



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE  
ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO  
POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**

Tesis:

**CONTROL DE PLAGAS DE LEPIDÓPTEROS EN ALGODÓN  
MEDIANTE LA EXPRESIÓN DEL GEN HÍBRIDO QUE CODIFICA  
PARA UNA DELTA-ENDOTOXINA DE *Bacillus thuringiensis***

Que presenta:

**IBT LAURA SOFÍA CASTILLO ORTEGA**

Para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA**

DIRECTOR DE TESIS:

**DRA. BEATRIZ XOCONOSTLE CÁZARES**

MÈXICO D.F., SEPTIEMBRE 2015



Este proyecto se realizó con financiamiento de CONACyT a quien agradezco la  
beca de maestría No. 367405

Y el proyecto además fue financiado por la Dra Xoconostle 192242 y SENASICA-  
SAGARPA

## DEDICATORIAS.

*A mi mamá*

*A mi papá*

*A mi hermano*

*A Don Felipe ya no en la tierra, pero siempre siempre en mi corazón, te quiero  
mucho mucho abuelito.*

## **AGRADECIMIENTOS.**

A mis padres y mi hermano, por su amor en todo momento pero sobretodo por esa interminable paciencia para conmigo, ya terminamos la maestria pero no se apuren ya nada mas nos falta el doctorado.

A la Dra. Xoconostle y al Dr. Medrano agradezco mucho la oportunidad que me dieron de participar en su grupo de trabajo, oportunidad que me permitió desarrollar este proyecto, gracias por todo.

Al Dr. Hinojosa por formar parte de mi comité tutorial y las asesorías en el desarrollo de este proyecto.

Agradezco a cada una de las personas que conocí en este tiempo y lugar, todos se hicieron especiales para mi, cada uno estuvo conmigo en el momento y lugar adecuado, razón por la cual agradezco a la vida y a Dios por permitirme conocerlos, convivir con ustedes; agradezco infinitamente las atenciones que tuvieron hacia mi, de todos aprendi, me llevo buenos recuerdos, gracias por hacer mi estancia aquí muchísimo mas placentera, gracias compañeros de maestria Sary, Jesús, Fer, Anlui, Fanny, Azu, Anamarel, Lety, Enrique, Mónica, gracias a mis compañeros del lab 24 y 12 Pool, Andres, Citla, Aleja, Apolo, Migue, Angy , Vale, Doña Betty, Don José, Humberto, Josue, George, Robert, Lulú, Estela, Dieguin, Brendis, Brendra Irineo, Israel, Martin, Bruno.

Anazaret, Ingrid, Saira, Yare y Gary por ser siempre ese oído a mi disposición por su paciencia y consejos, por su cariño y amistad gracias.

## CONTENIDO

INDICE DE FIGURAS.....	3
INDICE DE TABLAS.....	4
RESUMEN.....	5
ABSTRACT .....	6
INTRODUCCIÓN.....	7
ANTECEDENTES.....	10
EL ALGODÓN.....	10
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS .....	10
PRODUCCIÓN .....	11
APLICACIONES .....	13
CULTIVO DE ALGODÓN EN MÉXICO .....	13
PLAGAS DE INSECTOS EN ALGODÓN .....	17
DELTA-ENDOTOXINAS DE <i>Bacillus thuringiensis</i> , PROTEINAS Cry.....	18
RESISTENCIA DE INSECTOS A LAS TOXINAS Bt.....	23
EXPRESIÓN DE GENES HÍBRIDOS DE DELTA-ENDOTOXINAS.....	24
GEN HÍBRIDO DE LA DELTA-ENDOTOXINA DE <i>B. thuringiensis</i> .....	25
JUSTIFICACIÓN.....	27
OBJETIVO GENERAL.....	28
OBJETIVOS PARTICULARES.....	28
METODOLOGÍA.....	29
UNIDAD DE EXPRESIÓN DEL GEN HÍBRIDO DE LA DELTA-ENDOTOXINA.....	30
INSERCIÓN DEL GEN DE INTERÉS EN EL VECTOR DE ENTRADA.....	30
EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO.....	32
VERIFICACIÓN DE INSERTO Y ORIENTACIÓN DEL GEN EN PCR8/TOPO/GW POR RESTRICCIÓN ENZIMÁTICA.....	33
SUBCLONACION EN EL VECTOR DE SOBREEXPRESIÓN pB2WG7 .....	35
INSERCIÓN DE pB2WG7+GEN-HÍBRIDO EN <i>A tumefaciens</i> .....	37
EXPRESIÓN TRANSITORIA DE GEN-HÍBRIDO DE DELTA-ENDOTOXINA.....	38
CRECIMIENTO PLANTAS DE <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	38

AGROINFILTRACIÓN DE <i>A. tumefaciens</i> EN HOJAS DE <i>N. benthamiana</i> .....	38
EXTRACCIÓN DE RNA DE TEJIDO DE <i>N. benthamiana</i> agroinfiltrado. ....	39
SINTESIS DE cDNA. ....	39
TRANSFORMACIÓN DE ALGODÓN CON <i>A. tumefaciens</i> CEPA AGL1 .....	42
OBTENCIÓN DE EXPLANTES DE MERISTEMO DE EMBRIONES DE ALGODÓN	43
AGROINFECCIÓN Y CO-CULTIVO DE EXPLANTES DE MERISTEMO.....	44
SELECCIÓN Y REGENERACIÓN DE PLANTAS TRANSFORMADAS .....	45
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PLANTAS TRANSFORMADAS .....	46
EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO DE TEJIDO DE PLANTAS DE ALGODÓN ....	46
PCR PUNTO FINAL PARA LA IDENTIFICACION DEL GEN HÍBRIDO DE LA DELTA- ENDOTOXINA.....	47
DETERMINACION DEL NÚMERO VARIABLE DE COPIAS DEL GEN HÍBRIDO EN EL GENOMA DE LAS PLANTAS DE ALGODÓN. ....	48
RESULTADOS Y DISCUSIÓN. ....	50
UNIDAD DE EXPRESIÓN DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA DELTA-ENDOTOXINA CON MARCADOR DE SELECCIÓN RESISTENCIA A HERBICIDA. ....	50
TRANSFORMACIÓN DE ALGODÓN MEDIANTE <i>A. tumefaciens</i> . ....	59
CARACTERIZACION MOLECULAR .....	66
ANALISIS IN SILICO DE LA DELTA-ENDOTOXINA.....	69
CONCLUSIONES.....	75
ANEXO TABLAS. ....	82
ANEXO SECUENCIAS .....	87
ANEXO-FIGURAS .....	89

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Fruto de la planta de algodón (algodón hueso).....	11
Figura 2 Procesos industriales del fruto de algodón hasta ser comercializado.....	13
Figura 3 Estados productores de algodón en México. ....	15
Figura 4. Etapas de crecimiento del algodón y los insectos que la atacan.....	18
Figura 5 Dominios de las proteínas Cry.....	20
Figura 6 Mecanismo de acción de las proteínas Cry.....	22
Figura 7 Modificación en los sitios de reconocimiento de las proteínas Cry .....	23
Figura 8. Factores que causan resistencia a las proteínas Cry en insectos.....	24
Figura 9. Gen híbrido de la delta-endotoxina.....	26
Figura 10. Metodología a seguir para la obtención de plantas OGM de algodón.....	29
Figura 11 Construcción genética para la expresión del gen híbrido .....	30
Figura 12. PCR punto final gen-híbrido de la delta-endotoxina .....	51
Figura 13. Patrón de restricción de las clonas candidatas. ....	52
Figura 14. Patrón de restricción para verificar orientación de inserto.....	52
Figura 15 Patrón de restricción para verificar linealización de vector PCR8/TOPO/GW....	53
Figura 16. Electroforesis, PCR punto final del gen-híbrido en pB2WG7.....	54
Figura 17 Amplificación por PCR punto final de promotor 35S a terminador 35S.....	54
Figura 18. Electroforesis, PCR punto final de gen-híbrido en A. tumefaciens.....	55
Figura 19. Electroforesis PCR punto final de gen bar en A. tumefaciens .....	55
Figura 20 Inoculación de A. tumefaciens AGL1 en hojas de N. benthamiana .....	57
Figura 21. RT-PCR de mRNA de gen híbrido, expresado en N. benthamiana .....	58
Figura 22. RT-PCR de gen endógeno COX.....	58
Figura 23. Detección del gen-híbrido por RT-PCR .....	59
Figura 24. Meristemos de embriones de algodón.....	60
Figura 25. Obtención de meristemos de embriones de algodón .....	61
Figura 26. Explantes de algodón en medio MS con antibióticos .....	62
Figura 27. Plantas en medio de selección.....	62
Figura 28. Plantas convencionales susceptibles a herbicida .....	63
Figura 29. Plantas resistentes a glufosinato de amonio en medio de enraizamiento. ....	63
Figura 30. Plantas regeneradas. Se observa la presencia de hojas verdaderas.....	64
Figura 31. PCR punto final detectando el transgen-híbrido en algodón GM. ....	64
Figura 32. PCR punto final Gen bar .....	65
Figura 33. Número de copias por genoma en algodón GM. ....	67
Figura 34 Alineamiento de proteína híbrida con delta-endotoxina var berliner .....	70
Figura 35. Alineamiento de proteína híbrida con delta-endotoxina Var Kurstaki .....	71
Figura 36. Alineamiento de las tres delta-endotoxinas.....	72
Figura 37. Estructura de la delta-endotoxina codificada por el gen-híbrido.....	73
Figura 38. Parentales para la realización de la delta-endotoxina híbrida.....	73
Figura 39. Tres dominios de la delta-endotoxina híbrida. ....	74



## INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Producción de algodón en México .....	14
Tabla 2 Estados productores de algodón en México.....	15
Tabla 3 Ventajas y desventajas de la siembra de algodón OGM y convencional .....	16
Tabla 4 Mezcla de reacción PCR para el gen híbrido .....	31
Tabla 5 Programa de PCR punto final para amplificar el gen híbrido.....	31
Tabla 6 Mezcla de reacción topología.....	32
Tabla 7 Reacción de restricción, verificación de inserto .....	34
Tabla 8. Reacción de restricción verificar orientación .....	35
Tabla 9 Reacción de linealización .....	36
Tabla 10 Reacción de LR Clonasa .....	36
Tabla 11 Programa de amplificación por PCR del gen BAR.....	37
Tabla 12 Secuencia de oligonucleótidos gen bar.....	38
Tabla 13. Primera reacción para síntesis de cDNA .....	40
Tabla 14 Segunda reacción de síntesis de cDNA.....	40
Tabla 15. Mezcla de reacción dúplex para RT-PCR.....	41
Tabla 16. Programa de amplificación para RT-PCR.....	42
Tabla 17. Secuencia de oligonucleótidos y sonda para gen híbrido .....	42
Tabla 18. Secuencia de oligonucleótidos y sonda para el gen endógeno COX .....	42
Tabla 19. PCR punto final, detección del gen en plantas transformadas.....	47
Tabla 20. Oligonucleótidos gen híbrido (1400 pb) .....	47
Tabla 21 Secuencias de oligonucleótidos y sondas del gen SADI.....	48
Tabla 22. Programa de amplificación ddPCR.....	49
Tabla 23. Rendimiento de las semillas de acuerdo con la etapa de transformación .....	65

## RESUMEN

El algodón es una planta perteneciente al género *Gossypium*, y tiene importancia en la agricultura por su fruto fibroso el cual es utilizado en industria textil para la elaboración de telas. Además los subproductos se emplean como forraje de ganado o fertilizante agrícola. De las semillas se extraen aceites, margarinas, cosméticos, jabones y glicerina. En México, la producción de esta planta se confina en los estados del norte, zona del territorio nacional que ofrece las características climáticas y de suelo propias para el cultivo de esta planta (climas cálidos con temperaturas por arriba de los 15°C). Al igual que otras plantas, el algodón es susceptible a plagas de insectos que llevan a una disminución en el rendimiento de las cosechas, dentro de las que destacan aquellas causadas por lepidópteros.

*Bacillus thuringiensis* (Bt) es una bacteria Gram-positiva conocida por la producción de delta-endotoxinas, conocidas como insecticidas biológicos que tiene gran importancia en la agricultura, por su alta toxicidad contra grupos de insectos de los órdenes lepidóptera, coleóptera y díptera; además de ser biodegradable, esta proteína expresada heterológamente en plantas de importancia agrícola han permitido controlar plagas de insectos, además ofrecen la ventaja de ser inocuas al ser humano y animales, sin embargo se ha demostrado que algunos insectos lepidópteros han desarrollado cierto grado de resistencia a las delta-endotoxina. Actualmente, la investigación en *Bt* como agente entomocida se encuentra enfocada en la búsqueda de nuevas proteínas y su mejoramiento por ingeniería genética, que permita incrementar la toxicidad y ampliar su espectro frente a insectos susceptibles. Nuestro grupo de investigación desarrolló un gen híbrido a partir de las proteínas Cry1Aa1 y Cry1Ba1 de *Bt*, con alta actividad insecticida.

En el presente trabajo se logró comprobar la expresión del gen híbrido de la delta-endotoxina en plantas de *N. benthamiana*, por expresión transitoria y la posterior evaluación del RNAm, y aún más favorable, se logró la obtención de plantas de algodón transgénicas que contiene el gen híbrido, mismas que han sido comprobadas por PCR punto final del gen híbrido y el número de inserciones del gen híbrido en el genoma de algodón.

## ABSTRACT

Cotton (*Gossypium* spp.) is an economically important plant; the fruit is employed in the manufacture of textile fibers, while seeds are transformed in the manufacture of oils and waxes. In Northern Mexico, cotton planting is located in areas with warm climate (temperatures above 15 °C). Insects attack it during plant growth, thus causing yield reduction. Lepidopteran insects are the most important and dangerous plagues attacking the cotton.

*Bacillus thuringiensis* is a Gram-positive bacterium producing an insecticide protein during sporulation. The protein accumulates in a parasporal crystal, also known as  $\delta$ -endotoxins or Cry proteins. The toxins display specificity against lepidopteran, coleopteran or dipteran insects, these proteins being biodegradable. Genetic engineering has achieved the heterologous expression of these proteins in plants, in order to confer resistance to insects, thus reducing the use of insecticides and thereby increasing cotton quality. It is of note the safety of these proteins to mammals, including humans. Despite the success in using this strategy in the last 25 years, resistance to this control method already produced resistant pests. Nowadays, research groups are focused on the identification of novel proteins from *Bt* to increase the spectrum of action of these toxins. In the present work, we designed a hybrid gene employing Cry1Aa1 and Cry1Ba1 *Bt* proteins. A gene expression vector was constructed to express this toxin in cotton plants, currently susceptible to lepidopteran pests. The expression of the hybrid gene was confirmed by transient expression in *N. benthamiana* plants, thus demonstrating both transcription and translation of the new gene.

## INTRODUCCIÓN

El algodón, planta del género *Gossypium* incluye alrededor de 50 especies, de éstas solo cuatro son considerados de importancia por los productores en el campo. Como es bien sabido, su importancia económica a nivel mundial radica en la obtención del fruto fibroso conocido como algodón hueso para la industria textil en la fabricación de telas. Asimismo, la semilla se utiliza para dos fines importantes, para la siembra y para la extracción de aceites en la producción de margarinas, cosméticos, jabones y glicerinas, además de que los subproductos generados por la planta se emplean como forraje de ganado o fertilizante agrícola (SAGARPA 2011; Ñañez 2012).

Originario de México y diversificado en todo el mundo, el algodón es una planta que crece en zonas cálidas o de temperaturas superiores a los 15 °C con requerimientos de agua de 50 cm<sup>3</sup> en la etapa de crecimiento, con ciclos de producción de 210 días (Weiger *et al.*, 2011). En México, la producción de algodón de acuerdo con el Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera la producción de algodón en 2010, fue de 440 490 toneladas en la zona norte del país, considerando dos temporadas, la de otoño-invierno y algunas en primavera-verano (Sistema producto algodón 2012).

En la década de los 80s con el auge de la biología molecular y la expresión de proteínas recombinantes, la agricultura fue uno de los ámbitos más beneficiados, gracias a la inserción y expresión de genes en las plantas con el fin de conferirle resistencia a plagas de insectos y proporcionarle resistencia a herbicidas, logrando así la disminución en la aplicación de químicos que no son amigables con el medio ambiente, y que por su efecto tóxico disminuyen el rendimiento y la calidad del fruto. Dentro de los primeros y más importantes genes insertados en los cultivos y expresión de forma heteróloga son los genes para conferirle resistencia a

herbicida mediante la expresión del gen BAR, aislado de *Streptomyces hygroscopicus* (Thompson *et al.*, 1987). Más utilizadas aún son las proteínas tóxicas de *Bacillus thuringiensis* conocidas como delta-endotoxinas para conferirle a la planta resistencia frente al ataque de insectos patógenos que disminuyen el rendimiento de los cultivo. (Adang *et al.*, 2014).

En la actualidad se conocen cerca de 70 grupos de delta-endotoxinas y más de 200 miembros clasificados de acuerdo con el grupo de insectos a los que presentan toxicidad y a la homología en su secuencia de aminoácidos, conocidas también como proteínas de tres dominios, presentan estructura globular, que poseen un sitio de reconocimiento que les permite unirse a la membrana de las células epiteliales del insecto y tras oligomerizarse estas proteínas, dan lugar a la formación de poros en la membrana de las células del epitelio del insecto, hasta lograr la lisis de las células. Posterior a ello el contenido alcalino del intestino es vertido en la hemolinfa para terminar causando la muerte por septicemia del insecto (Bravo *et al.*, 2012).

Una de las ventajas de estas toxinas es que son altamente específicas, pues solo interaccionan con receptores en el intestino de los insectos, además de ser activas a pH alcalinos, lo cual las hace inocuas para mamíferos, incluyendo al ser humano (Soberón & Bravo, 2007).

A partir de que se comenzó a utilizar este tipo de cultivos se ha incrementado su uso, teniendo gran éxito a nivel mundial; sin embargo ciertas plagas de insectos desarrollan resistencia a las proteínas que expresa la planta, como es el caso de los insectos Lepidópteros. Un experimento en insectos a nivel de laboratorio demostró que los insectos después de 30-36 generaciones sufren mutaciones en los receptores del intestino de los insectos, bloqueando la unión de las deltas-endotoxinas en las membranas de las células del epitelio intestinal del insecto y con ello se bloquea la formación del poro (Juarat-Fuentes & Adang 2006).

Xoconostle-Cázares (1989) desarrolló un gen híbrido a partir de las proteínas Cry1Aa1 y Cry1Ba1 de *Bacillus thuringiensis*, la cual mostró mayor toxicidad contra larvas de *Manduca sexta*.

Para este trabajo se realizó la regeneración de algodón genéticamente modificado con el gen híbrido desarrollado por Xoconostle-Cazares (1989) para la expresión de una delta-endotoxina de *B. thuringiensis*, además de que las plantas serán resistentes al herbicida glufosinato de amonio.

# ANTECEDENTES

## EL ALGODÓN

El algodón es una planta perteneciente al género *Gossypium*, que cuenta con cerca de 50 especies de plantas, sin embargo se consideran como plantas de importancia económica las especies:

- *Gossypium hirsutum*
- *Gossypium barbadense*
- *Gossypium herbaceum*
- *Gossypium arboreum*

Su principal importancia radica en el fruto conocido como algodón hueso, compuesto de fibras de celulosa que se utiliza en la industria textil para la elaboración de telas, de las especies mencionadas *G. hirsutum* es la más utilizada a nivel mundial para el cultivo de la planta destacando cerca del 90 % para el cultivo y *G. barbadense* que aporta cerca del 5% de producción mundial. Ambas especies son originarias del continente Americano, de países como Perú para *G. barbadense*, México y otros países de América central son hogar de *G. hirsutum* (SAGARPA 2011; Ñañez, 2012).

## CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

La planta algodонера es un arbusto pequeño de flores amarillas, con frutos en forma de cápsula, los que están dividido en valvas que puede contener de 3 a 5 de éstas, tiene en su interior semillas rodeadas de prolongaciones filiformes de fibras blancas y rizadas; cuando maduran, el fruto se abre y las fibras se proyectan hacia el exterior. Estas fibras dan a la planta la apariencia estar cubierta por copos de nieve, lo que se conoce como el algodón hueso (SAGARPA, 2011)

Las características morfológicas de cada parte de la planta se describen a continuación.

- **Raíz:** las raíces principales son pivotantes en suelos profundos con buen drenaje. Las raíces pueden llegar a medir hasta 2 metros de profundidad en el suelo gracias a que son penetrantes.
- **Tallo:** de forma erecta, ramificada y regular, puede tener dos tipos de ramas las vegetativas y las fructíferas.
- **Hojas:** son pecioladas de tamaño grande y con márgenes lobulados, con un color verde intenso.
- **Flores:** son dialipétalas, solitarias, péndulas y grandes.
- **Fruto:** lo que se conoce como algodón hueso es un fruto en cápsula de forma ovoide, que tiene de tres a cinco carpelos, que a su vez contiene de seis a diez semillas cada uno. El algodón es una fibra que proviene de las células epidérmicas de las semillas. La fibra puede variar de tamaño de 20 a 45 cm y de peso de 4 a 10 gramos (Sistema producto algodón, 2012).



Figura 1 Fruto de la planta de algodón (algodón hueso).  
Modificado Maldonado 2009

## PRODUCCIÓN

El algodón es una planta propia de zonas cálidas, o con temperaturas por arriba de los 15°C, con una iluminación solar adecuada y sus requerimientos de agua son cerca de 50 cm<sup>3</sup> cuando ha alcanzado su altura máxima (Retes *et al.*, 2015).



Se puede cultivar en casi cualquier tipo de suelo, sin embargo las características adecuadas para el crecimiento de algodón son aquellos con textura media, es decir, franco-arenosos finos, francos, franco-limosos y franco-arcillosos gruesos, de esta forma, no se recomienda el uso de suelos arcillosos ya que no proporciona un adecuado drenaje como lo demandan las raíces (sistema producto algodón 2012).

Para los climas secos no son recomendable los suelos livianos o con baja cantidad de materia orgánica ya que no tendrán retención de agua suficiente para el cultivo de algodón. El drenaje interno del suelo es importante, ya que debe de evitarse el anegamiento, para no llevar a la planta a morir por anaerobiosis en la zona de la raíz (sistema producto algodón 2012).

Otra característica importante del suelo es el pH, el cual debe estar ligeramente ácido entre 6.2 y 7.2. El ciclo de producción de algodón dura aproximadamente 210 días, dentro de los primeros días, la semilla brota y tres meses después la floración comienza, cuando esto ocurre, la flor se desprende y el capullo comienza a crecer. Después de tres semanas el capullo alcanzará su tamaño final, y dentro de él, las semillas se desarrollarán formando las fibras de algodón antes de que emerjan. La floración comienza 50 días después de la floración, de las semillas saldrán fibras cortas y largas de aproximadamente 3 mm que la recubrirán a manera de vello (Weiger *et al.*, 2011; Sistema producto algodón 2012).

