Kintzios S., Makri O., Panagiotopoulos E., Scapet M. 2003. *In vitro* rosmarinic acid accumulation in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) Biotechnology Letters. 25:405-408.
- Kumar, S., Beri, S., Adholeya A. 2013. Congruence of ribosomal DNA sequencing, fatty acid methyl ester profiles and morphology for Mycorrhizal characterization of the genus *Rhizophagus* (arbuscular mycorrhiza fungus). Ann Microbiol 63(4):1405–1415.
- Levitt, J. 1980. Responses of Plant to Environmental Stress: Water, Radiation, Salt and Other Stresses. Academic Press, New York, 365.
- Mroginski, E., Rey, H.Y., Gonzalez, A.M. Mroginski, L.A. 2004. Thidiazuron promotes in vitro plant regeneration of *Arachis correntina* (Leguminosae) via organogenesis. Journal Plant Growth Regulation 23: 129-134.

- Neyoy Siari C., 2012. Genes marcadores. Apuntes de Fisiología vegetal. <http://fisiolvegetal.blogspot.com/2012/12/genes-marcadores.html#!/2012/12/genes-marcadores.html>
- Phippen, W.B., Simon, J.E. 2000. Shoot regeneration of young leaf explants from basil (*Ocimum basilicum* L.) In vitro Cell. Dev. Biol. Plant 36:250
- Rady, M.R., Nazif, N. M. 2005. Rosmarinic acid content and RAPD analysis of in vitro regenerated basil (*Ocimum americanum*) plants. Fitoterapia. 76:525-533
- Rodríguez, H.L.F., Giraldo P.G.A. y Murillo P.E. 2011. Determinación del quimiotipo de la fracción volátil del aceite esencial de hojas de albahaca de variedad *ocimum* por cromatografía de gases acoplada a masas (GC-MS). Rev. Tumbaga 1:53-62
- Rodríguez, S. A., Acevedo H. G., Castellanos H.O. 2017 Fundamentos de Biotecnología Vegetal. Universidad de Guadalajara. 1ª ed. pp 99-101
- Roy, C., A., Gupta, B., Sengupta, D.N., 2008. Trans-acting factor designated OSBZ8 interacts with both typical abscisic acid responsive elements as well as abscisic acid responsive element-like sequences in the vegetative tissues of indica rice cultivars. Plant Cell Rep. 27: 779–794.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2012. Consejo Nacional de Producción Orgánica. México, D.F.
- Sahoo, Y. et al. 1997. *In vitro* clonal propagation of an aromatic medicinal herb *Ocimum basilicum* L. (sweet basil) by axillary shoots proliferation. *In Vitro Cell. Devel. Biol. Plant*, Largo, 33:293-296,
- Sánchez, V. y J.M. Lucero F. 2012. Nichos de mercado de especies aromáticas tipo gourmet. CIB. La Paz, Baja California Sur, México.
- Solanki, M., Suresh, S., Das, S. N., Shukla, K., 2013. Treatment of real textile wastewater using coagulation technology. *Int. J. Chem. Technol. Res.* 5, 610-615.

- Sorour Shamsnejati, Naz Chaibakhsh, Ali Reza Pendashteh, Sam Hayeripour. 2015. Musilaginous seed of *Ocimum basilicum* as natural coagulant for textile wastewater treatment. *Industrial Crops and Products*. 69: 40-47.
- Srivastava S., Conlan X. A., Cahill D.M, Adholeya, A. 2016. Rhizophagus irregularis as an elicitor of rosmarinic acid and antioxidant production by transformed roots of *Ocimum basilicum* in an *in vitro* co-culture system. *Mycorrhiza*. 26(8) 919-930.
- Srivastava, S, Adholeya A, Conlan XA, Cahill DM. 2016. Acidic potassium permanganate chemiluminescence for the determination of antioxidant potential in three cultivars of *Ocimum basilicum*. *Plant Food Hum Nutr* 71(1):72–80.
- Susuki, N., et al. 2005. Enhanced Tolerance to Environmental Stress in Transgenic Plants Expressing the Transcriptional Coactivator Multiprotein Bridging Factor 1c1[w]. *Plant Physiology*. Vol. 139. Pp 1313-1322.
- Tiwari P., Adholeya A., 2002. In vitro co-culture of two AMF isolates *Gigaspora margarita* and *Glomus intraradices* on Ri T-DNA transformed roots. *FEMS Microbiol Lett*. 206(1):39-43.
- Toussaint, J.P., St-Arnaud M, Charest C. 2004. Nitrogen transfer and assimilation between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* Schenck & Smith and Ri T-DNA roots of *Daucus carota* L. in an *in vitro* compartmented system. *Can J Microbiol* 50(4):251–260.
- Viera, R.F., and Simon, J.E. 2000. Chemical characterization of basil (*Ocimum* spp) found in the markets and used in the traditional medicine in Brazil. *Econ Bot*. 54(2):207-216.
- Zambryski, P. et al. 1983. Ti-plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO Journal*. 2: 2143-2150.



Otorgan la presente

CONSTANCIA

Al trabajo de investigación en la modalidad de **CARTEL**:

Regeneración *in vitro* y transformación genética
de albahaca (*Ocimum basilicum*)

Realizado por:

Juan Florencio Gómez Leyva

Hilda Eréndira Dimas Estrada | Irma Guadalupe López Muraira

Paola A. Palmeros Suárez | John P. Délano Frier

Para el V SIMPOSIO NACIONAL DE HERRAMIENTAS DE BIOTECNOLOGÍA PARA UNA AGRICULTURA SUSTENTABLE.

Realizado los días 3, 4 y 5 de Octubre del presente
en la ciudad de Guadalajara, Jalisco.

Dr. Gabriel Rincón Enríquez
CIATEJ

Dr. Gustavo Javier Acevedo Hernández
CUCI

Dra. Carla Vanessa Sánchez Hernández
CUCBA

Dr. Saúl Fraire Velázquez
COORDINADOR DE LA RED

Año 2018