En México se pueden observar dos temporadas de producción de algodón, una que se encuentra entre otoño-invierno y otra de primavera-verano, tanto las características del suelo para el cultivo de algodón, el clima y las condiciones de humedad posiciona a México como un país con territorio adecuado para el cultivo de esta planta (Weiger, 2011, SAGARPA, 2011).

## APLICACIONES

Una de las principales aplicaciones de esta planta como se ha venido mencionando es el fruto conocido como algodón hueso de abundantes fibras de celulosa, la cual es útil para la industria textil, en la elaboración de telas, caracterizándolas por ser ligeras, absorbentes y frescas, también pueden ser utilizadas en la elaboración de gasas y vendajes (figura 2).

De esta planta también se puede utilizar la cáscara de la semilla para forraje de ganado, la harina como alimento o fertilizante agrícola, además se pueden extraer aceites de la semilla y utilizarse en la preparación de margarina, cosméticos algunos jabones y glicerina (Sistema producto algodón, 2012; SAGARPA, 2011; Retes, 2015).

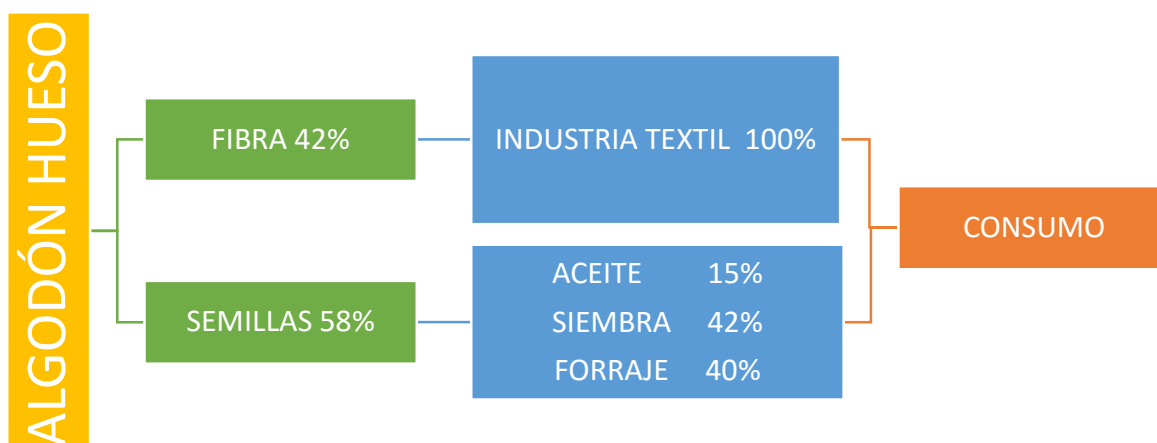


Figura 2 Procesos industriales del fruto de algodón hasta ser comercializado  
Modificado de sistema producto algodón 2012

## CULTIVO DE ALGODÓN EN MÉXICO

Entre las décadas 60s y 70s, México se posicionó entre los países más destacados en la producción de algodón; sin embargo, por la falta de apoyo y

sobre todo por la apertura del TLC, estuvo casi a punto de desaparecer. Tras varios años de recuperación y principalmente por la adopción de nuevas tecnologías e innovaciones el sector productivo de algodón se ha ido reactivando (SAGARPA 2014; SHCP 2014). En la última década se puede observar un aumento en la producción de algodón (tabla 1).

Tabla 1 Producción de algodón en México

Año	Superficie (miles ha)		Volumen de producción (miles ton)	Rendimiento (ton/ha)	Valor de producción (mdp)
	Sembrada	Cosechada			
2000	80.2	77.2	223.8	2.9	980.3
2001	91.9	88.5	276.8	3.1	758.5
2002	40.5	39.6	123.3	3.1	431.3
2003	62.9	60.6	209.6	3.5	1231
2004	110	109.1	385.4	3.5	1761.2
2005	129.5	128.2	401	3.1	1640.5
2006	117.7	116.6	447.9	3.8	2016.7
2007	111.6	108.7	378.9	3.5	1999.5
2008	104.8	99.7	365.2	3.7	1820.5
2009	72.3	72	278.5	3.9	1878
2010	120.1	112.9	440.5	3.9	4098.7
2011	198.4	193.5	746.2	3.9	7089.9
2012	155.5	155	668.7	4.3	5911.4
2013	124.8	123.4	580.4	4.7	5339.5
2014	152.3	148.4	636.6	4.3	N/D

Tomado de SHCP 2014.

En México los principales estados productores de algodón se encuentran en el norte del país, destacando los estados de:

- Chihuahua
- Baja california
- Coahuila
- Sonora
- Durango
- Tamaulipas

En el año 2012 se reportó una producción nacional de 668.7 miles de toneladas, lo que fue igual a 5911.3 mdp en total por los 7 estados productores de algodón mismos que se muestran en la tabla 2 y figura 3 junto a los porcentajes de producción para cada uno (SHCP 2014).

Tabla 2 Estados productores de algodón en México

Estados	Volumen		Valor mdp
	Miles de toneladas	% de Participación	
<b>Chihuahua</b>	355	53.10%	3391.8
<b>Baja California</b>	152.6	22.80%	1199.5
<b>Coahuila</b>	75.3	11.30%	685.1
<b>Sonora</b>	58.9	8.80%	386
<b>Durango</b>	15.9	2.40%	139.9
<b>Tamaulipas</b>	6.1	0.90%	75.3
<b>Sinaloa</b>	4.9	0.70%	33.7
<b>Total nacional</b>	<b>668.7</b>	<b>100%</b>	<b>5911.3</b>

Tomado de SHCP 2014

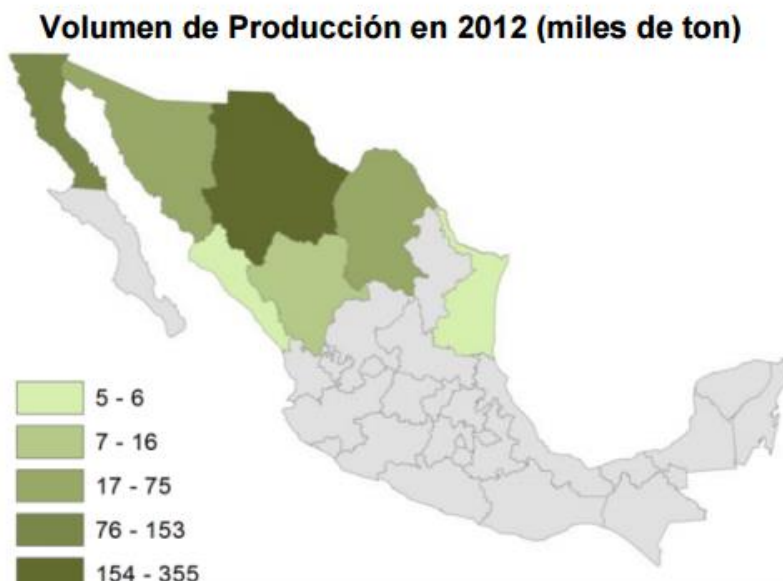


Figura 3 Estados productores de algodón en México.  
Tomado de SHCP 2014

En México el cultivo de algodón transgénico comenzó en el año de 1996, aumentando la densidad de siembra, y con ello, un aumento en los rendimientos de los productores y sus ingresos; aunado a ello, se logró la disminución y/o el uso moderado y racional de químicos tanto plaguicidas como herbicidas, disminuyendo a su vez los costos en aspectos de control de plagas y malezas (SAGARPA 2014).

Para el 2010 se estimó que el uso de algodón genéticamente modificado era del 62% del total de la superficie cultivada, aumentando el rendimiento promedio por hectárea de 3 toneladas en 1996 a 6 toneladas en 2010. El algodón transgénico sembrado en México principalmente expresa las proteínas Cry de *B. thuringiensis* que le confiere protección frente a insectos principalmente lepidópteros, y el gen de resistencia al herbicida glufosinato de amonio (SAGARPA 2014).

El uso de semillas genéticamente modificadas para el cultivo de algodón tiene ventajas y desventajas económico-productivas del uso de algodón genéticamente modificado contra el algodón convencional (tabla 3) (SAGARPA 2014).

Tabla 3 Ventajas y desventajas de la siembra de algodón OGM y convencional

actividades	Algodón genéticamente modificado	Algodón convencional
<b>Costo de semilla/unidad</b>	Mayor costo que el material convencional	Menor costo que el material transgénico
<b>Costo semilla/ha</b>	Menor costo que el tradicional	Mayor costo que el OGM
<b>Aplicación de insecticida</b>	Reducción sensible en la cantidad aplicada por ha.	Mayor cantidad aplicada por ha.
<b>Aplicación de herbicidas</b>	Reducción en la cantidad aplicada por ha.	Mayor cantidad aplicada por ha Pérdida de algunas plantas por efecto del herbicida
<b>Rendimiento/ha</b>	Incremento en más del 40 % en comparación con el algodón convencional gracias a mayor control fitosanitario	Es menor en los OGM
<b>Instituciones que generan investigación</b>	Multinacionales: Monsanto Bayer	No se tiene en México un programa formal de fitomejoramiento.

Modificado de SAGARPA, 2014

## PLAGAS DE INSECTOS EN ALGODÓN

El cultivo de algodón al convertirse en monocultivo también se ve afectada por la presencia de insectos plaga que disminuyen en rendimiento de la producción tanto de la planta como del fruto.

Los daños mayores en el rendimiento de los cultivos se han visto en presencia de insectos como los mencionados a continuación:

- *Heliothis (Heliothis armígera)*
- Gusano rosado (*Pectinophora gossypiella*)
- Araña roja (*Tetranychus urticae*)
- Pulgones

Otras plagas de insectos que afectan el algodón pero en menor medida son las siguientes:

- Oruga espinosa (*Earias insulana*)
- Mosca blanca (*Bemisia tabaco*)
- Prodemia (*Spodoptera litoralis*)
- Trips (*Thrips angusticeps* y *T. tabaci*)
- Gusano gris (*Agrotis Segetum*)
- Gardana (*Spodoptera exigua*)

La presencia de insectos que atacan algodón se ven influenciados en parte por la etapa de desarrollo de la planta, sin embargo a lo largo del ciclo de vida esta es susceptible a varios de ellos. Debido a esto es importante conferirle protección en cualquier tejido de la planta así como a cualquier edad; la figura 4 representa las edades de la planta y los insectos que pueden atacarla y disminuir su producción, para fines de este proyecto se han marcado con una X roja aquellos pertenecientes al orden Lepidóptera (Plagas de algodón, 2011)

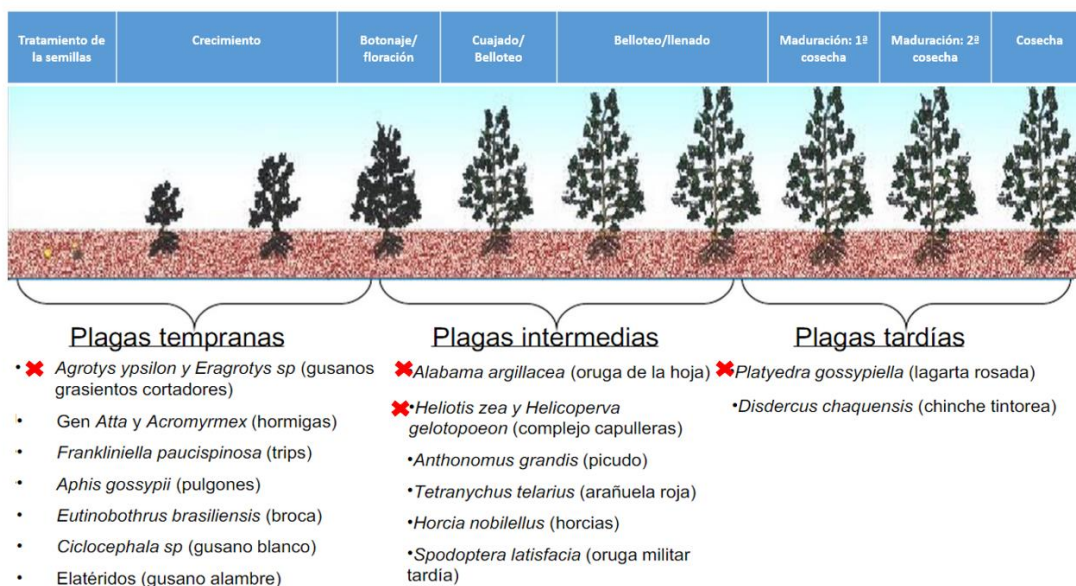


Figura 4. Etapas de crecimiento del algodón y los insectos que la atacan  
Modificado de <http://www.scribd.com/doc/32532724/PLAGAS-ALGODON>

## DELTA-ENDOTOXINAS DE *Bacillus thuringiensis*, PROTEINAS Cry.

Las proteínas Cry son sintetizadas por la bacteria *Bacillus thuringiensis* en la fase de esporulación en forma de cristales para-esporales y poseen la capacidad de ser altamente tóxicas para lepidópteros, coleópteros y dípteros, caracterizadas por su alta especificidad para atacar al insecto blanco y causarle la muerte (Sanahuja *et al.*, 2011).

Se conocen cerca de 700 genes que codifican para toxinas en *B. thuringiensis* (Crickmore *et al.*, 1989). Estos se clasifican en seis principales grupos: Cry1aa, Cry2aa, cry3aa, cry3bb, cry4ba, esta clasificación depende del tipo de insecto al que atacan, y posteriormente a la similitud de la secuencia de sus aminoácidos (Pardo-López *et al.*, 2013; Li *et al.*, 1991; Adang *et al.*, 2015).

Por análisis de cristalografía se ha demostrado que todas tienen semejanza en cuanto a su estructura terciaria, se caracterizan por ser globulares y poseer tres dominios funcionales (Li *et al.*, 1991; Pardo-López *et al.*, 2013), con un solo linker

o sitio de unión, razón por la que se asume la hipótesis que su función es la misma. Se les considera también en el grupo de las proteínas formadoras de poros (Parker & Feil, 2005), de las que destacan dos principales grupos, i) las toxinas  $\alpha$ -hélice que forman un poro transmembranal; ii) toxinas  $\beta$ -barril que se insertan en la membrana para formar un poro en conformación de barril, gracias a la agrupación de cada monómero de láminas beta (Li *et al.*, 1991; Adang *et al.*, 2015) Los dominios de las proteínas se describen a continuación (figura 5):

- Dominio I (N-terminal): compuesto de un conjunto de  $\alpha$ -hélices (7-8) de las cuales la  $\alpha$ -hélice central es hidrofóbica y está rodeada por el resto de las  $\alpha$ -hélices de tipo antipático, a este extremo o dominio se le atribuye la actividad de inserción de las proteínas en la membrana de la célula y la formación del pre-poro (Li *et al.*, 1999; Pardo-López *et al.*, 2013; Bravo *et al.*, 2012).
- Dominio II Consiste en el acomodo antiparalelo de las láminas  $\beta$  de forma triangular con exposición de regiones onduladas, que le dan flexibilidad. Está involucrado en el reconocimiento de la proteína en el intestino del insecto (Adang *et al.*, 2014; Bravo *et al.*, 2012; Li *et al.*, 1999; Pardo-López *et al.*, 2013).
- Dominio III: Conjunto de láminas  $\beta$  en forma de sándwich, su función aún no está definida del todo pero se le atribuye la estabilidad y participar en la especificidad de la proteína, así también se encuentra involucrado en la unión al receptor del intestino de los insectos (Adang *et al.*, 2015; Bravo *et al.*, 2012; Li *et al.*, 1999; Pardo-López *et al.*, 2013; Promdonkoy & Ellar, 2005).



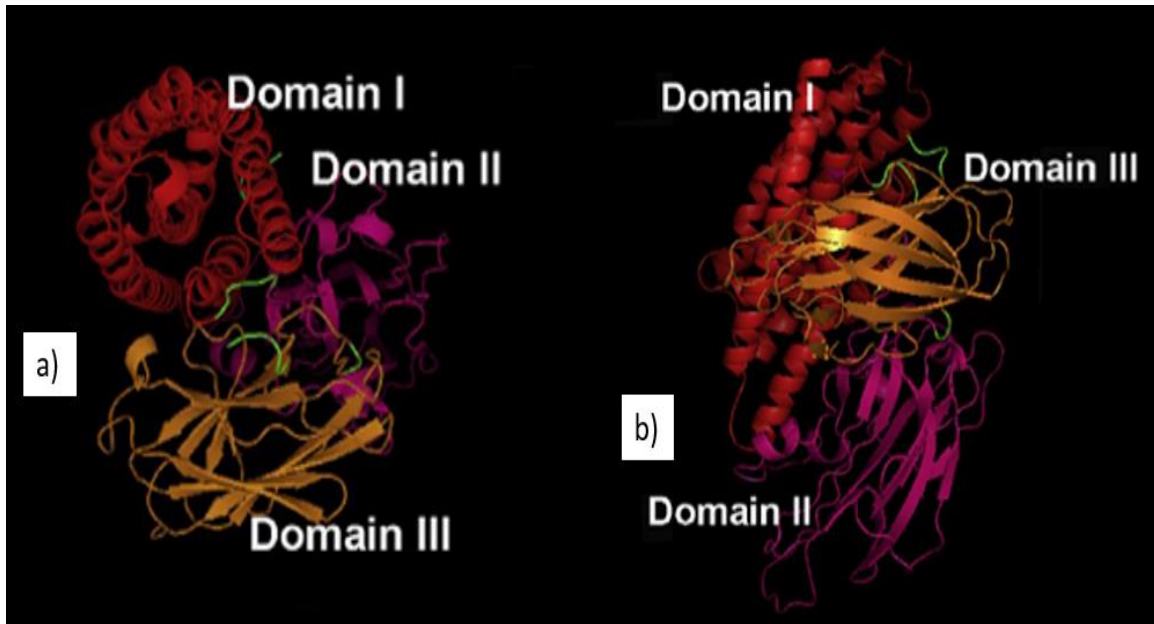


Figura 5 Dominios de las proteínas Cry.

A) Se puede observar la conformación del dominio I con el 5 de  $\alpha$ -helice en el centro. b) muestra el dominio II y III y la conformación de láminas  $\beta$ -plegadas (modificado de Adang *et al.*, 2015)

Las proteínas Cry para ser activas deben sufrir un proceso de proteólisis en el intestino medio del insecto, y posteriormente deben interactuar en la membrana de las células epiteliales con sus receptores específicos (Bravo & Soberón, 2007).

## MECANISMO DE ACCION DE LAS PROTEINAS CRY

Para todas las proteínas de tres dominios, en este caso particular las proteínas Cry, se ha documentado una misma estructura tridimensional, lo que sugiere que tiene un mismo modo de acción en los insectos, si bien la mayoría de los estudios de caracterización se han realizado en lepidópteros, como *Manduca sexta*, principalmente (Miranda *et al.*, 2001),

El primer paso para describir el modo de acción de las proteínas Cry comienza con la ingestión de las mismas por el insecto susceptible; una vez dentro, en caso de ser ingerido en forma de cristal, éste se solubiliza, y la proteína al entrar en contacto con las proteasas (principalmente tripsina) se activa; se hidrolizada en

segmentos del extremo N-terminal y C-terminal, produciendo una proteína de alrededor de 55-65 kDa. Una vez activas las toxinas, buscan los receptores específicos en las vellosidades de las membranas del intestino de los insectos (figura 6) (Miranda *et al.*, 2001; Adang *et al.*, 2015; Pardo-López *et al.*, 2013).

Se han descrito por lo menos cuatro receptores importantes en los insectos las cuales se enlistan a continuación:

- Aminopeptidasa APN
- Cadherina
- Fosfatasa alcalina
- Transportador ABC

De estos receptores, las aminopeptidasas fueron los primeros receptores identificados como aquellos que se unen a las proteínas Cry en el epitelio del intestino de los insectos. Las fosfatasas alcalinas son abundantes, pero con baja afinidad, mientras que las aminopeptidasas y Cadherina son más abundantes en el epitelio (Gómez *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2013), y presentan alta afinidad con las proteínas Cry (Bravo *et al.*, 2007; Miranda *et al.*, 2001; Pardo-López *et al.*, 2013).

Para el caso de las fosfatasas alcalinas y las aminopeptidasas, una vez que han reconocido y unido a la proteína Cry, comenzarán a oligomerizarse para llevar a cabo la formación del poro en la membrana celular (Bravo *et al.*, 2012). La muerte del insecto ocurre por un choque osmótico, permitiendo la salida de los componentes del intestino e induciendo septicemia (Adang *et al.*, 2015; Bravo *et al.*, 2007).

En el caso de la Cadherina, su unión a las proteínas Cry activará por un lado la oligomerización de proteínas Cry para la formación del pre-poro y por otro la activación de la proteína G relacionada con la apoptosis celular (Maagd *et al.*, 2001; Adang *et al.*, 2015).

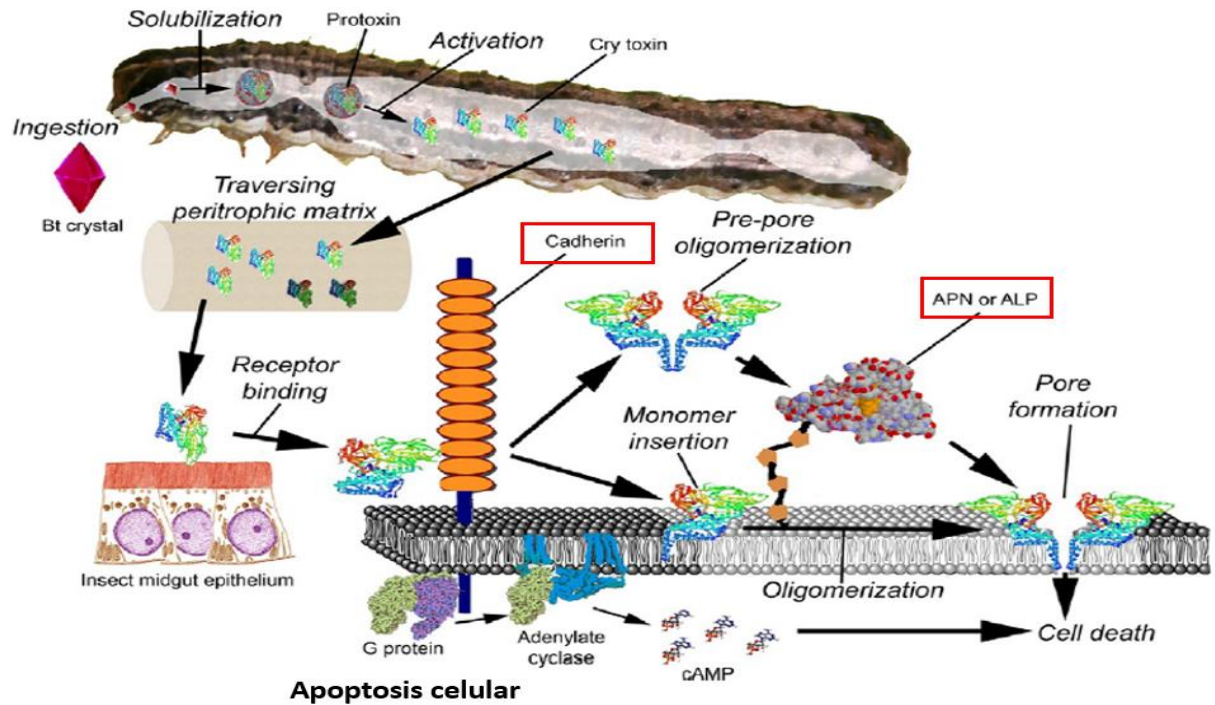


Figura 6 Mecanismo de acción de las proteínas Cry.  
Modificado de Adang *et al.*, 2014.

A manera de resumen, se mencionan las 6 principales etapas en la formación del poro para la lisis celular de las células del intestino de los insectos.

- 1.- Ingestión de las proteínas Cry y la solubilización en la luz del intestino medio del insecto inducido por las condiciones óptimas de pH y la activación proteolítica
- 2.- Los monómeros activos de la delta-endotoxina se unen a los receptores de membrana, para comenzar la oligomerización.
- 4.- Las proteínas unidas a los receptores de membrana están listas para comenzar la oligomerización de las toxinas y la formación del pre-poro.
- 5.- El pre-poro se inserta en la membrana causando la formación del poro y la lisis celular (Adang *et al.*, 2015; Maagd *et al.*, 2003; Pardo-López *et al.*, 2013).

## RESISTENCIA DE INSECTOS A LAS TOXINAS Bt

De alguna forma u otra la sobreexposición de los insectos a los cultivos Bt ha dado como resultado el desarrollo de resistencia a esas toxinas volviendo a las plantas susceptibles a su ataque (Pardo-López *et al.*, 2013).

En laboratorio se ha demostrado que los insectos pueden desarrollar resistencia a las delta-endotoxinas en cualquiera de los pasos antes mencionados para la formación del poro (Ferré & Van Rie 2002; Pardo-López *et al.*, 2013), lo más recurrente es la mutación en alguno de los sitios de reconocimiento de los receptores de membrana, lo que impide que las delta-endotoxinas se unan a los mismos y se interrumpa la oligomerización de las proteínas, así como la formación del poro (figura 7 y 8) (Ferré & Van rice 2002; Herrero *et al.*, 2001) .

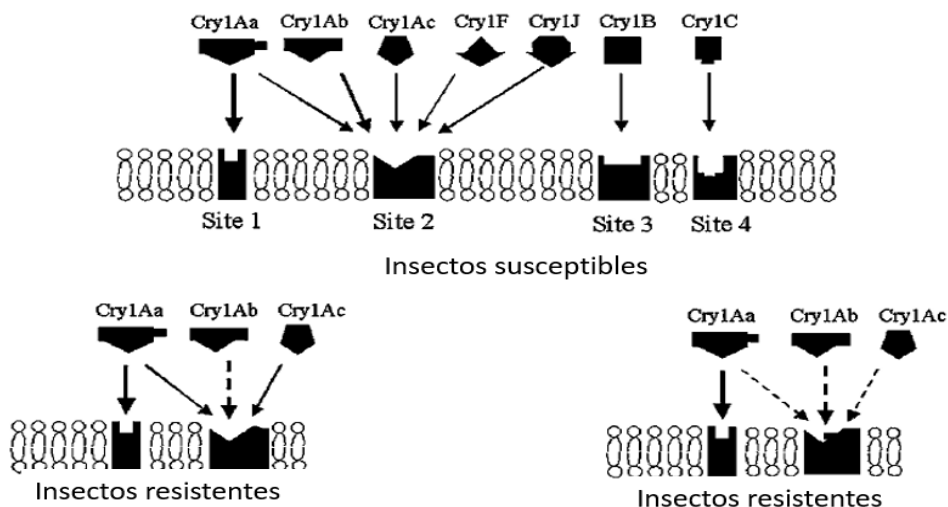


Figura 7 Modificación en los sitios de reconocimiento de las proteínas Cry  
Tomado de Ferré & Van rice 2002

Se ha demostrado que cantidades excesivas de tripsina o un pH inadecuado en el intestino medio de los insectos llevará a una rápida degradación de las delta-endotoxinas. Adicionalmente, se puede correr el riesgo de que el sistema inmune del insecto esté sobreactuando sobre también las degrade. En la imagen 8 se describen los principales mecanismos de resistencia, así como los insectos con

los que se les relaciona, en su mayoría lepidópteros (Li *et al.*, 2004; Maagd *et al.*, 2012; Pardo-López *et al.*, 2013).

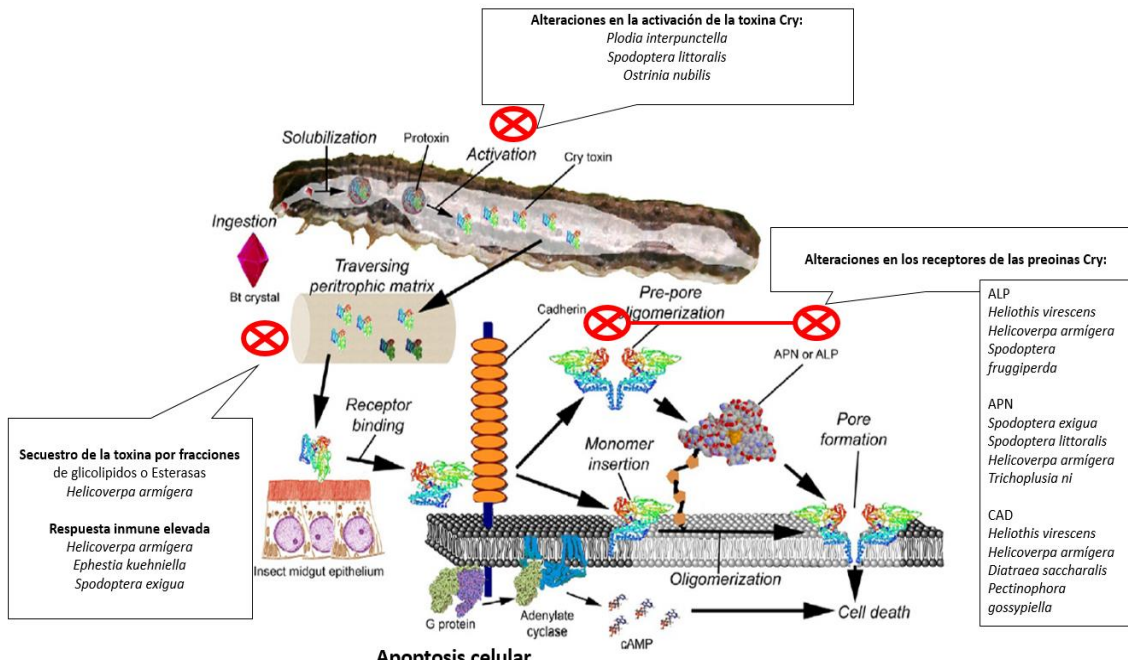


Figura 8. Factores que causan resistencia a las proteínas Cry en insectos. Modificado de Adang *et al.*, 2015.

## EXPRESIÓN DE GENES HÍBRIDOS DE DELTA-ENDOTOXINAS

Con la presencia de insectos resistentes a las proteínas Cry los estudios recientes se centran en la búsqueda de nuevos y mejores agentes de control de insectos en las plantas. En el caso de algodón principalmente contra plagas de Lepidópteros se han desarrollado proteínas híbridas de *B. thuringiensis*. Estas proteínas fueron diseñadas al unir los dominios (I, II o III) de dos o tres toxinas Cry para crear una nueva combinación, con el fin de aumentar en la mayoría de los casos la toxicidad hacia los insectos o aumentar el espectro de blancos, es decir buscar un mayor número de plagas susceptibles de ser controladas.

Por ejemplo, Naimov *et al.* (2003) llevaron a cabo la expresión de una toxina híbrida en plantas de papa a partir de Cry1Ba y Cry1, toxinas que actúan sobre insectos como el escarabajo de la papa (CPB; *Leptinotarsa decemlineata* Say), lepidóptero de la papa (*Phthorimaea operculella* Ziller PTM) y el barrenador de maíz Europeo (ECB; *Ostrinia nubilalis* Hübner), y que además representan un serio problema para este cultivo (Naimov *et al.*, 2003).

Sus resultados demostraron una completa protección de la planta frente a las tres insectos en estado larvario y en el caso particular de CPB en estado adulto, sin embargo no aumenta la toxicidad, es decir la mortalidad que causa en los insectos es semejante a la que causaría cada una de las proteínas por separado, la principal ventaja es la inserción de un solo gen en lugar de varios que puedan competir por su expresión dentro de la planta (Naimov *et al.*, 2003).

Karlova *et al.* (2005) desarrollaron híbridos de toxinas a partir de los dominios I y II de las proteínas Cry1Ba, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Ea y Cry1Fb a las cuales les intercambio el dominio III de Cry1Ac que determina la toxicidad contra *Heliothis virescens*. De las proteínas evaluadas solo tres mostraron toxicidad contra este insecto Cry1Ca, Cry1Fb, y en menos proporción Cry1Ba (Karlova *et al.*, 2005).

## **GEN HÍBRIDO DE LA DELTA-ENDOTOXINA DE *B. thuringensis***

Con base en el trabajo de la Dra Beatriz Xoconostle (Xoconostle-Cázares, 1989) se desarrolló el ensamblaje de dos proteínas Cry1Ab1 y Cry1Aa1, ambas de *B. thuringiensis* variedades Berliner y Kurstaki respectivamente; ambas proteínas pertenecen al grupo de las toxinas de tres dominios. Esta proteína presentó alta toxicidad en bioensayos contra *Manduca sexta*.

Para construir el gen híbrido se realizó la unión del dominio I y un oligopéptido de Cry1Aa, seguido de un fragmento del dominio II de CryAb1 y completar el dominio de la delta-endotoxina, seguido del dominio III de CryAb1.

La figura 9 muestra esta unión, resaltando en color rojo la parte de Cry1Aa1 variedad *berliner* y de azul Cry1Ab1 variedad *kurstaki*

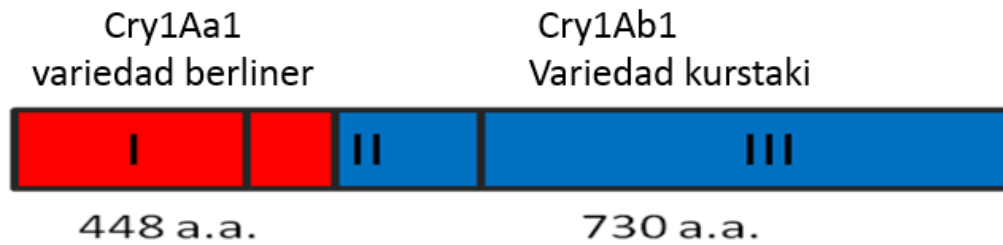


Figura 9. Gen híbrido de la delta-endotoxina.

El gen híbrido de la delta-endotoxina (3534 pb) codifica para una proteína de 1176 aa tiene de longitud. El gen se rediseñó para su expresión en planta, a través del cambio de usos de codones frecuentes en algodón y maíz. El gen sintético se obtuvo de la compañía Genscript, y se encuentra clonado en el vector PGVO4, en *E. coli* DH5 $\alpha$ .

## JUSTIFICACIÓN

Debido a la importancia económica que representa el cultivo de algodón en la industria textil, es de vital importancia disminuir los efectos negativos que pueden causarle a la planta insectos fitopatógenos y/o los químicos utilizados para contrarrestar los daños de estos insectos sobre la planta.

En este sentido, las nuevas tecnologías de biología molecular permiten la inserción de genes para la expresión de proteínas recombinantes con propiedades antagónicas contra insectos, así como la modificación de las mismas para aumentar su efectividad en el control de plagas de insectos

En este trabajo se propone la generación de algodón genéticamente modificado resistente a estas plagas, mediante la inserción de un gen híbrido que codifica para una delta-endotoxina de *B. thuringiensis*.



## OBJETIVO GENERAL

Generación de algodón genéticamente modificado con un gen híbrido que codifica para una delta-endotoxina de *B. thuringiensis* para controlar plagas de lepidópteros.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener la unidad de expresión del gen híbrido con el marcador de resistencia al herbicida glufosinato de amonio.
- Evaluar la expresión transitoria del gen híbrido de la delta-endotoxina en *N. benthamiana*.
- Transformar genéticamente algodón vía *Agrobacterium tumefaciens*.
- Regenerar y seleccionar plantas genéticamente modificadas.
- Caracterización molecular de plantas genéticamente modificadas.

## METODOLOGÍA

La metodología propuesta para la transformación de algodón se dividió en 5 partes las cuales se describen en el siguiente diagrama; más adelante se detalla cada una de las actividades realizadas

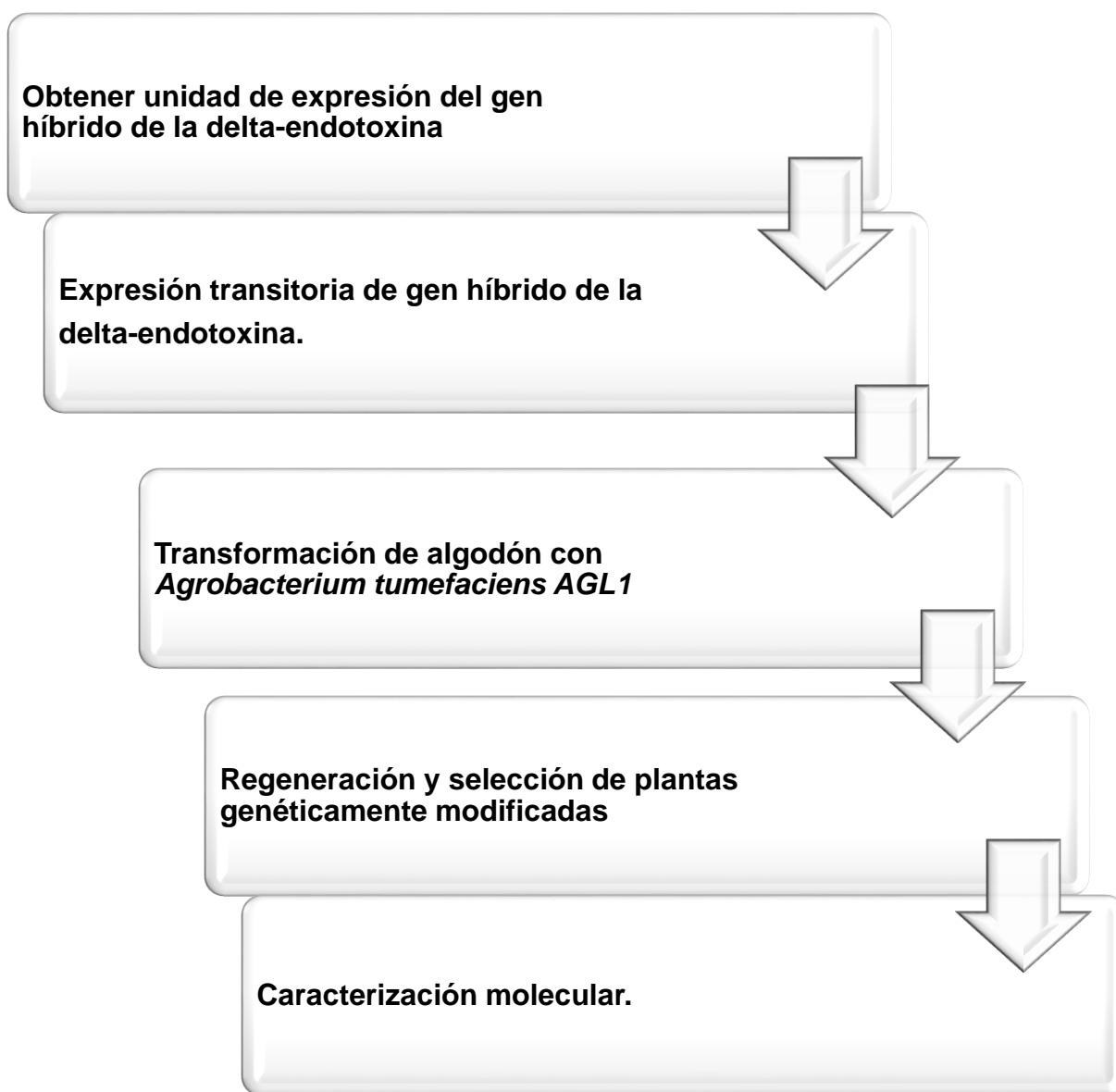


Figura 10. Metodología a seguir para la obtención de plantas OGM de algodón

## UNIDAD DE EXPRESIÓN DEL GEN HÍBRIDO DE LA DELTA-ENDOTOXINA

Para la expresión del gen híbrido de la delta-endotoxina de *B. thuringiensis*, se planteó el uso del promotor constitutivo del virus del mosaico de coliflor (CMV) 35S así como el terminador 35S para permitir la expresión del gen en toda la planta. Para la selección de las plantas transformadas, la construcción debe contener en su secuencia al gen *bar*, el cual le confiere resistencia al herbicida glufosinato de amonio. La unidad de expresión consistente en el promotor, gen estructural y terminador. En la figura 11 se muestra el orden de los elementos en la unidad de expresión.

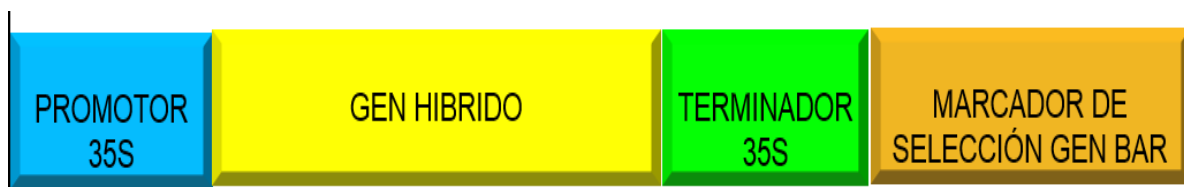


Figura 11 Construcción genética para la expresión del gen híbrido

Para la clonación del gen de interés en el vector de sobreexpresión mediante la tecnología de recombinación Gateway se parte de un vector de entrada en este caso el vector entrada el PCR8/TOPO/GW que lleva en orientación correcta el gen de la delta endotoxina para ser transferido al vector de sobreexpresión pB2GW7, que ya contiene tanto el promotor y terminador 35S así como el gen BAR.

### INSERCIÓN DEL GEN DE INTERÉS EN EL VECTOR DE ENTRADA.

Como primer paso el gen de interés se ligó al vector de entrada pCR8/TOPO/GW el gen híbrido se obtiene de amplificación por PCR punto final, con la enzima DNA

polimerasa *ExTaq* Takara. Tanto la mezcla de reacción así como las condiciones de amplificación se muestran en las tablas 4 y 5 respectivamente

Tabla 4 Mezcla de reacción PCR para el gen híbrido

Reactivos	Cantidad (1X)
Agua mQ estéril	5.95
Buffer Ex Taq	1 $\mu$ L
dNTP	1 $\mu$ L
OLIGONUCLEOTIDO 5'	0.5 $\mu$ L
OLIGONUCLEOTIDO 3'	0.5 $\mu$ L
Taq Takara	0.05 $\mu$ L
DNA molde	1 $\mu$ L
<b>Vol. Total</b>	10 $\mu$ L

Tabla 5 Programa de PCR punto final para amplificar el gen híbrido

PASO	TEMPERATURA	TIEMPO
<b>Desnaturalización</b>	94 °C	5 minutos
<b>35 ciclos</b>	Desnaturalización	94 °C
	Alineamiento	60 °C
	Extensión	72 °C
<b>Extensión final</b>	72 °C	5 minutos

Para verificar el tamaño del producto de PCR del gen híbrido se hizo electroforesis en gel de agarosa al 1%, a 100 V durante 40 minutos, la banda correspondiente al tamaño esperado se purificó mediante kit *Zymoclean Gel DNA recovery* (Zymo Research EE.UU.) siguiendo las indicaciones del fabricante, y se cuantificó la concentración de DNA empleando el equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, EE.UU.).

Se realizó la mezcla de topología (tabla 6), y se dejó incubando a 22 °C toda la noche. Al día siguiente se tomó el volumen total de la topología y se

transformaron por choque térmico células competentes de *E. coli* TOP10 comerciales (Invitrogen, EE.UU.); para insertar el vector más el gen híbrido, se plaquearon 100  $\mu$ L de las células transformadas en medio LB agar con espectinomicina (Spc; 100 mg/L) y se incubó a 37 °C durante toda la noche.

Tabla 6 Mezcla de reacción topología

REACTIVOS	CANTIDAD
Agua milli-Q	2.5 $\mu$ L
Solución salina	1 $\mu$ L
Producto de PCR purificado [ $<200$ ng/ $\mu$ L]	2 $\mu$ L
Vector pCR8GWTPOO	0.5 $\mu$ L
Volumen Total	6 $\mu$ L

Posteriormente, con el objeto de verificar que las colonias contienen el plásmido de interés, se tomaron colonias de las obtenidas en placa y se siembran en medio líquido LB con Spc (100 mg/L) se incubaron durante toda la noche a 37 °C

### EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO.

Para la extracción de DNA plasmídico, se colocó el cultivo de *E. coli* (3-5 mL de cultivo) en tubos de microcentrífuga y se centrifugó a 13 000 rpm durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante, este paso se repitió hasta tener empastillado todo el cultivo de la bacteria, se descartó todo el resto de medio de cultivo, posterior a eso la pastilla celular se resuspendió en 100  $\mu$ L de solución de lisis alcalina I (anexo-tabla 13) previamente enfriada a 4 °C, se agregaron 200  $\mu$ L de solución de lisis alcalina II (anexo-tabla 14) se mezcló por inversión; las muestras se mantuvieron en hielo por 10 minutos, y se adicionaron 150  $\mu$ L de la

solución de lisis alcalina III (anexo-tabla15) previamente enfriada a 4 °C el contenido de los tubos se mezcló bien y posteriormente los tubos se colocaron en hielo de 3-5 minutos.

El lisado bacteriano se centrifugó a 13 000 rpm durante 20 minutos, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, se agregó un volumen igual de fenol cloroformo alcohol isoamílico, se mezcló con vortex.

Para separar los restos celulares de los ácidos nucleicos se centrifugaron los tubos a 13 000 rpm por 5 minutos, la fase superior se transfirió a un tubo limpio.

Los ácidos nucleicos se precipitaron al agregar dos volúmenes de etanol y se colocaron a -20 °C durante toda la noche o a -80 °C por una hora, posteriormente se centrifugaron las muestras a 13 000 rpm durante 20 minutos. Se descartó el sobrenadante y se añadió 1 mL de etanol al 70 % para realizar lavado y eliminar el exceso de sales, se centrifugó a 13 000 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se secó la pastilla al fondo del tubo, hasta no tener residuos de etanol.

Se disolvió la pastilla en 30-50 µL de ddH<sub>2</sub>O estéril y se agregó 1 µL de RNasa A (10 mg/mL) y se incubó a 37 °C al menos 30 minutos. Se corroboró integridad de DNA por electroforesis en gel de agarosa al 1%, y se determinó la concentración de DNA con el equipo Nanodrop 2000.

### **VERIFICACIÓN DE INSERTO Y ORIENTACIÓN DEL GEN EN PCR8/TOPO/GW POR RESTRICCIÓN ENZIMÁTICA.**

Para corroborar que el gen de interés estaba clonado en el vector de entrada se realizó la digestión enzimática con *EcoRI*; la digestión con esta enzima liberará al inserto, ya que el gen híbrido está insertado en el vector, flanqueado por sitios *EcoRI*. La otra banda generada correspondería al vector. La mezcla de reacción para la digestión se muestra en la tabla 7.

Tabla 7 Reacción de restricción, verificación de inserto

Reactivos	Cantidad (µL)
Agua milli-Q estéril	5.8
Cutsamrt	1
BSA	1
RNasa A	0.1
Enzima EcoRI	0.1
DNA plasmídico	2
Volumen final de reacción	10

Se incubó a 37 °C por toda la noche, a la mañana siguiente se analizaron los productos de la restricción por electroforesis en gel de agarosa al 1%, a 90 V por 40 minutos, se tomaron como positivas aquellas colonias que presentaron dos bandas de tamaños de 3530 y 2817 pb aproximadamente, que corresponden al inserto y al vector.

De las clonas positivas se realizó el análisis para la selección de aquellas en las que el inserto estuviera correctamente orientado con respecto a los sitios de recombinación L y R, para lo cual se seleccionaron dos enzimas, una que tuviera solo un sitio de restricción en el inserto y no en el vector y otra que cortase una vez en el vector y ninguna en el inserto. En este caso las enzimas seleccionadas fueron *Bam*HI para el corte en el inserto y *Xho*I (anexo-figura1), la mezcla de reacción se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Reacción de restricción verificar orientación

Reactivos	Cantidad (µL)
Agua milli-Q estéril	5.7
Cutsmart	1
BSA	1
RNAsa	0.1
Enzima BamHI	0.1
Enzima XhoI	0.1
DNA plasmídico	2
Volumen de reacción	10

Se incubó a 37 °C por toda la noche, a la mañana siguiente se analizaron los productos de la restricción por electroforesis en gel de agarosa al 1%, a 90 V por 40 minutos, se tomaron como positivas aquellas colonias que presentaron dos bandas de tamaños de 3530 y 2817 pb aproximadamente.

### **SUBCLONACION EN EL VECTOR DE SOBREEXPRESIÓN pB2WG7**

De las clonas correctamente orientadas se seleccionó una y se realizó una restricción para linealizar el vector pCR8/TOPO/GW con el inserto, en este caso se utilizó la enzima *EcoRV*, la mezcla de reacción se enlista en la tabla 9.



Tabla 9 Reacción de linealización

Reactivos	Cantidad ( $\mu\text{L}$ )
Agua milli-Q estéril	5.8
Cutsamrt	2
BSA	2
RNAsa	0.2
Enzima EcoRV	0.2
DNA plasmídico	5
<b>Volumen final de reacción</b>	<b>20</b>

Las muestras se incubaron a 37 °C durante toda la noche, los productos de la digestión se analizaron por electroforesis, en este caso se cortó la banda de interés y se purificó con el sistema comercial *Zymoclean Gel DNA recovery* siguiendo las indicaciones del fabricante, y se midió la concentración en Nanodrop 2000.

Para la reacción de clonación, se colocó el vector pCR8/TOPO/GW-gen híbrido linealizado y el vector pB2WG7 en una proporción 2:1 respectivamente de acuerdo con la concentración ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ ), en la tabla 10 se muestran las cantidades de cada reactivo.

Tabla 10 Reacción de LR Clonasa

Reactivos	Cantidad ( $\mu\text{L}$ )
Buffer TE pH 8	1.5
pCR8/TOPO/GW-GEN HÍBRIDO [100 $\text{ng}/\mu\text{L}$ ]	2
pB2WG7 [100 $\text{ng}/\mu\text{L}$ ]	1
LR Clonasa	0.5
<b>Volumen Total</b>	<b>5</b>

Después de incubar a 22 °C por toda la noche, el producto de la reacción se introdujo por transformación en células competentes de *E. coli* Top 10 comerciales por choque térmico, y se sembraron en placas de agar LB con Spc, se picó colonia y se realiza miniprep.

Para corroborar las colonias positivas a pB2WG7+gen-híbrido, se realizó PCR punto final, de las clonas positivas se selecciona una para la transformación de *A. tumefaciens*.

### **INSERCIÓN DE pB2WG7+GEN-HÍBRIDO EN *A tumefaciens*.**

La cepa de *A. tumefaciens* que se utilizó fue AGL1, la cual se caracteriza por la sobreexpresión de los genes VIR D y VIR E; a células electrocompetentes de esta bacteria se les insertó por choque térmico el vector de sobreexpresión pB2WG7+gen-híbrido se plaqueó en agar LB con Spc:Cb:Km (70:70:30) se incubaron a 28 °C de 3 a 4 días. Se picó colonia y se realiza extracción de DNA plasmídico.

El inserto se corrobora por PCR punto final del gen híbrido así como del gen bar, las mezclas de reacción de PCR para cada gen se realizaron de acuerdo con la tabla 4 y las condiciones de amplificación del gen híbrido de la delta-endotoxina se describen en la tabla 5 y en la caso del gen bar se describen a continuación en la tabla 11 las condiciones de amplificación, mientras que en la tabla 12 la secuencia de los oligonucleótidos del gen bar,

Tabla 11 Programa de amplificación por PCR del gen BAR.

<b>PASO</b>		<b>TEMPERATURA</b>	<b>TIEMPO</b>
<b>Desnaturalización</b>		94 °C	3 minutos
<b>35 ciclos</b>	Desnaturalización	94 °C	30 segundos
	Alineamiento	60 °C	30 segundos
	Extensión	72 °C	40 segundos
<b>Extensión final</b>		72 °C	3 minutos

Tabla 12 Secuencia de oligonucleótidos gen bar

Nombre	Secuencia
Oligonucleótido 5'	ATGCCAGTTCCTGCTTGAAGCCGGC
Oligonucleótido 3'	TCAACTCGATCGAGGGGATCTACCATG

Las colonias positivas se crecieron en agar con Spc:Cb:Km (100:100:50 mg/L) para posteriormente hacer cultivo líquido de una colonia y realizar la expresión transitoria del gen en la construcción deseada y la transformación de algodón.

Tanto las cepas de *E. coli* como las de *A. tumefaciens* que contienen plásmidos seleccionados se conservaron en glicerol al 50 %

## **EXPRESIÓN TRANSITORIA DE GEN-HÍBRIDO DE DELTA-ENDOTOXINA.**

### **CRECIMIENTO PLANTAS DE *Nicotiana benthamiana***

Para la expresión transitoria del gen híbrido se utilizaron plantas de *Nicotiana benthamiana*, para hacerlas crecer primero se colocaron en dH<sub>2</sub>O a 4 °C durante tres días para quitarles el estado de dormancia, posteriormente se sembró cada una en macetas con suelo, se regaron con solución de nutrientes, se colocaron en cámara de crecimiento en fotoperiodo 16 horas luz 8 horas oscuridad a 22 °C por dos semanas hasta observar los primeros brotes, posteriormente se llevaron a invernadero para que crecieran, se regaron con solución de nutrientes, hasta que las plantas alcanzaron una edad de 8-9 semanas, con desarrollo visible de hojas.

### **AGROINFILTRACIÓN DE *A. tumefaciens* EN HOJAS DE *N. benthamiana***

La cepa de *A. tumefaciens* AGL1 que contiene el pB2WG7+gen-híbrido, se sembró en agar LB con Spc:Cb:Km, (100:100:50), se dejó crecer de 2-3 días a 28

°C, posteriormente se seleccionó una colonia, se picó e inoculó en 50 mL de medio LB con la misma concentración de antibióticos a 28°C, 200 rpm por 36 h.

Cuando la bacteria estuvo crecida se centrifugó a 3 500 rpm a 4 °C durante 20 minutos, para concentrarla, posteriormente se resuspendió la pastilla celular en 50 mL de medio de agroinfiltración (anexo-tabla 11). Se dejó en incubación por 3 horas, a 28 °C sin agitación.

Para inocular *N. benthamiana*, con la ayuda de una jeringa sin aguja que ya contenía el medio de inoculación con *A. tumefaciens* AGL1 se perforó suavemente cada una de las hojas de *N. benthamiana* y cuidadosamente se vació el contenido de la jeringa en las hojas, y se observó como la hoja fue llenándose del medio de cultivo poco a poco, hasta quedar una mancha en toda la hoja. Con un marcador indeleble se marcó el área en donde se colocó el medio de cultivo. Las plantas se cubrieron con plástico adherente delgado por 16 horas y se dejaron en cámara de crecimiento en fotoperiodo 16 horas luz 8 oscuridad. Se tomaron muestras del tejido en donde se inoculó la bacteria a las 24, 48, 72, 96 y 120 horas, a cada muestra se le extrajo RNA total para el análisis de la expresión del RNA mensajero del gen híbrido.

### **EXTRACCIÓN DE RNA DE TEJIDO DE *N. benthamiana* agroinfiltrado.**

Para la extracción de RNA de cada una de las muestras de tejido de *N. benthamiana* se realizó con el *kit Direct-zol™ RNA MiniPrep*, de 100 mg de tejido. De las muestras se determinó la concentración de RNA y se verificó su integridad por electroforesis en gel de agarosa al 1.2 %.

### **SINTESIS DE cDNA.**

Para realizar la determinación de la expresión transitoria de la delta-endotoxina en *N. benthamiana* se realizó la síntesis de cDNA a partir de RNA. Las muestras de

RNA se ajustan a 100 ng/μL, posteriormente se realizó la mezcla descrita en la tabla 13.

Tabla 13. Primera reacción para síntesis de cDNA

REACTIVO	CANTIDAD
RNA 10 ng/μL	1 μL
Oligonucleótido dtGAGA 10 mM	1 μL
Oligonucleótido SmartGGG 10 mM	1 μL
H <sub>2</sub> O	5 μL
<b>Volumen total</b>	8 μL

Se dejó incubar por 5 minutos a 92 °C, posteriormente las muestras se colocaron en hielo por 5 minutos más y posteriormente se agregaron 12 μL de la mezcla de reacción; la composición se describe en la tabla 14.

Tabla 14 Segunda reacción de síntesis de cDNA

REACTIVO	CANTIDAD
Buffer 5X de SSIII	2 μL
dNTps 10 mM	1 μL
DTT 0.1 mM	1 μL
RNAsin OUT	0.2 μL
Reverso Transcriptasa SSIII	0.2 μL
H <sub>2</sub> O	7.6 μL
<b>Volumen total</b>	12 μL

Se incubó por 2 horas a 72 °C para la síntesis de cDNA. Para corroborar integridad del cDNA sintetizado, las muestras se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.2 %, además se realizó amplificación por PCR punto final de los genes tanto endógeno como exógeno.

**RT-PCR PARA LA DETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN TRANSITORIA EN *N. benthamiana* DEL GEN HÍBRIDO DE LA DELTA-ENDOTOXINA.**

La detección del RNAm del gen híbrido en *N. benthamiana* se realizó con el equipo StepOne Plus™. El molde correspondió a las muestras de cDNA; la reacción de PCR en tiempo real se realizó usando *Taq platinum* marca (Invitrogen), así como las sondas y oligonucleótidos específicos para el gen híbrido y el gen endógeno COX (citocromo oxidasa).

Tabla 15. Mezcla de reacción dúplex para RT-PCR

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad 1X</b>
Agua MiliQ estéril	2.8 µL
Buffer 5X <i>Taq platinum</i>	1.25 µL
MgCl <sub>2</sub>	1.5 µL
dNTP's	0.6 µL
Oligonucleótido 5' de gen-híbrido	0.75 µL
Oligonucleótido 3' gen-híbrido	0.75 µL
Sonda de gen-híbrido	1.5 µL
Oligonucleótido 5' gen COX	0.75 µL
Oligonucleótido 3' gen COX	0.75 µL
Sonda gen COX	1.5 µL
ROX	0.25 µL
<i>Taq Platinum</i>	0.1 µL
cDNA	1 µL
<b>Volumen de reacción</b>	<b>12.5 µL</b>

El programa de amplificación se describe en la tabla siguiente:

Tabla 16. Programa de amplificación para RT-PCR

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclo
Desnaturalización	95°	5 seg	40
Alineación y extensión	66°	20 seg	
Disociación (Melt-Curve)	La indicada por el equipo		

Las secuencias de los oligonucleótidos y sonda tanto para el gen híbrido y el gen endógeno COX se describen en las tablas 17 y 18 respectivamente.

Tabla 17. Secuencia de oligonucleótidos y sonda para gen híbrido

Nombre	Secuencia 5'-3'
Oligonucleótido 5'	CTTCACCACCCCCTTCAACTT
Oligonucleótido 3'	GCGGGCACGAACTCGAT
Sonda gen-híbrido	CACGTGTTCAACAGCGGCAACGA

Tabla 18. Secuencia de oligonucleótidos y sonda para el gen endógeno COX

Nombre	Secuencia
Oligonucleótido 5'	GTATGCCACGTCGCATTCCAGA
Oligonucleótido 3'	GAATGCCCTTAGCAGTTTTGGC
Sonda COX	CCAGATGCTTACGCTGG

## TRANSFORMACIÓN DE ALGODÓN CON *A. tumefaciens* CEPA AGL1

### REGENERACIÓN Y SELECCIÓN DE PLANTAS GENÉTICAMENTE MODIFICADAS

La metodología para la transformación de las plantas de algodón se divide en 4 pasos, mismos que se describen a continuación:

- Obtención de embriones.

- Agroinfección de embriones.
- Co-cultivo de embriones.
- Regeneración y selección de plantas transformadas.
- Enraizamiento de plantas seleccionadas y regeneradas.

## **OBTENCIÓN DE EXPLANTES DE MERISTEMO DE EMBRIONES DE ALGODÓN**

Una de las formas de transformar y regenerar plantas en un corto periodo de tiempo es mediante la transformación de meristemos obtenidos a partir de embriones de semillas de algodón, para ello en este proyecto se buscó que la bacteria *A. tumefaciens* infectara la zona meristemática de los embriones, con el fin de transferir el gen de la delta-endotoxina de *B. thuringiensis*.

En el laboratorio se cuenta con una variedad de algodón criollo del sureste del país, de la que se tomaron 100 semillas, se les retiró el exceso de fibra de algodón que tuviesen y se lavaron con agua corriente, posteriormente se colocaron en solución de cloro comercial al 10 % por 10 minutos en agitación suave, en campana de flujo laminar se enjuagaron 4 veces con agua destilada estéril, y se dejaron en medio de desinfección (Anexo-tabla 5) a 25°C durante toda la noche en agitación (100 rpm) para ablandar la testa.

Al día siguiente en campana de flujo laminar las semillas se enjuagaron 2 veces con agua estéril. Sin permitir que se secan, se retiró la testa de cada una de las semillas, tratando de no maltratar la parte meristemática de los embriones. Los explantes se colocaron en cajas Petri con papel filtro humedecido con medio de inoculación (Anexo-tabla 6) por 24 horas en cámara de crecimiento a 25°C para permitir que los cotiledones se despegaran del hipocótilo y así facilitar la remoción de los mismos. Al día siguiente en zona de esterilidad, con ayuda de un estereoscopio y bisturí, se retiran cuidadosamente los cotiledones dejando libre la parte meristemática de los embriones, se colocaron en papel filtro humedecido con 3 mL de medio de inoculación para evitar que se deshidraten.



## AGROINFECCIÓN Y CO-CULTIVO DE EXPLANTES DE MERISTEMO.

A la par que se comenzó a trabajar con la obtención de embriones también se comenzó la preparación de *A. tumefaciens* AGL1 con el plásmido pB2WG7+gen-híbrido. La bacteria se sembró en agar LB con antibióticos Spc:Cb:Km (100:100:80) para selección y dejándola crecer por 2 o 3 días, posteriormente de las colonias crecidas se tomó una colonia y se inocularon 100 mL de medio LB líquido con antibióticos Spc:Cb:Km (100:100:80) y se incubaron a 28 °C a 200 rpm durante 28 horas.

Cuando la bacterias estuvo crecida se midió absorbancia a 660 nm, cuando se encontró en un rango de 0.5 a 0.8, se centrifugó a 3 500 rpm durante 20 minutos a 4 °C, el pellet se resuspendió en medio de co-cultivo ajustando la concentración de bacteria a 0.3 de absorbancia.

Los explantes de meristemo se colocaron en el medio de inoculación con *A. tumefaciens* y se pusieron en sonicación de 3-5 minutos (solución tritón 0.1%), se colocaron en incubación con agitación ligera durante 15 minutos a 28°C. Después se dejaron en papel absorbente estéril para retirar el exceso de medio, posteriormente se colocaron 10 explantes en cada caja Petri que contenía papel filtro humedecido con 2.5 mL de medio de co-cultivo, se selló cada una de las cajas y se dejó en cámara de crecimiento a 25°C en fotoperiodo 16 horas luz 8 horas oscuridad, de 3 a 5 días.

Después del periodo de co-cultivo fue necesario retirar la bacteria de los explantes; para ello se transfirieron a medio sólido de inducción de brotes con antibióticos (anexo-tabla 7), previamente enjuagados en medio de co-cultivo adicionado con antibiótico (Cb, Cf, y Tm 100:100:50), contenido en cajas magenta, una vez cerradas y selladas se colocan en cámara de crecimiento con fotoperiodo de 18 horas luz y 6 horas oscuridad a una temperatura de 28 °C, por un periodo de 3-5 días.

## SELECCIÓN Y REGENERACIÓN DE PLANTAS TRANSFORMADAS

Los brotes o plántulas crecidas en medios con antibiótico (antibióticos que inhiben el crecimiento de AGL1 en las plantas) se transfirieron a medio de selección (anexo-tabla 8) con solución de sales de MS con vitaminas de B5 adicionado con glufosinato de amonio (concentración de 5 mg/L),, por lo que las plantas que desarrollaron hojas verdaderas en un tiempo de 4 semanas se tomaron como posibles positivas de transformación.

Terminado este periodo se pasó cada uno de los explantes a medio de enraizamiento (anexo-tabla 9). Durante 4 semanas se mantuvo en cámara de crecimiento a 25 °C, con fotoperiodo hasta que las plantas presentaran raíces crecidas en el medio, y cuando presentaron raíces desarrolladas las plantas se transfirieron a suelo (arcilla, arena y turba (peat moss) 1:1:1) para su crecimiento, colocándolas en cámara de crecimiento cubiertas con plástico transparente por una semana en cámara de crecimiento para permitir la adaptación, y mantener humedad constante en cada planta.

Las plantas se mantuvieron en cámara de crecimiento por 3 semanas y posteriormente se llevaron a invernadero en donde se riegan cada tercer día con solución de nutrientes marca *Miracle Grow*.

## **CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PLANTAS TRANSFORMADAS**

### **EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO DE TEJIDO DE PLANTAS DE ALGODÓN**

#### **Método empleando CTAB**

De las plantas GM regeneradas y en suelo se tomaron 100 mg de tejido y se colocó en un tubo de microcentrífuga de 2 mL para macerarlo con N<sub>2</sub> líquido, se añadieron 500 µL de buffer de extracción CTAB (anexo-tabla 15) previamente calentado, se mezcló y se incubó a 65°C de 20-30 min, para posteriormente dejar enfriar a temperatura ambiente y agregar 1 volumen de fenol cloroformo alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló por inversión y centrifugó a 13,000 rpm durante 10 minutos para separar las fases y transferir la fase superior a un tubo nuevo, se agregaron 500 µl de CTAB previamente calentado a 65 °C, dejándolo incubar 15 min a esa misma temperatura; se dejó enfriar a temperatura ambiente y se adicionó un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico, se mezcló por inversión y se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 minutos. Después se tomó la fase acuosa y se transfirió a un tubo limpio; para la precipitación del ADN se agregaron 0.7 volúmenes de isopropanol, y las muestras se colocaron a -20°C durante toda la noche para precipitar el DNA. Al día siguiente las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm durante 20 minutos y se desechó el sobrenadante. Para lavar el DNA y para retirar el exceso de sales se realiza un lavado con 1 mL de etanol al 70%, se centrifugó a 13 000 rpm durante 5 minutos y se retiró el sobrenadante hasta dejar la pastilla de DNA completamente seco, para posteriormente resuspenderlo en agua grado biología molecular.

Para la cuantificación del ADN se analizó por espectrofotometría en Nanodrop 2000 y la integridad de cada una de las muestras se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

## PCR PUNTO FINAL PARA LA IDENTIFICACION DEL GEN HÍBRIDO DE LA DELTA-ENDOTOXINA.

Para corroborar la presencia del gen híbrido de la delta-endotoxina se realizó amplificación por PCR de un fragmento de 1400 pb la mezcla de reacción es la misma que se describe en la tabla 4 y el programa de amplificación es el que se muestra en la tabla 19 y los oligonucleótidos utilizados se muestran en la tabla 20.

Tabla 19. PCR punto final, detección del gen en plantas transformadas

PASO		TEMPERATURA	TIEMPO
Desnaturalización		94 °C	3 minutos
35 ciclos	Desnaturalización	94 °C	30 segundos
	Alineamiento	66 °C	30 segundos
	Extensión	72 °C	1.5 minutos
Extensión final		72 °C	3 minutos

Tabla 20. Oligonucleótidos gen híbrido (1400 pb)

NOMBRE	SECUENCIA
MBT-FOR	CTTCACCACCCCCTTCAACTT
FBT-REV	TTGAAGTCGCCGTTCTTGATC

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%. De las plantas positivas también se realizó una amplificación del gen bar con las mezclas de reacción y condiciones ya descritas en las tablas 4 y 11, respectivamente.

## DETERMINACION DEL NÚMERO VARIABLE DE COPIAS DEL GEN HÍBRIDO EN EL GENOMA DE LAS PLANTAS DE ALGODÓN.

La determinación del número de copias que la bacteria *A. tumefaciens* pudo insertar en las plantas de algodón genéticamente transformadas se realizó mediante la técnica de “droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR)” o PCR digital con el equipo de marca comercial QX100™ Droplet Digital™ PCR System (BioRad, Foster City CA). Para la mezcla de reacción se siguen las indicaciones del fabricante del equipo y de los reactivos que provee dicha marca.

Para dicho experimento se utilizó DNA genómico de las plantas GM digerido con la enzima de restricción *EcoRI* por una hora a 37 °C, los oligonucleótidos y sonda utilizados para el gen híbrido se describen en la tabla 17 y el gen endógeno utilizado en algodón es SADI , el cual tiene dos copias por genoma haploide de algodón. El algodón es tetraploide, los oligonucleótidos y sondas del gen SADI se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 21 Secuencias de oligonucleótidos y sondas del gen SADI

NOMBRE	SECUENCIA
SADI-FOR	CCAAAGGAGGTGCCTGTTCA
SADI-REV	TTGAGGTGAGTCAGAATGTTGTTC
SADI-PROBE	TCACCCACTCCATGCCGCCTCACA

Como primer paso se deben generar las gotas para la cuantificación del número de copias, para ello la mezcla de reacción que además ya contiene la muestra del DNA genómico digerido con *EcoRI*, se colocan en una placa diseñada específicamente para el generador de gotas, en presencia de aceite.

Posteriormente cuando las gotas han sido generadas se colocan en la placa adecuada, y para el posterior análisis se sella y la placa se coloca a su vez en termociclador para hacer correr el programa de PCR que se describe a continuación

Tabla 22. Programa de amplificación ddPCR.

		TEMPERATURA	TIEMPO
<b>Activación</b>		95 °C	10 minutos
<b>40 ciclos</b>	Desnaturalización	94 °C	30 segundos
	Alineamiento y extensión	60 °C	1 minuto
<b>Inactivación</b>		98 °C	10 minutos

Posteriormente la placa se coloca en el lector de gotas para que los datos sean analizados.

Para calcular la cantidad de DNA que se necesita por gota ( $m$ ) que se debe utilizar para la reacción se utiliza la siguiente formula:

$$m = \text{genoma de algodón} \times 1.096 \times 10^{-21} \text{pb}$$

Se considera que la cantidad de DNA calculado en la formula anterior es para un genoma haploide, algodón es una planta tetraploide y con un tamaño de  $2401 \times 10^6$  pb (Hendrix & Stewart, 2005; Fuguang *et al*, 2014).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### UNIDAD DE EXPRESIÓN DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA DELTA-ENDOTOXINA CON MARCADOR DE SELECCIÓN RESISTENCIA A HERBICIDA.

Hoy día con las nuevas tecnologías en el ámbito de la genética y la biología molecular es posible la expresión de heteróloga de proteínas, es decir la expresión de proteínas en un organismo en el cual de manera natural no se expresa, tal es el caso de las proteínas Cry que produce *B. thuringiensis*, conocidas también como delta-endotoxinas, que se expresan en cultivos de interés agrícola como el maíz, el arroz, la papa, soya con el fin de conferirles resistencia a insectos plaga que ataquen a dichas plantas (Gutierrez-Galeano *et al.*, 2015).

Para ello se llevó a cabo el aislamiento, la amplificación y la manipulación in vitro del gen para insertarlo después en el genoma de algodón. En cuanto a la manipulación in vitro del gen podemos referirnos al cambio en el uso de codones, de *B. thuringiensis* a plantas, para que el gen se exprese eficientemente en la planta, así como a la unión del gen de interés a un promotor que permita la adecuada expresión del gen en la planta (Anklam *et al.*, 2002; Ganesan *et al.*, 2009; Gutierrez-Galeano *et al.*, 2015).

El promotor CaMV 35S es comúnmente usado en la expresión de genes en planta principalmente en dicotiledóneas, este promotor fue aislado del virus de mosaico de coliflor; además es un promotor fuerte y constitutivo, es decir, que permite la expresión del gen en todos los tejidos de las plantas incluyendo frutos y raíces, además de que no necesitan de una activación para su expresión (Anklam *et al.*, 2002; Rasul *et al.*, 2013).

Para el caso del algodón Bt, el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (35S CaMV) es uno de los más utilizados para la expresión de genes en plantas, por las razones ya espuestas (Anami *et al.*, 2013; Ganesa *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2013; Bajwa *et al.*, 2014). Por ello en este trabajo se planteó la expresión del gen

híbrido bajo la regulación de dicho promotor y del terminador 35S. Además, se consideró conferirle resistencia al herbicida glufosinato de amonio, que hace tolerante a la planta frente a este químico. Esto permitió seleccionar en cultivo in vitro aquellas plantas transformadas genéticamente es decir, que tienen en su genoma el gen bar, dicho gen codifica para una enzima que degrada PPT o glufosinato de amonio, lo que impide que las plantas mueran por una acumulación de amonio en sus tejidos (Anami *et al.*, 2013; Gutierrez-Galeano *et al.*, 2015).

Los elementos genéticos descritos fueron clonados en un vector de sobreexpresión en plantas. En los últimos años se ha empleado la tecnología de clonación GATEWAY, la cual mediante la recombinación mediada por enzimas que reconocen los sitios *attL* y *attR* (recombinasas; nombre comercial clonasa) puede intercambiar el gen de interés de un vector de entrada con el un vector destino, en este caso el vector de sobreexpresión que ya contiene el promotor y terminador 35S (el gen de interés se posicionará en medio de estas dos unidades), y el gen bar (Anami *et al.*, 2013).

A continuación se muestra en la figura 12 la obtención del gen híbrido por PCR punto final, con la enzima Taq *Takara*, la cual es capaz de colocar en el extremo 3' del fragmento de PCR a una adenina (A) útil para la ligación de este al vector de entrada pCR8/TOPO/GW, que contiene una T en el extremo complementario.

M.- Marcador 1 kb

1.- muestra 1

2.- muestra 2

3.- muestra 3

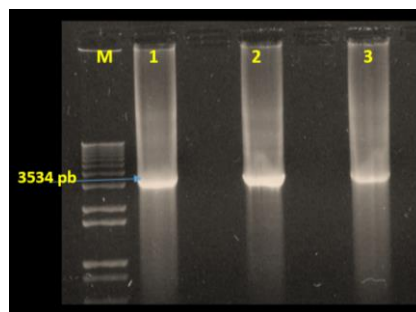


Figura 12. PCR punto final gen-híbrido de la delta-endotoxina



Después de la reacción de topología y la obtención de las clonas positivas, y el correspondiente análisis de restricción, se comprobó la presencia del gen híbrido en una de las clonas recombinantes al observar un patrón de bandeado esperado de 3534 pb y 2817 pb (figura 13).

M. marcador

- 1.- Muestra uno (vector vacío)
- 2.- Muestra dos (vector vacío)
- 3.- Muestra tres (vector vacío)
- 4.- Muestra cuatro POSITIVO

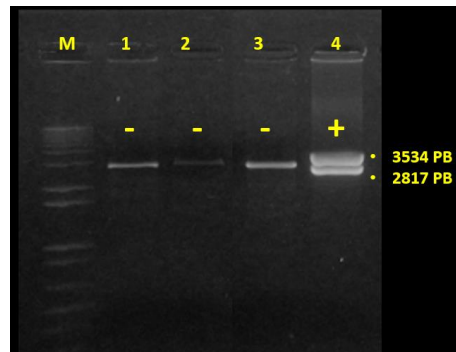


Figura 13. Patrón de restricción de las clonas candidatas.

En el carril 4 se muestra con un símbolo + a la clona con el gen insertado. El DNA se digirió con la enzima de restricción EcoRI

Para la única clona positiva se realizó el análisis de restricción para corroborar la orientación correcta del gen en el vector de entrada con las enzimas *Bam*HI-*Xho*I, (figura 14) si el inserto estaba en sentido correcto el patrón de bandeado era uno de 4253 pb y el restante de 2098 pb.

M.- Marcador 1 kb

- 1.- Plásmido digerido *Bam*HI-*Xho*I
- 2.- Plásmido sin digerir

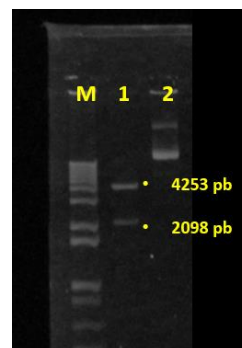


Figura 14. Patrón de restricción para verificar orientación de inserto. En el carril 1 se muestra la digestión en orientación correcta.

Con el inserto en correcta sentido con respecto al promotor 35S y el terminador 35S en el vector de destino, el vector se linealizó por digestión enzimática con *EcoRV* (figura 15) se observó una sola banda de 6351 pb, se cortó y purificó, para llevar a la reacción de clonasa.

M.- Marcador 1 kb  
 Plásmido linealizado  
 PCR8/TOPO/GW+Gen híbrido

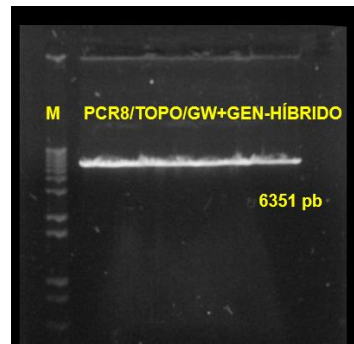


Figura 15 Patrón de restricción para verificar linealización de vector PCR8/TOPO/GW

Posterior a la reacción de clonasa, y la extracción de DNA plasmídico de las colonias seleccionadas con el posible vector de sobreexpresión, la presencia del gen-híbrido en el vector de sobreexpresión pB2WG7 se realizó por PCR punto final, para amplificar el gen-híbrido. En la figura 16 se muestran las clonas positivas.

M.- Marcador 1 kb  
 1.- Control negativo  
 2.- Control positivo  
 3.- Muestra 1  
 4.- Muestra 2  
 5.- Muestra 3  
 6.- Muestra 4  
 7.- Muestra 5  
 8.- Muestra 6  
 9.- Muestra 7  
 10.- Muestra 8

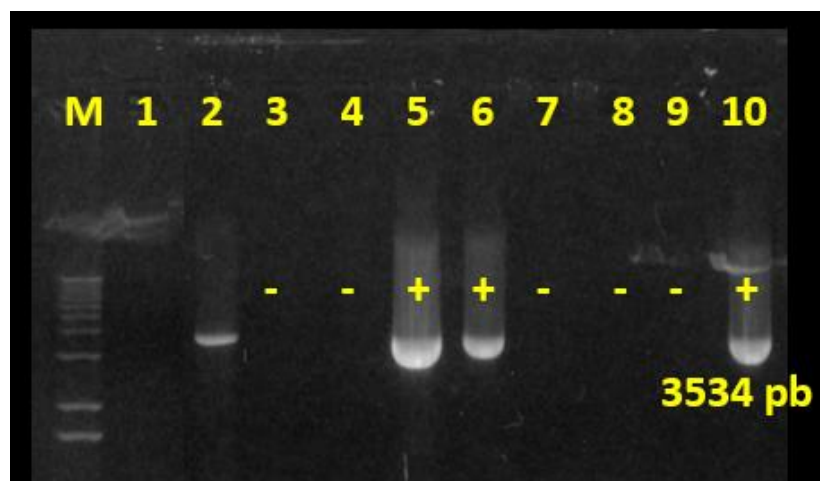


Figura 16. Electroforesis, PCR punto final del gen-híbrido en pB2WG7

Además, para corroborar que el gen se encuentra antecedido del promotor 35S CaMV se realizó una reacción de PCR punto final, utilizando el oligonucleótido 5' del promotor 35S (5' GACTAGAGCCAAGCTGATCTCCTTTGCC 3') y el oligonucleótido reverso del terminador 35S (5' ACATGAGCGAAACCCTATAAGAAC 3'). La banda esperada tuvo un tamaño de 5000 pb (figura 17).

- M.- Marcador 1kb
- 1.- control negativo
- 2.- control positivo

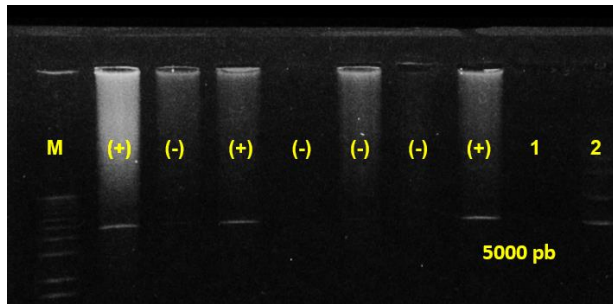


Figura 17 Amplificación por PCR punto final de promotor 35S a terminador 35S

Con los resultados de las PCRs anteriores se seleccionó una de las clonas positivas y se empleó el DNA plasmídico para realizar la inserción *A. tumefaciens* AGL1 por electroporación.

De las colonias crecidas en medio LB con antibióticos de selección, y después de realizar miniprep, se corroboró la presencia del gen híbrido en *A. tumefaciens* y el gen bar por PCR punto final, las bacterias positivas para el gen-híbrido y el gen bar se muestra en las figura 18 y figura 19, respectivamente donde se muestran los resultados de la electroforesis.

- M.- Marcador 1 kb
- 1.- Control negativo
- 2.- Control positivo
- 3.- Muestra 1
- 4.- Muestra 2
- 5.- Muestra 3
- 6.- Muestra 4
- 7.- Muestra 5
- 8.- Muestra 6
- 9.- Muestra 7
- 10.- Muestra 8

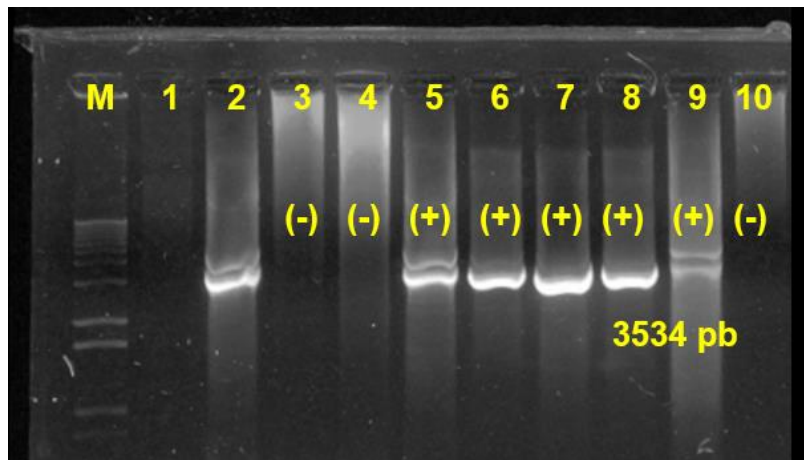


Figura 18. Electroforesis, PCR punto final de gen-híbrido en *A. tumefaciens*

- M.- Marcador 1 kb
- 1.- Muestra 1
- 2.- Muestra 2
- 3.- Muestra 3
- 4.- Muestra 4
- 5.- Control negativo
- 6.- Control positivo

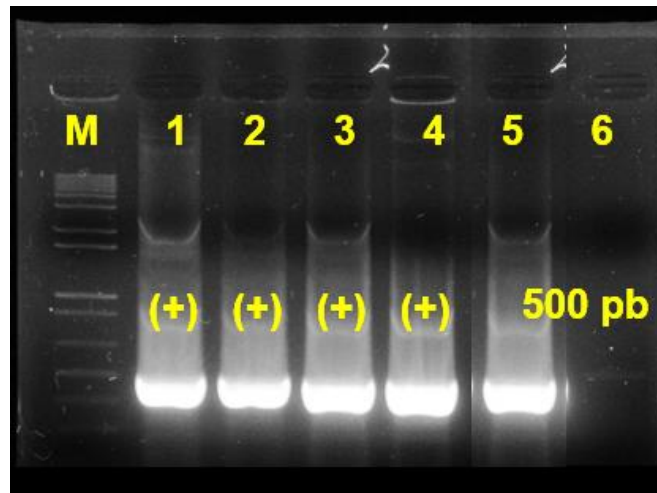


Figura 19. Electroforesis PCR punto final de gen bar en *A. tumefaciens*

*A. tumefaciens* es una bacteria capaz de transferir información genética a las plantas que infecta, se ha empleado ampliamente para la transformación de plantas cotiledóneas y con más reciente investigaciones a nuevas especies vegetales y/o plantas monocotiledóneas, esto gracias a una compleja maquinaria que le permite transferir un segmento de DNA al genoma de la planta. Este proceso es complejo, en el que intervienen productos de los genes de virulencia de la bacteria, así como genes de organismo receptor. Por ingeniería genética se han generado cepas hipervirulentas que sobreexpresan los genes que realizan la transferencia, lo que le confieren a esta bacteria una mayor eficiencia de transformación (Valderrama *et al.*, 2005).

La cepa AGL1 de *A. tumefaciens* que se utilizó en este trabajo sobreexpresa los genes *VirD* y *VirE*, proteínas que ayudan a la producción del T-DNA y se unen a él, formando en conjunto un complejo de transferencia del segmento de T-DNA sintetizado por la bacteria (Valderrama *et al.*, 2005).

Bakhsh y colaboradores en 2014 hicieron pruebas para comparar diferentes tipos de cepas de *Agrobacterium* y reportaron un porcentaje de regeneración del 8.3% en plantas de tabaco transformadas con la cepa AGL1 (Bakhsh *et al.*, 2014).

## **EXPRESIÓN TRANSITORIA DEL GEN HÍBRIDO DE DELTA-ENDOTOXINA**

Una de las formas de corroborar si las modificaciones previas realizadas al gen son viables para la expresión en planta es evaluar mediante expresión transitoria las construcciones en plantas modelo. En este trabajo utilizamos como planta modelo a *N. benthamiana*, con el fin de buscar la presencia del mRNA del gen-híbrido.

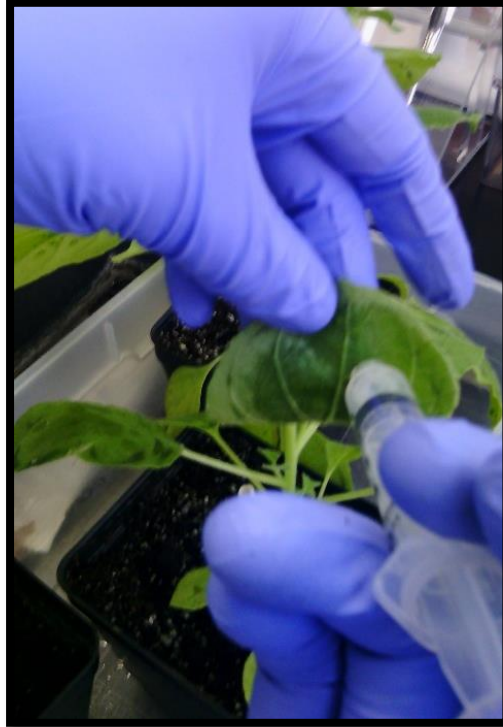


Figura 20 Inoculación de *A. tumefaciens* AGL1 en hojas de *N. benthamiana*

Se realizó una cinética de expresión del gen-híbrido a las 24, 48, 72, 96 y 120 horas después de la inoculación de la bacteria en las hojas. Posteriormente se detectó el RNAm mediante RT-PCR (empleando sondas Taqman). Se observó la expresión del mRNA a partir de las 24 horas (figura 20 y 21) posteriores a la inoculación, un tiempo más corto comparado con el trabajo reportado por Mehmood y colaboradores en 2013, quienes evaluaron la expresión de una nueva proteína Cry2Ab, bajo el promotor 35S. Ellos reportan la presencia de mRNA hasta las 72 horas. Con estos resultados nosotros podemos entonces asumir que la proteína puede ser expresada en planta debido a una correcta expresión de éste a partir de las secuencias de regulación seleccionadas y el cambio de codones realizado, se toma al gen COX como gen endógeno (figura 22)

M.- Marcador 1 kb  
 (-) control negativo  
 WT.- *N. benthamiana* WT  
 24.- muestra a las 24 h  
 48.- muestra a las 48 h  
 72.- muestra a las 72 h  
 96.- muestra a las 96 h  
 120.- muestra a las 120 h  
 (+) control positivo



Figura 21. RT-PCR de mRNA de gen híbrido, expresado en *N. benthamiana* (Tamaño esperado: 100 pb).

M.- Marcador 1 kb  
 (-) control negativo  
 (+) control positivo  
 24.- muestra a las 24 h  
 48.- muestra a las 48 h  
 72.- muestra a las 72 h  
 96.- muestra a las 96 h  
 120.- muestra a las 120 h

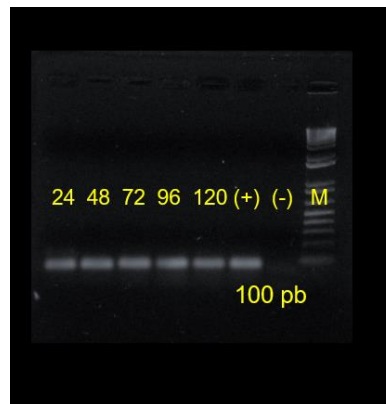


Figura 22. RT-PCR de gen endógeno COX

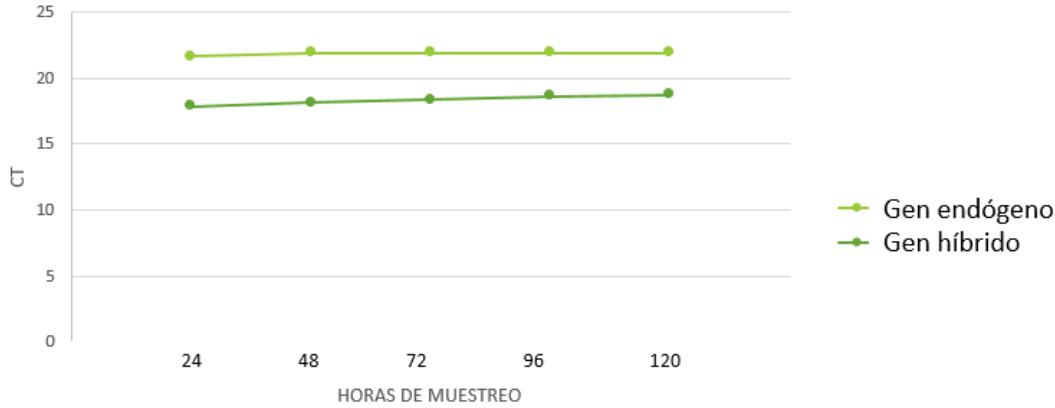


Figura 23. Detección del gen-híbrido por RT-PCR

### TRANSFORMACIÓN DE ALGODÓN MEDIANTE *A. tumefaciens*.

Para la transformación de algodón ya se han desarrollado y publicado diversos protocolos, principalmente basados en *A. tumefaciens*. La planta de algodón fue uno de los primeros cultivos en los que se aplicó la transformación genética mediada por dicha bacteria (Baohong 2013).

La eficiencia de la transformación de las plantas, así como la regeneración de las mismas depende además del tejido con el que se esté trabajando, y de las condiciones con las que se lleve a cabo el cultivo. Los primeros ensayos en co-cultivo de *A. tumefaciens* se realizaron en explantes de hipocotilo y cotiledones, mediante embriogénesis somática; sin embargo, el porcentaje de regeneración de plantas se vio afectado por limitaciones como el largo periodo en el que se lleva a cabo la completa regeneración de la planta, además de que el cultivo de tejidos puede inducir baja fertilidad y defectos en el desarrollo de las plantas. (Rajasekaram *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2013).



Al ser entonces el cuello de botella la selección el tejido adecuado para la transformación de plantas de algodón, varios grupos de investigación reportan el uso de diferentes tejidos para la obtención de plantas transformadas y también lograr que la progenie proveniente de estas posea los genes de interés. Chen y colaboradores en 2013 desarrollaron una nueva metodología para la transformación de plantas de algodón, el cual consiste en trabajar con explantes de meristemo de embriones de las semillas de algodón inoculando directamente a *A. tumefaciens* en los explantes, logrando la regeneración de plantas y el análisis de las plantas regeneradas así como su progenie demostrando que los genes de interés estaban integrados de manera estable en el genoma y que podían ser heredados mendelianamente.

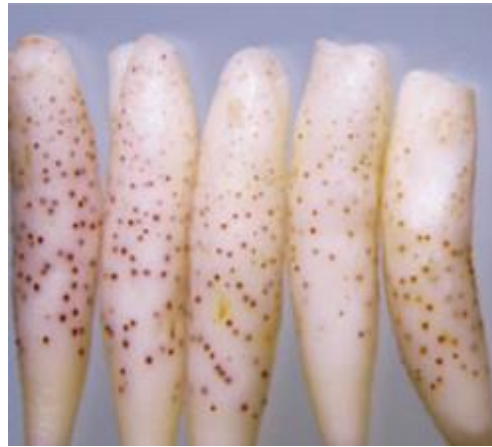


Figura 24. Meristemos de embriones de algodón  
Tomado de Chen *et al.*, 2013

Con base en lo reportado por Chen y colaboradores en 2013, nosotros tomamos 100 semillas de algodón, las desinfectamos y obtuvimos los embriones, a los que les retiramos los cotiledones dejando listo el meristemo para transformar (figura 25).



Figura 25. Obtención de meristemos de embriones de algodón  
A) Embrión de algodón; B) embriones de algodón hidratados; C) Explante listo para el co-cultivo con *A. tumefaciens*.

En el mismo protocolo descrito por Chen y colaboradores, se describen las condiciones de crecimiento que necesita la planta, factores de vital importancia como lo son: la temperatura de incubación en el co-cultivo de 35 °C, sin embargo, debido a que *Agrobacterium* crece a 28 °C, decidimos emplear esta temperatura. Bajwa y colaboradores en 2014 reportaron que incubaron a una temperatura de 25 °C ± 2°C, que resultó efectiva para la transformación de algodón. Para la selección del medio de cultivo se utilizaron las sales del medio MS (Murashige & Skoog, 1962) y la mezcla de vitaminas del medio B5, diferente a lo reportado por Chen, ya que ellos ocuparon tanto sales como vitaminas de B5. Esto debido a que el medio a los 4 o 5 días posteriores al pase de los explantes comenzaba a tornarse amarillento, lo que indica la oxidación de los componentes y con ello la afectación de los explantes en este medio. La concentración de glucosa utilizada fue de 30 g/L como lo reporta Chen, ahora bien, ellos describen que salvo el medio de enraizamiento pueden o no contener hormonas que favorezcan el desarrollo de las plantas.

Para promover el crecimiento y desarrollo de las plantas adicionamos al medio de co-cultivo el regulador de crecimiento cinetina (Bajwa *et al.*, 2013) y en el medio de inducción de brotes en donde además se adicionaron los antibióticos necesarios para inhibir el desarrollo de *A. tumefaciens*.



Figura 26. Explantes de algodón en medio MS con antibióticos para eliminar *Agrobacterium*.

Para la selección en medio de cultivo in vitro se utilizó la misma composición del medio anterior, pero ahora sin cinetina y antibióticos, y como marcador de selección utilizamos Glufosinato de amonio. La concentración utilizada fue de 5 mg/L, y esta concentración se mantuvo a lo largo de todo el cultivo, en la imagen se muestran plantas en medio de selección que presentan hojas verdaderas.

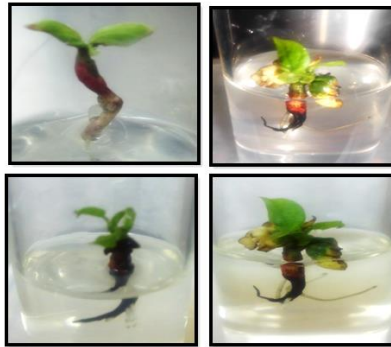


Figura 27. Plantas en medio de selección

Para corroborar que las semillas utilizadas no tuvieran resistencia al marcador de selección que confiere resistencia al herbicida glufosinato de amonio, se germinaron semillas en medios conteniendo herbicida en concentraciones de selección. Estas plantas después de dos semanas murieron (figura 28); este

experimento nos permitió también establecer la concentración de glufosinato de amonio necesaria para la posterior selección de las plantas.



Figura 28. Plantas convencionales susceptibles a herbicida en medio con glufosinato de amonio.

Posterior a la transformación genética, las plantas que presentaron resistencia al glufosinato de amonio en medio de cultivo por cuatro semanas, se pasaron a medio de enraizamiento adicionado con ácido indolbutírico en el medio, lo que indujo el crecimiento de las raíces en las plantas transformadas.

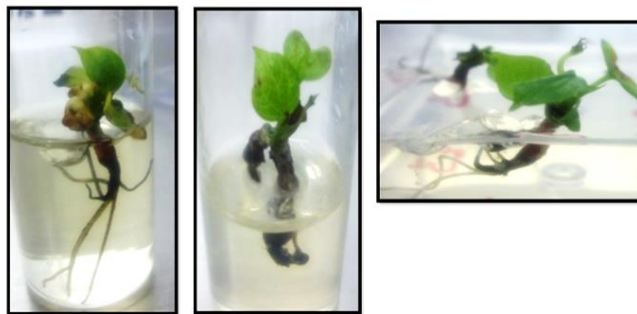


Figura 29. Plantas resistentes a glufosinato de amonio en medio de enraizamiento.

Una vez que las plantas desarrollaron raíces, después de aproximadamente cuatro semanas en este medio, las plantas se pasaron a suelo prehumedecido, donde continuó su crecimiento.



Figura 30. Plantas regeneradas. Se observa la presencia de hojas verdaderas.

Cuando las plantas se establecieron en invernadero se tomó una hoja para análisis posteriores. Se realizó la extracción de DNA genómico de hojas para la identificación por PCR del gen que codifica para la proteína híbrida. En la figura 31 se puede observar la electroforesis con los productos de PCR obtenidos de plantas independientes.

M- Marcador 1 Kb

- 1.- Planta de algodón positiva
- 2.- Planta de algodón positiva
- 3.- Planta de algodón positiva
- 4.- Control positivo
- 5.- Planta de algodón WT
- 6.- Control negativo (NTC)

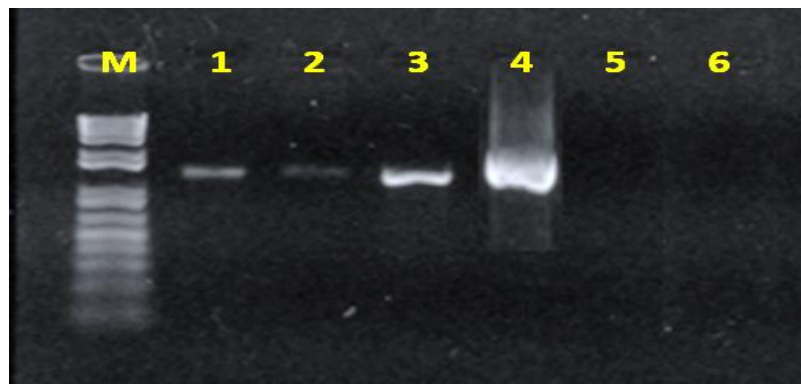


Figura 31. PCR punto final detectando el transgen-híbrido en algodón GM.  
*Tamaño esperado de la banda: 1400 pb.*

Con el objeto de corroborar la presencia simultánea del transgen que codifica para la delta-endotoxina y la resistencia a herbicida, se realizó la detección del gen bar mediante el uso de PCR en punto final, como se muestra en la figura 32. Así es posible observar fragmentos sintetizados del tamaño esperado, confirmando así la presencia del gen que codifica al marcador de selección.

M- Marcador 1 Kb

- 1.- Planta de algodón positiva
- 2.- Planta de algodón positiva
- 3.- Planta de algodón positiva
- 4.- Control positivo
- 5.- Planta de algodón WT
- 6.- Control negativo (NTC)

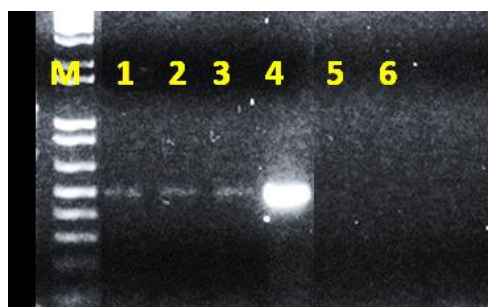


Figura 32. PCR punto final Gen bar (Tamaño esperado 500 pb)

En la siguiente tabla se describen el número de explantes obtenidos en cada etapa del proceso de transformación y regeneración.

Tabla 23. Rendimiento de las semillas de acuerdo con la etapa de transformación

<b>Etapas del cultivo</b>	<b>Cantidad de explantes</b>
<b>Esterilización de semillas</b>	100 semillas
<b>Embriones disectados completos</b>	89
<b>Embriones sin cotiledones o parcialmente removidos para la infección con <i>A. tumefaciens</i> AGL1</b>	83
<b>Traspaso de explantes a medio con antibióticos</b>	72
<b>Traspaso a medio de selección</b>	65
<b>Traspaso a medio de enraizamiento</b>	40
<b>Plantas enraizadas y en suelo</b>	16
<b>Plantas regeneradas</b>	9
<b>Plantas transformadas</b>	3

- **Porcentaje de la eficiencia de regeneración.: 10.8%**
- **Porcentaje de la eficiencia de transformación: 3%**

De manera comparativa, Chen y colaboradores (2013) describen un porcentaje de transformación por arriba del 9% mientras que Bajwa (2014) describe un porcentaje de transformación de 1.17%. Los valores de eficiencia de transformación obtenidos en el presente trabajo son comparables a los reportados.

Las plantas regeneradas que se propagan en invernadero desarrollan menos hojas y su crecimiento es más lento. Este fenómeno de adaptación es característico de plantas de la primera generación provenientes de cultivo de tejidos. Estas plantas hemicigotas producen semillas de las cuales debe analizarse la progenie para identificar a las semillas que están segregando la característica. Se pretende identificar a las plantas homocigotas que lleven el gen de interés. Se han descrito cambios morfológicos en las plantas de algodón Bt frente a las convencionales, consistentes en cambios observados en el tamaño de los estomas y en la presencia de tricomas (Mayee *et al.*, SA; Xiaogang *et al.*, 2015). Estas diferencias no afectaron su equivalencia sustancial cuando se evaluaron desde el punto de vista agronómico.

## **CARACTERIZACION MOLECULAR**

Para la caracterización molecular de las plantas genéticamente modificadas, además de identificar la presencia de los transgenes, se consideró cuantificar la presencia del transcrito. Debido a que las plantas son muy pequeñas, no se contó con suficiente tejido para purificar RNA y de buena calidad. La extracción de RNA de hojas jóvenes se dificultó debido a la cantidad excesiva de compuestos fenólicos, ya sea empleando el método de tiocianato de guanidinio, método CTAB y acetato de amonio o el sistema comercial de extracción de RNA (RNeasy, Qiagen). Baohong en 2013 reportó problemas similares en la extracción de RNA a partir de hojas jóvenes de algodón, pero logrando obtener RNA a partir de hojas

maduras. Se recomienda efectuar este ensayo cuando la planta sea más vigorosa y tenga más hojas.

Por medio de una PCR punto final pudimos observar la presencia del gen híbrido en las plantas transformadas. Para conocer el número de inserciones en el genoma de las plantas de algodón transformadas, se realizó un ensayo con el PCR digital de nanogota (BioRad). Se encontró que la línea 3 contiene dos inserciones, la línea 10.6 y la 1-1 posiblemente 4 o 5 inserciones. Debe hacerse notar que estas son líneas hemicingotas, por lo cual se podría disminuir el número en generaciones posteriores, a través de la cruce genética con algodón convencional y el análisis de sus segregantes. Los resultados de este ensayo se muestran en la figura 33.

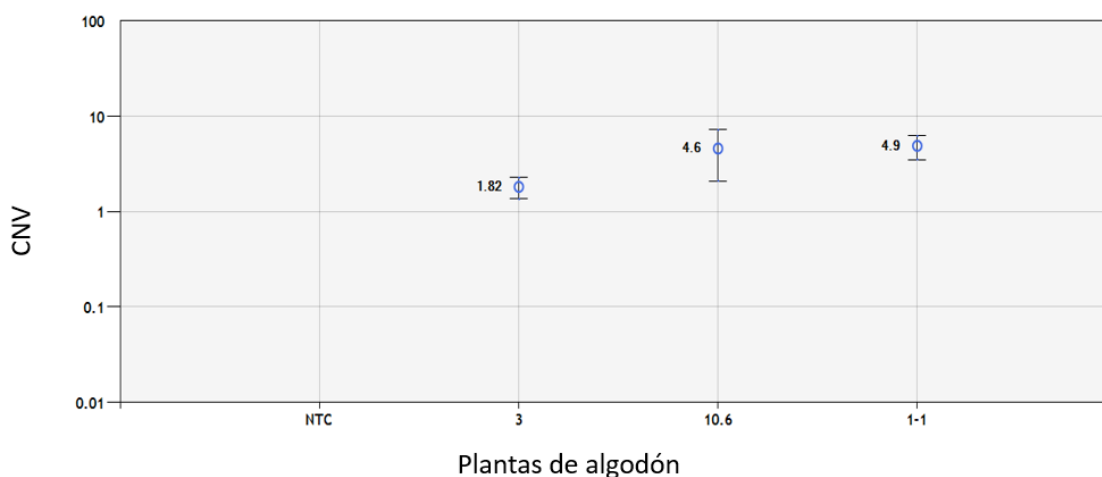


Figura 33. Número de copias por genoma en algodón GM.

La transformación mediante la bacteria *A. tumefaciens* es uno de los métodos mediante los cuales se logra una baja inserción de copias en el genoma de las plantas, en comparación con las técnicas de bombardeo de partículas por ejemplo



que es con la que un mayor número de copias se inserta (Baohong *et al.*, 2013; Kohli *et al.*, 1998; Srivastava *et al.*, 1999).

Determinar el número de inserciones dentro del genoma dentro de la planta es de gran ayuda para la selección de plantas que muestran los mejores fenotipos en cuanto a resistencia a herbicida y resistencia a lepidópteros. Como se explicó anteriormente, es posible (y deseable) tener un bajo número de transgenes insertados, ya que la sobreexpresión podría desencadenar eventos de silenciamiento génico, y por ello no tener la protección deseada en la planta (Kohli *et al.*, 1998; Srivastava *et al.*, 1999). En los campos agrícolas se cultivan plantas con una o dos inserciones en el genoma de la planta, los cuales demuestran una adecuada función biológica. (Zhang *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2013). Cabe señalar que la expresión del gen, además de intervenir el número de copias, interviene de manera preponderante la capacidad del promotor en transcribir el mRNA para su posterior traducción en ribosomas y expresión de la característica. Adicionalmente a este hecho, se encuentra la posición del gen insertado en el contexto del genoma. Aunque se conoce que el T-DNA de *Agrobacterium* se inserta en regiones de eucromatina, que son transcripcionalmente activa, se han observado grandes diferencias en transcripción cuando se analizan eventos independientes de transformación genética empleando la misma construcción. En el caso del promotor 35S, la literatura describe su uso eficiente en una o dos copias (Zhang *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2013).

Yang y colaboradores en 2013 llevaron a cabo la cuantificación del número de inserciones del gen NPTII (que confiere resistencia al antibiótico Kanamicina). Ellos obtuvieron del total de sus plantas transformadas y analizadas en T0 que el 21.1 % contenía solo una inserción del gen, 25 % dos inserciones, 19.2 tres inserciones del gen mientras que el 34.6 % contienen 4 o más copias del gen en el genoma del algodón. Esto concuerda con nuestros resultados pues de las 3 plantas analizadas dos de tres contienen 5 copias del gen-híbrido en el genoma de algodón, mientras que solo una de las tres contiene 2 copias en el genoma del algodón. En el caso de la selección de plantas empleando marcadores de

resistencia, la presión de selección también interviene en la selección de plantas con diferente número de inserciones. Si la planta es muy susceptible a antibiótico y/o herbicida, una concentración alta de estos compuestos seleccionará a aquellas plantas con más inserciones. A pesar de que los protocolos en la literatura describen concentraciones de herbicida suficientes para seleccionar a las transformantes, es importante establecer la concentración mínima inhibitoria de crecimiento para cada cultivar, con el objeto de evitar la inserción múltiple en las plantas GM.

Zhang y colaboradores en 2008, realizaron también el análisis por RT-PCR del número de copias insertadas en el genoma de algodón y al igual que Yang *et al.*, en 2013 obtuvieron plantas con más de 5 inserciones del gen blanco en el genoma. Como se indicó arriba, las siguientes generaciones pueden recombinar y segregar independientemente las copias, y con ello, poder reducir el número de copias.

Con lo anterior entonces no se descarta el uso de las plantas obtenidas en este trabajo, las cuales se evaluarán en sus siguientes generaciones.

Asimismo, es recomendable la evaluación de los niveles de expresión del gen híbrido en la planta T0 y en su progenie. De manera muy importante, es necesario evaluar en un ensayo de efectividad biológica, la capacidad de la plantas de controlar a plagas de lepidópteros.

## **ANALISIS IN SILICO DE LA DELTA-ENDOTOXINA**

Se realizó un análisis *in silico* de la estructura de la delta-endotoxina que codifica el gen híbrido insertado en las plantas de algodón, primeramente se buscaron las secuencias de las proteínas origen, a las que llamamos parentales, en este caso Cry1Ab1 variedad berliner y Cry1Aa1 variedad kurstaki.

En la siguiente figura se muestra el alineamiento de la proteína que codifica el gen híbrido (Gen\_híbridoBT) y la proteína Cry1Ab1 variedad berliner (berlinerBT).

```

Gen_híbridoBT      MDNNPNINECIPYNCLSNPEVEVLGGERIETGYTPIDISLSLTQFLLSEFVPGAGFVLGL 60
BerlinerBT        MDNNPNINECIPYNCLSNPEVEVLGGERIETGYTPIDISLSLTQFLLSEFVPGAGFVLGL 60
*****

Gen_híbridoBT      VDIIWGI FGPSQWDAFLVQIEQLINQRIEEFARNQAISRLEGLSNLYQIYAESFREWEAD 120
BerlinerBT        VDIIWGI FGPSQWDAFLVQIEQLINQRIEEFARNQAISRLEGLSNLYQIYAESFREWEAD 120
*****

Gen_híbridoBT      PTNPALREEMRIQFNDMNSALTTAIPLFAVQNYQVPLL SVYVQAANLHLSVLRDVSFVGQ 180
BerlinerBT        PTNPALREEMRIQFNDMNSALTTAIPLFAVQNYQVPLL SVYVQAANLHLSVLRDVSFVGQ 180
*****

Gen_híbridoBT      RWGFDAATINSRYNDLTRLIGNYTDHAVRWYNTGLERVWGPDSRDWIRYNQFRELTTLTV 240
BerlinerBT        RWGFDAATINSRYNDLTRLIGNYTDHAVRWYNTGLERVWGPDSRDWIRYNQFRELTTLTV 240
*****

Gen_híbridoBT      LDIVSLFPNYDSRTYPIRTVSQTLTREIYTNPVLENFDGSGFRGSAQGIEGSI RSPHMDIL 300
BerlinerBT        LDIVSLFPNYDSRTYPIRTVSQTLTREIYTNPVLENFDGSGFRGSAQGIEGSI RSPHMDIL 300
*****

Gen_híbridoBT      NSITIYTDHRGEYYWSGHQIMASPVGFSGPEFTFPLYGTMGNAAPQQRIVAQLGQGVYR 360
BerlinerBT        NSITIYTDHRGEYYWSGHQIMASPVGFSGPEFTFPLYGTMGNAAPQQRIVAQLGQGVYR 360
*****

Gen_híbridoBT      TLSSTLYRRPFNIGINNQQLSVLDGTEFAYGTSSNLPSAVYRKSGTVDSLDEIPPQNNNV 420
BerlinerBT        TLSSTLYRRPFNIGINNQQLSVLDGTEFAYGTSSNLPSAVYRKSGTVDSLDEIPPQNNNV 420
*****

Gen_híbridoBT      PPRQGFSHRLSHVSMFRSGFSNSSVSIIRAPTFSWQHRSAEFNNIIPSSQITQIPLTKST 480
BerlinerBT        PPRQGFSHRLSHVSMFRSGFSNSSVSI----- 448
*****

```

Figura 34 Alineamiento de proteína híbrida con delta-endotoxina var berliner

En la siguiente imagen se muestra la comparación entre la delta-endotoxina y la proteína Cry1Aa variedad kurstaki.

```

Gen_híbridoBT      PPRQGFHRLSHVSMFRSGFSNSSVSIIRAPTFWQHRSAEFNIIIPSSQITQIPLTKST 480
KurstakiBT        -----RAPTFWQHRSAEFNIIIPSSQITQIPLTKST 32
                    *****

Gen_híbridoBT      NLGSGTSVVKGPGFTGGDILRRTSPGQISTLRVNITAPLSQRYRVRIRYASTTNLQFHTS 540
KurstakiBT        NLGSGTSVVKGPGFTGGDILRRTSPGQISTLRVNITALLSQRYRVRIRYASTTNLQFHTS 92
                    *****

Gen_híbridoBT      IDGRPINQGNFSATMSSGSNLQSGSFRTVGFTTPFNFSNGSSVFTLSAHVFNSGNEVYID 600
KurstakiBT        IDGRPINQGNFSATMSSGSNLQSGSFRTVGFTTPFNFSNGSSVFTLSAHVFNSGNEVYID 152
                    *****

Gen_híbridoBT      RIEFVPAEVTFAEYDLERAQKAVNELFTSSNQIGLKTDTVTDYHIDQVSNLVECLSDFEC 660
KurstakiBT        RIEFVPAEVTFAEYDLERAQKAVNELFTSSNQIGLKTDTVTDYHIDQVSNLVECLSDFEC 212
                    *****

Gen_híbridoBT      LDEKQELSEKVKHAKRLSDERNLLQDPNFRGINRQLDRGWRGSTDITIQGGDDVFKENYV 720
KurstakiBT        LDEKQELSEKVKHAKRLSDERNLLQDPNFRGINRQLDRGWRGSTDITIQGGDDVFKENYV 272
                    *****

Gen_híbridoBT      TLLGTFDECYPTYLYQKIDESKLLKAYTRYQLRGYIEDSQDLEIYLIRYNAKHETVNVPGT 780
KurstakiBT        TLLGTFDECYPTYLYQKIDESKLLKAYTRYQLRGYIEDSQDLEIYLIRYNAKHETVNVPGT 332
                    *****

Gen_híbridoBT      GSLWPLSAQSPIGKCGEPNRCAPHLEWNPDLDCSCRDGEKCAHSHHFLDIDVGCSDLN 840
KurstakiBT        GSLWPLSAQSPIGKCGEPNRCAPHLEWNPDLDCSCRDGEKCAHSHHFLDIDVGCSDLN 392
                    *****

Gen_híbridoBT      EDLGVWVIFKIKTQDGHARLGNLEFLEEKPLVGEALARVKRAEKKWRDKREKLEWETNIV 900
KurstakiBT        EDLGVWVIFKIKTQDGHARLGNLEFLEEKPLVGEALARVKRAEKKWRDKREKLEWETNIV 452
                    *****

Gen_híbridoBT      YKEAKESVDALFVNSQYDQLQADTNIAMIHAADKRVHSIREAYLPELSVIPGVNAAFEE 960
KurstakiBT        YKEAKESVDALFVNSQYDQLQADTNIAMIHAADKRVHSIREAYLPELSVIPGVNAAFEE 512
                    *****

Gen_híbridoBT      LEGRIFTAFSLYDARNVIKNGDFNNGLSQWNVKGVHDVVEEQNNQRSVLLVPEWAEVSQE 1020
KurstakiBT        LEGRIFTAFSLYDARNVIKNGDFNNGLSQWNVKGVHDVVEEQNNQRSVLLVPEWAEVSQE 572
                    *****

Gen_híbridoBT      VRVCPGRGYILRVTAYKEGYGECVTIHEIENNTDELKFSNCVEEEIYPNNTVTCNDYTV 1080
KurstakiBT        VRVCPGRGYILRVTAYKEGYGECVTIHEIENNTDELKFSNCVEEEIYPNNTVTCNDYTV 632
                    *****

Gen_híbridoBT      NQEYGGAYTSRNRGYNEAPSPADYASVYEEKSYTDGRRENPCFNRGYRDYTPLVGY 1140
KurstakiBT        NQEYGGAYTSRNRGYNEAPSPADYASVYEEKSYTDGRRENPCFNRGYRDYTPLVGY 692
                    *****

Gen_híbridoBT      VTKELEYFPETDKVWIEIGETEGTFIVDSVELLLMEE 1177
KurstakiBT        VTKELEYFPETDKVRIEIGETEGTFIVDSVELLLMEE 729
                    *****

```

Figura 35. Alineamiento de proteína híbrida con delta-endotoxina Var Kurstaki

Ahora en la siguiente imagen (figura 36) se muestra el alineamiento en donde mostramos los sitios en los que la delta-endotoxina del gen híbrido presenta

diferencias entre sus parentales, en este caso se asume directamente la diferencia entre la variedad Kurstaki y berliner

```

Gen_hibridoBT      RWGFDAATINSRYNDLTRLIGNYTDHAVRWYNTGLERVWGPDSRDWIRYNQFRRELT 240
BerlinerBT        RWGFDAATINSRYNDLTRLIGNYTDHAVRWYNTGLERVWGPDSRDWIRYNQFRRELT 240
KurstakiBT        RWGFDAATINSRYNDLTRLIGNYTDYAVRWYNTGLERVWGPDSRDWIRYNQFRRELT 240
*****
Gen_hibridoBT      LDIVSLFPNYDSRTYPIRTVSQLTREIYTNPVLENFDGSGFRGSAQIEGSIKSPHLM 300
BerlinerBT        LDIVSLFPNYDSRTYPIRTVSQLTREIYTNPVLENFDGSGFRGSAQIEGSIKSPHLM 300
KurstakiBT        LDIVSLFPNYDSRTYPIRTVSQLTREIYTNPVLENFDGSGFRGSAQIEGSIKSPHLM 300
*****
Gen_hibridoBT      NSITIYDHRGEYVWYSGHQIMASPVGFSGPEFTFPLYGTMGNAAPQQRIVAQLGQGV 360
BerlinerBT        NSITIYDHRGEYVWYSGHQIMASPVGFSGPEFTFPLYGTMGNAAPQQRIVAQLGQGV 360
KurstakiBT        NSITIYDHRGEYVWYSGHQIMASPVGFSGPEFTFPLYGTMGNAAPQQRIVAQLGQGV 359
*****
Gen_hibridoBT      TLSSTLYRRPFN-IGINNQLSVLDGTEFAYG-TSSNLPSAVYRKSQVDSLDEIPPQ 418
BerlinerBT        TLSSTLYRRPFN-IGINNQLSVLDGTEFAYG-TSSNLPSAVYRKSQVDSLDEIPPQ 418
KurstakiBT        TLSSTLYRRPFIILGSGPNNQELFVLDGTEFASLTTLNLPSTIYRQRTVDSLDVIPP 419
*****
Gen_hibridoBT      NVPPRQGFSHRLSHVSIIFRSGLSNSSVSIIRAPMFSWIHRSAEFNNIIPSSQITQ 478
BerlinerBT        NVPPRQGFSHRLSHVSIIFRSGLSNSSVSIIRAPMFSWIHRSAEFNNIIPSSQITQ 478
KurstakiBT        SVPPRAGFSHRLSHVTILSQAAG--AVYTLRAPMFSWIHRSAEFNNIIPSSQITQ 477
*****
Gen_hibridoBT      STNLGSGTSVVKGPFGTGGDILRRTSPGQISTLRVNIAPLSQRYRVRIYASTTNLQ 538
BerlinerBT        STNLGSGTSVVKGPFGTGGDILRRTSPGQISTLRVNIAPLSQRYRVRIYASTTNLQ 538
KurstakiBT        STNLGSGTSVVKGPFGTGGDILRRTSPGQISTLRVNIAPLSQRYRVRIYASTTNLQ 537
*****

```

Figura 36. Alineamiento de las tres delta-endotoxinas y sitios de diferenciación con las proteínas parentales

De estas secuencias de aminoácidos y la ayuda del servidor I-Tasser se realizó una predicción en 3D de la delta-endotoxina. En la siguiente figura (figura 37) podemos observar la estructura que nos proporcionó el servidor. La estructura que se presenta es semejante a las proteínas Cry, en el caso del dominio I podemos apreciar las  $\alpha$ -hélices que le permitirá a la proteína insertarse en la membrana de las células epiteliales del intestino del insecto, el dominio II se observan las láminas  $\beta$  que están involucradas en la unión de la proteína con los receptores la oligomerización, dominio III del cual se hipotetiza que está involucrado en el reconocimiento del receptor, la inserción en la membrana, así como en algunos casos darle estabilidad al poro (Adang *et al.*, 2014; Pardo *et al.*, 2012).

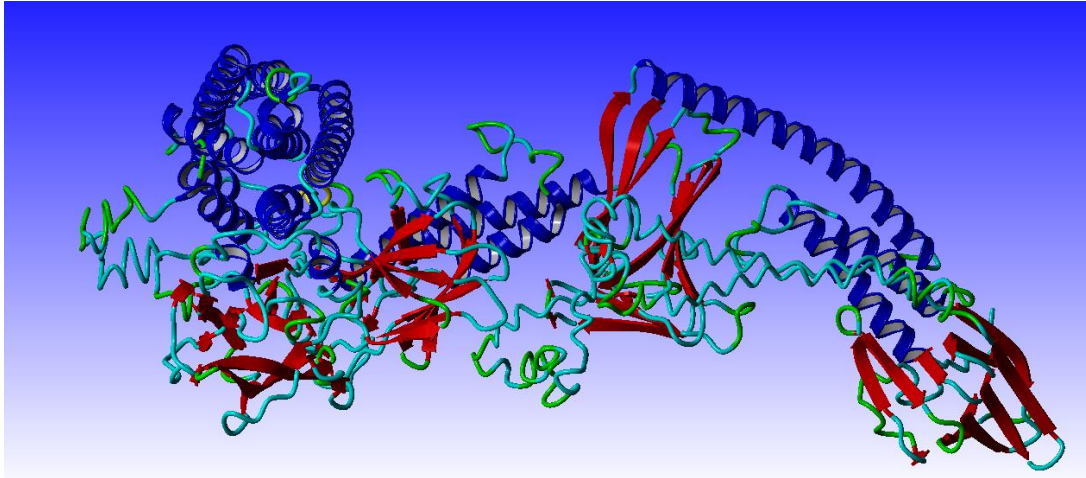


Figura 37. Estructura de la delta-endotoxina codificada por el gen-híbrido

La proteína tiene una estructura semejante a sus parentales (figura 38a y 38b) pero como se muestran en los alineamientos se considera que la delta-endotoxina híbrida tiene modificaciones en las secuencias de aminoácidos que se encierran en el rectángulo rojo, pero la estructura aun cuando la secuencia ha cambiado después de la hibridación de la proteína no cambió, con lo que podemos suponer que la proteína es activa y que además puede contener los sitios reconocimiento de ambos parentales.

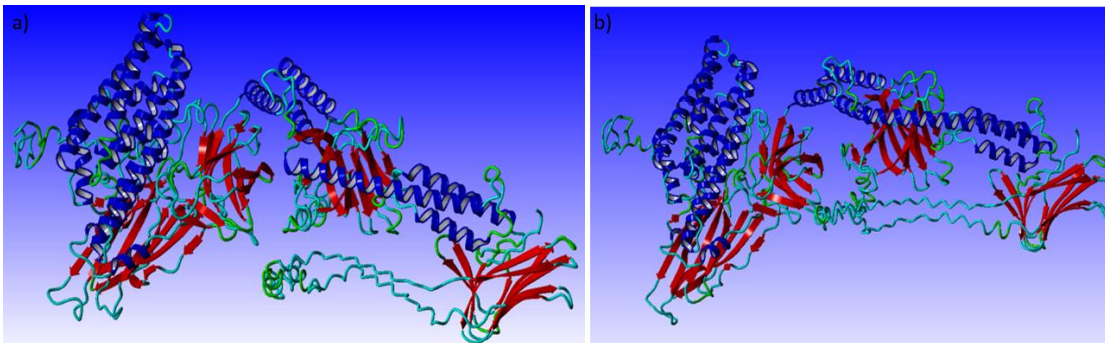


Figura 38. Parentales para la realización de la delta-endotoxina híbrida  
a) Cry1Ab1; b) Cry1Aa1

En la figura 39 podemos ver los tres dominios de la delta-endotoxina, los cuales son activos después del proceso de proteólisis que se lleva a cabo en el intestino alcalino de los insectos.

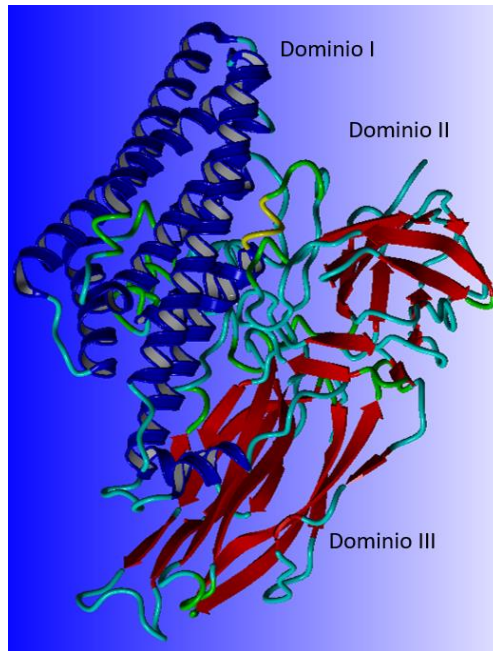


Figura 39. Tres dominios de la delta-endotoxina híbrida.

El reconocimiento entre las delta-endotoxinas y los receptores de la membrana de los insectos se lleva a cabo mediante interacciones de estos ciertos sitios importantes de la proteína, por lo que no se define con precisión el sitio activo o el sitio de unión de estas proteínas con los receptores de las células del epitelio del intestino de los insectos (Adang *et al.*, 2014).

## CONCLUSIONES

Fue posible subclonar el gen sintético que codifica para la delta-endotoxina bajo la regulación del promotor 35S del CaMV. El vector empleado es binario y contiene también un cassette de resistencia a herbicida, y se empleó para transformar genéticamente a dos variedades de algodón.

La expresión transitoria del gen híbrido de la delta-endotoxina en hojas de *N. benthamiana* demostró la presencia del mRNA, es decir que la unidad de expresión generada en este trabajo es capaz de transcribirse en plantas.

El uso de la construcción diseñada para la transformación de algodón vía *A. tumefaciens* permitió obtener plantas transformadas con el gen híbrido, mismas que fueron corroboradas al evaluar el número variable de copias del gen en el genoma de la planta. Asimismo, presentaron resistencia al herbicida glufosinato de amonio. Esta característica adicional es muy importante en campo, pues permite eliminar malezas mediante la adición de un formulado de glufosinato de amonio.

Las plantas regeneradas deberán ser evaluadas en ensayos de eficacia biológica, para evaluar su capacidad de controlar plagas de lepidópteros en cultivos de algodón.



## BIBLIOGRAFÍA

Adang M.J., Neil Crickmore & Jurat-Fuentes J. L. (2014). Diversity of *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxins and Mechanism of Action. *Advances in insect physiology insect midgut and insecticidal proteins*. 47. 39-87.

Anami S., Njuguna E., Coussens G., Aesaert S. & Van Lijsebettens M. (2013). Higher plant transformation: principles and molecular tools. *The international journal of developmental Biology*. 57. 483-494.

Anklam E., Gadani FP., Heinze P., Pijnenburg H. & Eede G.V.D. (2002). Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant derived food products. *Eur Food Res Technol* 214: 3-26.

Bakhsh A., Anayol E. & Fatih-Ozcan S. (2014) Comparison of transformation efficiency of five *Agrobacterium tumefaciens* strains in *Nicotiana Tabacum* L Emir J. Food Agric. 26 (3): 259-264

Baohong Z. (2013). *Transgenic Cotton: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, Springer Science+Business Media New York vol. 958, 31-46

Birch RG (1997) Plant transformation: problems and strategies for practical application. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 48:297–326

Bravo A., Gill S. & Soberon M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt and their potential for insect control. *NIH Public Access*. 49 (4). 423-435.

Bravo A., Gómez I., Porta H., Garcia-Gómez B.I., Roguez-Almazan C., Pardo L. y Soberon M. (2012). Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. *Microbial biotechnology*.6.17-26

Crickmore, N., Zeigler, D., R Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., (1998) Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 807–813

de Maagd, R.A., Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N., Schnepf, H.E., 2003. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Genet.* 37, 409–433.

de Maagd, R.A., Bravo, A., Crickmore, N., 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet.* 17, 193–199.

Ferré J. & Van Rie J. 2002. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 47. 501-533.

Fuguang L., Guangyi F., Kunbo W., Fengming S., Youlu Y., Guoli S., Qin L., Zhiying M., Cairui L., Changsong Z., Wenbin C., Xinming L., Haihong S., Weiqing L., Chengcheng S., Guanghui X., Caiyun G., Wuwei Y., Xun X., Xueyan Z., Hengling W., Zhifang L., Guiyin Z., Junyi W., Kun L., Russell J K., Richard G. P., John Z. Y., Yu-Xian Z., Jun W. & Shuxun Y. (2014). Genome sequence of the cultivated cotton *Gossypium arboreum*. *Nature genetics.* 46. (6). 567-574

Ganesan M.; Bhanumathi P.; Ganesh K.K; Lakshmi P.A.; Pill-Soon S. & Jayabalan N. (2009). Transgenic Indian cotton (*Gossypium hirsutum*) Chitinase Gene (Chi II) Confers Resistance to two Fungal Pathogens. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology.* 5. (2) 63-74.

Gómez I., Flores B., Bravo A. & Soberon M. 2015. *Bacillus thuringiensis* Cry1AbMod toxin counters tolerance associated with low cadherin expression but not that associated with low alkaline phosphatase expression in *Manduca sexta*. *Elsevier peptides.* 68. 130-133.

Gutierrez G.D.F., Ruiz M.R. & Xoconostle C.B. (2015). Estado actual de los cultivos genéticamente modificados en México y su contexto internacional. Ed.Porrúa print. 1ª Edición. México.

Herrero S, Oppert B, Ferré J. 2001. Different mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the Indianmeal moth. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1085–1089

Hendrix B. & McD Stewart J. (2005). Estimation of the Nuclear DNA content of *Gossypium* species. *Annals of Botany.* 95. 795-797.

Juarat-Fuentes J. L. & Adang M. J. (2006). Cry toxin mode of action in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. Journal of Invertebrate pathology. Elsevier. 92. 166-171

Karlova R., Weemen-Hendricks M., Naimov S., Ceron J., Dukandjiev S & de Maagd R.A. 2005. *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin Cry1Ac domain III enhances activity against *Heliothis virescens* in some, but not all Cry1-Cry1Ac hybrids. ELSEVIER Journal of invertebrate Pathology. 88 (2). 169-172

Knight, P.J.K., Knowles, B.H., Ellar, D.J., 1994. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane is aminopeptidase N. Mol. Microbiol. 11, 429–436.

Kohli A.; Leech M., Vain P., Laurie DA. & Christou P. (1998). Transgene organization in rice engineered through direct DNA transfer supports a two-phase integration mechanism mediated by the establishment of integration hot spots. Proc Natl Acad Sci USA. 95. 7203–7208

Li H, Oppert B, Higgins RA, Huang F, Zhu KY & Bushman LL 2004 Comparative analysis of proteinase activities of *Bacillus thuringiensis*-resistant and -susceptible *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). Insect Biochem Mol Biol 34: 753–762

Li, J.D., Carroll, J., Ellar, D.J., 1991. Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. Nature 353 (6347), 815–821.

Ma G, Rahman MM, Grant W, Schmidt O & Asgari S 2012 Insect tolerance to the crystal toxins Cry1ac and Cry2Ab is mediated by binding of monomeric toxin to lipophorin glycolipids causing oligomerization and sequestration reactions. Dev Comp Immunol 37: 184–192.

Maldonado J.M. (2009). Procesos textiles última visita: 20/08/2015 URL: <http://josemaldonadoingenieriatextil.blogspot.mx/2009/12/hilatura-de-algodon.html>

Mayee CD; Singh P.; Dongre AB.; Rao MRK y Raj S. Transgenic Bt cotton CICR technical bulletin No:22 URL: [http://www.cicr.org.in/pdf/transgenic\\_bt\\_cotton.pdf](http://www.cicr.org.in/pdf/transgenic_bt_cotton.pdf) última visita: 19/08/2015

Miranda R., Zamudio F.Z. & Bravo A. (2001) Processing of Cry1Ab  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* by *Manduca sexta frugiperda* midgut proteases: role in protoxin activation and toxin inactivation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 31. 1155-1163

Naimov S., Dukiandjiev S. & de Maagd R.A. 2003. A hybrid *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin gives resistance against a coleopteran and a lepidopteran pest in transgenic potato. *Plant Biotechnology Journal*. 1. 51-57

Ñañez L.C. 2012; Manejo fitosanitario del cultivo de algodón, (*Gossypium hirsutum*) Medidas para la temporada invernal. ICA.

Pardo-Lopez L., Soberon M. & Bravo A. 2012. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiol Rev*. 37 3-22.

Parker, M.W., Feil, S.C., 2005. Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Progr. Biophys. Mol. Biol*. 88, 91–142.

Plagas de algodón, protección del cultivo y malherbología URL: [https://alojamientos.uva.es/guia\\_docente/uploads/2011/427/52020/1/Documento9](https://alojamientos.uva.es/guia_docente/uploads/2011/427/52020/1/Documento9) Última visita: 21/08/2015

Promdonkoy, B., Ellar, D.J., 2005. Structure-function relationships of a membrane pore forming toxin revealed by reversion mutagenesis. *Mol. Membr. Biol*. 22, 327–337

Rasul F.; Asad S.; Zafar Y. & Mansoor S. (2013). Characterization of a Strong Constitutive Promoter from Cotton Leaf Curl Kokhran Virus for High Level Gene Expression in

Monocotyledonous and Dicotyledonous Plants. International Journal of Agriculture & Biology. 16. (2). 342-346

Retes L. R., Moreno M. S, Denogean B. F. G., Martin R. M. & Ibarra F. F. (2015). Análisis de la rentabilidad del cultivo de algodón en Sonora. Revista mexicana de agronegocios. XIX. 1156-1166.

SAGARPA (2014). Análisis de la cadena de valor de producción de algodón en México. Danda impresores. URL: <http://www.redinnovagro.in/pdfs/algodon.pdf> Última visita: 04/08/15

SAGARPA 2011; Monografía de cultivos. Subsecretaría de fomento a los agronegocios, Algodón.

Sanahuja G., Banakar R., Twyman M. R., Capell T. & Christou P. (2011). *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. Pnat Biotechnology Journal. 9. 283-300.

SHCP 2014. Panorama del algodón. Financiera nacional de Desarrollo Agropecuario, Rural, Forestal y Pesquero. Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica, Análisis Sectorial y Tecnologías de la información. [www.financierarural.gob.mx](http://www.financierarural.gob.mx)

Sistema producto algodón, A. C. (2012). Plan reactor Sistema producto algodón. Comité nacional sistema producto algodón A.C.

Soberon M. & Bravo A. (2007). Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. Biotecnología. 14. 303-314

Srivastava V.; Anderson OD. & Ow DW. (1999). Single-copy transgenic wheat generated through the resolution of complex integration patterns. Proc Natl Acad Sci USA 96.11117–11121

Thompson C. J. ; Moyva N. R.; Tizard R.; Cramer R.; E.Davies J.; Lauwereys M. & Botterman J. (1987). Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*. The EMBO journal. 6. (9). 2519-2523.

Valderrama F. A.M., Arango I. R. & Afanador K.L. (2005). Transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*: “INGENIERÍA GENÉTICA NATURAL APLICADA”. Investigadora. Unidad de Biotecnología Vegetal UNALMED-CIB Corporación para Investigaciones Biológicas, CIB. Medellín, Colombia. Vol. 59, No. 2, p. 2570-2577

Wang L., Jiang X., Luo L., Stanley D., Sappington T.W. & Zhang Lei (2013) A cadherin-Like protein influences *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxicity in the oriental armyworm, *Mythimna separate*. Environmental Microbiology reports. 5.(3). 438-443.

Wegier B. A. L. , Piñeyro-Nelson a., Alarcón § A., Gálvez-Mariscal E. R., Álvarez-Buylla & D. Piñero (2011). Recent long-distance transgene flow into wild populations conforms to historical patterns of gene flow in cotton (*Gossypium hirsutum*) at its centre of origin. Molecular ecology. 20. 4182-4194.

Xiaogang Li., Ding C., Wangs X & Biao L. (2015). Compararison of the physiological characteristics of transgenic insect-resitant cotton and conventional lines. Scientific report. 5: 8739.

Xoconostle-Cázares B. 1989 “Clonación, caracterización y expresión del gen que codifica para la delta-endotoxina de *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki” Tesis de maestría de la especialidad de Biología Molecular de CINVESTAV DF.

Yang X.; Lu F., Zhang X., Liu K., Wang Q., Zhang C., Liu C., Shan G., Chee-kok C. & Fang W. (2013). Integration and characterization of T-DNA Insertion in Upland Cotton. Czech J. Genet. Plant Breed. 49. (2). 51-57

Zhang J., Lin C., Cheng J.Q., Mao H.Z., Fan X.P., Meng Z.H., Chan K.M., Zhang H.J., Qi J.F., Ji L.H. & Hong Y. (2008): Transgene integration and organization in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) genome. Transgenic Research, 17. 293–306.

## ANEXO TABLAS.

### ANEXO-TABLA 1: SALES DE MEDIO MS

REACTIVOS	Conc Final	1L (10x)
Cloruro de calcio (CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	0.440 g/L	4.4 g
nitrato de potasio (KNO <sub>3</sub> )	1.9 g/L	19 g
nitrato de amonio (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> )	1.650 g/L	16.5 g
difosfato de potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.170 g/L	1.7 g
sulfato ferroso (FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	27.860 g/L	0.28 g
EDTA (Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O)	37.250 mg/L	0.373 g
Sulfato de Manganeso (MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O)	16.880 mg/L	0.169 g
yoduro de potasio (KI)	0.830 mg/L	0.0083 g
Sulfato de zinc (ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	8.60 mg/L	0.086 g
Acido borico (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	6.2 mg/L	0.062 g
sulfato de magnesio (MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	0.370 g/L	3.7 g
Cloruro de cobalto (CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O) *	0.025 mg/L	0.025 ml
sulfato cúprico (CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O)*	0.025 mg/L	0.025 ml
Molibdato de sodio (Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O)*	0.025 mg/L	0.025 ml

\*Estas sales se agregan al medio de un Stock de 10 mg/mL.

### ANEXO-TABLA 2: SOLUCIÓN ORGÁNICA MEDIO B5

VITAMINAS	CON. FINAL	1 L (100x)
Myo- Inositol	100 mg/L	1 gramo
Tiamina-HCL	10 mg/L	0.010 gramos
Pirodoxina-HCL	1 mg/L	0.001 gramos
Ac. Nicotínico	1 mg/L	0.001 gramos

Para preparar un litro de medio se utilizó:

- 100 ml de solución de sales de medio MS
- 10 mL de solución de vitaminas

**ANEXO-TABLA 3: SOLUCIÓN DE MACROSALES MEDIO B5**

<b>MACROSALES</b>	<b>Conc. Final</b>	<b>1 L (10X)</b>
Sulfato de Amonio (NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	134 mg/L	1.34 g
Sulfato de Magnesio (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	250 mg/L	2.5 g
Cloruro de Calcio (CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O)	150 mg/L	1.5 g
Nitrato de Potasio (KNO <sub>3</sub> )	2500 mg/L	25 g
Fosfato de Sodio (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O)	150 mg/L	1.5 g

**ANEXO-TABLA 4: SOLUCIÓN DE MICROSALES MEDIO B5**

<b>MICROSALES</b>	<b>Conc. Final</b>	<b>1 L (10X)</b>
Sulfato de Manganeso (MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O)	10 mg/L	0.1 g
Sulfato de Zinc (ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	2 mg/L	0.02 g
Yoduro de Potasio (KI)	0.75 mg/L	0.0075 g
Acido Borico H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3 mg/L	0.03 g
EDTA (Na <sub>2</sub> .EDTA.12H <sub>2</sub> O)	37.3 mg/L	0.373 g
Sulfato Ferroso (FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	27.8 mg/L	0.278 g
Cloruro de cobalto (CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O) *	0.025 mg/L	0.025 ml
sulfato cúprico (CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O)*	0.025 mg/L	0.025 ml
Molibdato de sodio (Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O)*	0.025 mg/L	0.025 ml

**ANEXO-TABLA 5: MEDIO DE DESINFECCIÓN**

<b>REACTIVO</b>	<b>CONCENTRACION</b>
Carbenicilina	200 mg/L
Cefotaxima	125 mg/L
Captain 50	30 mg/L
Bravo 75	30 mg/L



**ANEXO-TABLA 6: MEDIO DE INOCULACIÓN**

<b>COMPONENTE</b>	<b>CONCENTRACIÓN</b>
Macrosales B5	2/5 X
Microsales B5	1/10 X
stock de Vitaminas B5	1/10 X
Glucosa	30 g/L
MES	3.9 g/L
pH: 5.4 ajustar con KOH	
esterilizar por autoclave	
GA <sub>3</sub>	0.5 mg/L.
BAP	1.67 mg/L
IBA	0.1 mg/L
TBZ	10 mg/MI

**ANEXO-TABLA 7: MEDIO DE INDUCCIÓN DE BROTES Y ANTIBIÓTICOS**

<b>COMPONENTE</b>	<b>CONCENTRACIÓN</b>
SOLUCION DE SALES MEDIO MS	1x
SOLUCIÓN DE VITAMINAS B5	1X
GLUCOSA	30 g/l
pH: 5.8 con KOH	
Phytigel	4 g/L
Esterilizar por autoclave	
Cinetina	1 mg/ml
Timentin	100 mg/L
Cefotaxima	200 mg/L

**ANEXO-TABLA 8: MEDIO DE REGENERACIÓN Y SELECCIÓN**

<b>COMPONENTE</b>	<b>CONCENTRACIÓN</b>
SOLUCION DE SALES MEDIO MS	1x
SOLUCIÓN DE VITAMINAS B5	1X
GLUCOSA	30 g/l
pH: 5.8 con KOH	
Phytigel	4 g/L
Esterilizar por autoclave	
Glufosinato de amonio	5 ppm
Cinetina	1 mg/ml
Timentin	50 mg/L
Cetotaxima	50 mg/L
TBZ	30 mg/L

**ANEXO-TABLA 9: MEDIO DE ENRAIZAMIENTO**

<b>COMPONENTE</b>	<b>CONCENTRACIÓN</b>
SALES DE MS	1x
GLUCOSA	30 g/l
Ph 5.8 KOH	
Phytigel	3 g/l
Esterilizar	
stock de vitaminas SBRM	2 ml/L
Myo-inositol	0.1 g/L
Cisteina	10 mg/ml.
IAA	0.1 ppm
timentin	50 mg/L
cefotaxima	50 mg/L

**ANEXO-TABLA 10: STOCK DE VITAMINAS SBRM**

<b>COMPONENTE</b>	<b>CANTIDAD</b>
Glicina	0.1 gramos
Ac. Nicotínico	0.025 gramos
Pirodixina	0.025 gramos
Tiamina	0.05 gramos

### ANEXO-TABLA 11: MEDIO DE AGROINFILTRACIÓN

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN
MES pH:5.6	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
Acetosingona	150 µM

### ANEXO-TABLA 12: MEDIO LB LIQUIDO PARA *A. tumefaciens*

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN
Extracto de levadura	5 g/L
Bactotripton	10 g/L
NaCl	10 g/L

### SOLUCIONES DE EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO

#### ANEXO-TABLA13: SOLUCIÓN I

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN
Glucosa	50 mM
Tris-HCl pH:8	25 mM
EDTA pH:8	10 mM

#### ANEXO-TABLA 14: SOLUCIÓN II

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN
SDS	10 %
NaOH	1 N

La solución se prepara media hora antes de ser utilizada.

#### ANEXO-TABLA 15: SOLUCIÓN III

COMPONENTE	CANTIDAD
Acetato de potasio 5M	30 mL
Ácido acético glacial	5.75 mL.
H <sub>2</sub> O	14.25 mL.

## ANEXO-TABLA15: BUFFER CTAB.

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN
TRIS-HCl pH:8	100 mM
EDTA pH:8	20 mM
NaCl	1.4 M
CTAB	2 % (W/V)
PVP	1 %

## ANEXO SECUENCIAS

### ANEXO-SECUENCIA1: SECUENCIA DE AMINOACIDOS DE LA DELTA-ENDOTOXINA.

MDNNPNINECIPYNCLSNPEVEVLGGERIETGYTPIDISLSLTQFLSEFVPGAGFVLGLVDIHWGIFGPS  
QWDAFLVQIEQLINQRIEEFARNQAISRLEGLSNLYQIYAESFREWEADPTNPALREEMRIQFNDMNS  
ALTTAIPLFAVQNYQVPLLSVYVQAANLHLSVLRDVSFVGQRWGFDAATINSRYNDLTRLIGNYTDHA  
VRWYNTGLERVWGPDSRDWIRYNQFRRELTTLVLDIVSLFPNYDSRTYPIRTVSQLTREIYTNPVLENF  
DGSFRGSAQGIEGSIRSPHLMILNSITIYTDHRGEYYWSGHQIMASPVGFSGPEFTFPLYGTMGNA  
APQQRIVAQLGQGVYRTLSSTLYRRPFNIGINNQQLSVLDGTEFAYGTSSNLPSAVYRKSGTVDSLDEIP  
PQNNNVPPRQGFHRLSHVSMFRSGFSNSSVSIIIRAPTFWQHRSAEFNIIIPSSQITQIPLTKSTNLGS  
GTSVVKGPGFTGGDILRRTSPGQISTLRVNITAPLSQRYRVIRYASTTNLQFHTSIDGRPINQGNFSAT  
MSSGSNLQSGSFRTVGFTTFNFSNGSSVFTLSAHVFNSGNEVYIDRIEFVPAEVTFEAEYDLERAQKA  
VNELFTSSNQIGLKTVDYHIDQVSNLVECLSDEFCLDEKQELSEKVKHAKRLSDERNLLQDPNFRGIN  
RQLDRGWRGSTDITIQQGDDVFKENYVTLGTFDECYPTYLYQKIDESKCLKAYTRYQLRGYIEDSQDLEI  
YLIRYNAKHETVNVPGTGLWPLSAQSPIGKCGEPNRCAPHLEWNPDLDCSCRDGEKCAHSHHFSL  
DIDVGCTDLNEDLGVWVIFKIQTQDGHARLGNLEFLEEKPLVGEALARVKRAEKKWRDKREKLEWETN  
IVYKEAKESVDALFVNSQYDQLQADTNIAMIIHAADKRVHSIREAYLPELSVIPGVNAAIFEELEGRIFTAF  
SLYDARNVIKNGDFNNGLSWVVKGHVDVEEQNNQRSVLVPEWEAEVSQEVRCVPCGRGYILRVTA  
YKEGYGEGCVTIHEIENNTDELKFSNCVEEIIYPNNTVTCNDYTVNQEEYGGAYTSRNRGYNEAPSVPA  
DYASVYEEKSYTDGRRENPCFENRGRDYTPLVGVYVTKLEYFPETDKVWIEIGETEGTFIVDSVELL  
MEE

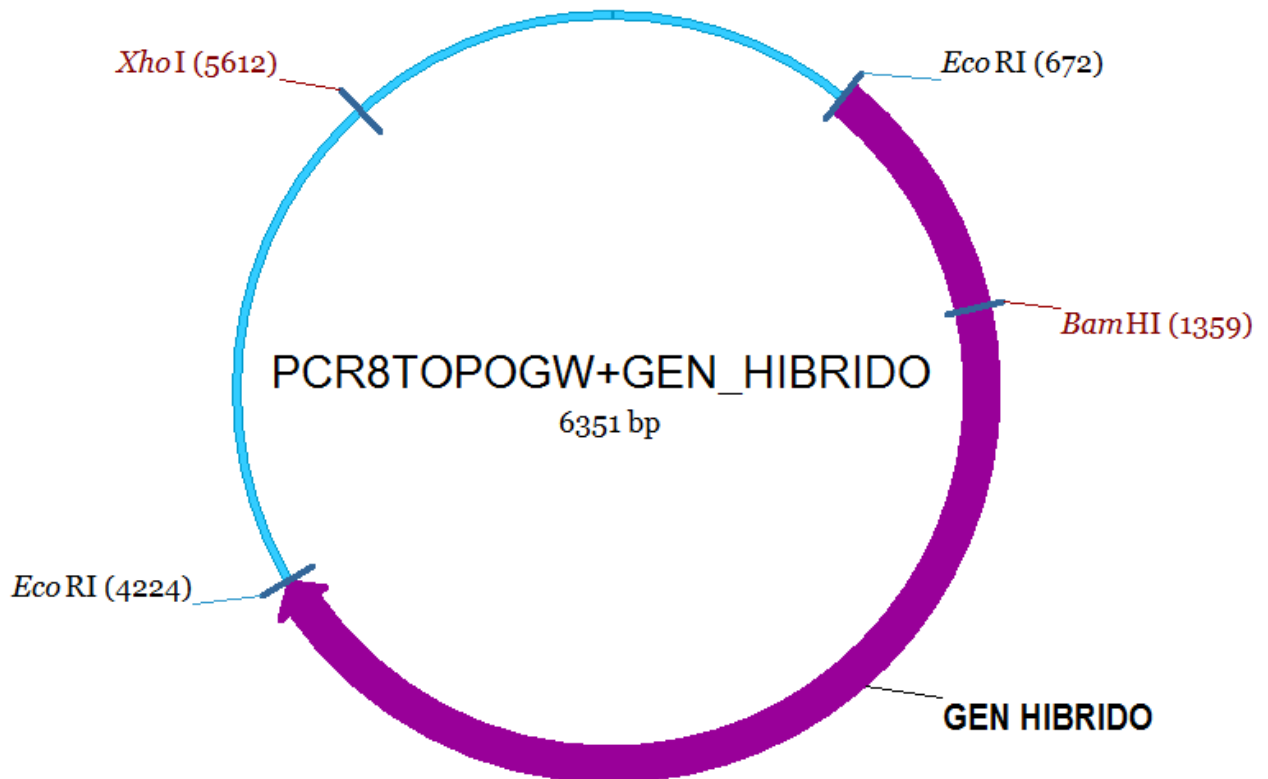
## ANEXO-SECUENCIA 2: SECUENCIA DE NUCLEOTIDOS DEL GEN HÍBRIDO DE LA DELTA-ENDOTOXINA

ATGGACAACAACCCCAACATCAACGAGTGATCCCCTACAACCTGCCTGAGCAACCCCGAGGTGGAGGTGCTGGGCGGCGAGCGCATCGAGACCGGT  
ACACCCCATCGACATCAGCCTGAGCCTGACCCAGTTCCTGCTGAGCGAGTTCGTGCCCGGCGCCGGCTTCGTGCTGGGCTGTTGGACATCATCTGG  
GGCATCTTCGGCCCCAGCCAGTGGGACGCCTTCTGGTGAGATCGAGCAGCTGATCAACCAGCGCATCGAGGAGTTCGCCCGCAACCAGGCCATCA  
GCCGCTGGAGGGGCTGAGCAACCTGTACCAGATCTACGCCGAGAGCTTCGCCGAGTGGGAGGCCGACCCACCAACCCCGCCTGCGCGAGGAGAT  
GCGCATCCAGTTCAACGACATGAACAGCGCCTGACCACCGCCATCCCCTGTTCCGCGTGCAGAACTACCAGGTGCCCTGCTGAGCGTGTACGTGC  
AGGCCGCCAACCTGCACTGAGCGTGTGCGCGACGTGAGCGTGTTCGGCCAGCGCTGGGGCTTCGACGCCGCCACCATCAACAGCCGCTACAACGA  
CCTGACCCGCTGATCGGCACTACACCGACCAGCCGTGCGCTGGTAAACACCGCCTGGAGCGCGTGTGGGGCCCCGACAGCCGCGACTGGATC  
CGTACAACAGTTCGCCCGGAGCTGACCCGTGACCGTGTGGACATCGTGAGCCTGTTCCCAACTACGACAGCCGACCTACCCATCCGACCCGTG  
AGCCAGCTGACCCCGGAGATCTACCAACCCCGTGTGGAGAACTTCGACGGCAGCTTCGCCGCGAGCGCCAGGGCATCGAGGGCAGCATCCGCA  
GCCCCACCTGATGGACATCCTGAACAGCATCACCATCTACACCGACGCCACCGCGGCGAGTACTACTGGAGCGGCCACAGATCATGGCCAGCCCC  
GTGGGCTTCAGCGGCCCGAGTTCACCTTCCCCCTGTACGGCACCATGGCAACGCCGCCCGCCAGCAGCGCATCGTGCCCGAGCTGGGCCAGGGCGT  
GTACCCGACCCCTGAGCAGCACCCTGTACCCGCCCTTAACTATCGGCATCAACAACAGCAGCTGAGCGTGTGGAGCGCACCGAGTTCGCCTACG  
GCACCAGCAGCAACTGCCAGCGCGTGTACCGCAAGAGCGGCACCGTGGACAGCCTGGACGAGATCCCCCAGAAACAACAGTCCCCCCCCG  
CCAGGGCTTCAGCCACCGCTGAGCCACGTGAGCATGTTCCCGCAGCGGCTTCAGCAACAGCAGCGTGAGCATATCCGCGCCCCACTTCAGCTGGC  
AGCACCGCAGCGCGAGTTCAACAACATCATCCCAGCAGCCAGATCACCAGATCCCCCTGACCAAGAGCACCACCTGGGCGAGCGGCCACCGCGT  
GTGAAGGGCCCCGGCTTCACCGGGGCGACATCCTGCGCCGACCAGCCCCGGCCAGATCAGCACCTGCGCGTGAACATCACCGCCCCCTGAGCCA  
GCGCTACCGCGTGCATCCGCTACGCCAGCACCACCACTGCAGTTCACACAGCATCGACGCCGCCCATCAACCAGGGCAACTTCAGCGCCA  
CCATGAGCAGCGGCGAGCAACTGCAGAGCGGCGAGCTTCGCCACCGTGGGCTTCACACCCCTTCAACTTCAGCAACGGCAGCAGCGTGTTCACCTG  
AGCGCCACGTGTTCAACAGCGGCAACGAGGTGTACATCGACCCGATCGAGTTCGTGCCCGGAGGTGACCTTCGAGGCGGAGTACGACCTGGAGC  
GCGCCAGAAAGCGTGAACGAGTGTTCACAGCAGCAACCAGATCGGCTGAAGACCGACGTGACCGACTACCACATCGACAGGTGAGCAACCT  
GGTGGAGTGCCTGAGCGACGAGTTCGCTGGACGAGAAGCAGGAGTGTGAGCGAGAAGGTGAAGCAGGCCAAGCGCCTGAGCGACGAGCGCAACC  
TGCTGCAGGACCCCACTTCGCCGGCATCAACCGCCAGCTGGACCGCGGTGGCGCGGAGCACCACATCACCATCCAGGGCGGCGACGACGTGT  
CAAGGAGAACTACGTGACCTGCTGGGCACCTTCGACGAGTGTACCCACCTACCTGTACCAGAAGATCGACGAGAGCAAGTGAAGGCCTACACC  
GCTACCAGTGCAGCGGCTACATCGAGGACAGCCAGGACCTGGAGATCTACCTGATCCGCTACAACGCCAAGCAGCAGACCGTGAACGTGCCCGGCAC  
CGCAGCCTGTGGCCCTGAGCGCCAGAGCCCCATCGGCAAGTGCAGCGAGCCCAACCGCTGCGCCCCCACTGGAGTGAACCCCGACCTGGAC  
TGCAGCTGCCGCGAGCGGAGAAAGTGCGCCACCACAGCCACCACTTCAGCCTGGACATCGACGTGGGCTGCACCGACCTGAACGAGGACCTGGGCG  
TGTGGGTGATCTCAAGATCAAGACCCAGGACGCCACGCCCGCTGGGCAACTGGAGTTCCTGGAGGAGAAGCCCTGTTGGGCGAGGCCTGG  
CCCGCTGAAGCGCGCGGAGAAAGTGGCGGCAAGCGCGAGAAAGTGGAGTGGGAGACCAACATCGTGTACAAGGAGGCCAAGGAGAGCGTG  
GACGCCCTGTTCTGTAACAGCCAGTACGACCAGCTGACGGCCGACCAACATCGCCATGATCCACGCCCGGACAAGCGCGTGCACAGCATCCGCG  
AGGCTACCTGCCCGAGCTGAGCGTGTATCCCGGCGTGAACGCCCATCTTCAGGAGCTGGAGGGCCGATCTTACCGCCTTACGCTGTACGAC  
GCCCGCAACGTGATCAAGAAGCGGCGACTTCAACAACGGCCTGAGCTGTGAACTGAAGGCCACGTGACGCTGGAGGAGCAGAAACAACAGCGC  
AGCGTGTGCTGCTGCCGAGTGGGAGGCGGAGTGTGAGCCAGGAGTGCAGTGTGCCCGGCCGCGGCTACATCTGCGCGTACCCTACAAG  
GAGGGCTACGGCGAGGGTGCCTGACCATCCAGAGATCGAGAACAACCCGACGAGTGAAGTTCAGCAACTGCGTGGAGGAGGAGATCTACCCC  
AACAACCCGTGACCTGCAACGACTACACCGTGAACAGGAGGAGTACGGCGGCGCTACACCAGCCGCAACCCGCGCTACAACGAGGCCCGAGCG  
TGCCCGGACTACGCCAGCGTGTACGAGGAGAAGAGCTACACCGACGGCCGCGGAGAAACCCCTGCGAGTTCACCGCGGCTACCGGACTACAC  
CCCCTGCCCGTGGGCTACGTGACCAAGGAGCTGGAGTACTTCCCGAGACCGACAAGGTGTGGATCGAGATCGGCCGAGACCGAGGGCACCTTCAT  
GTGGACAGCGTGGAGTGTGCTGATGGAGGAGTAG

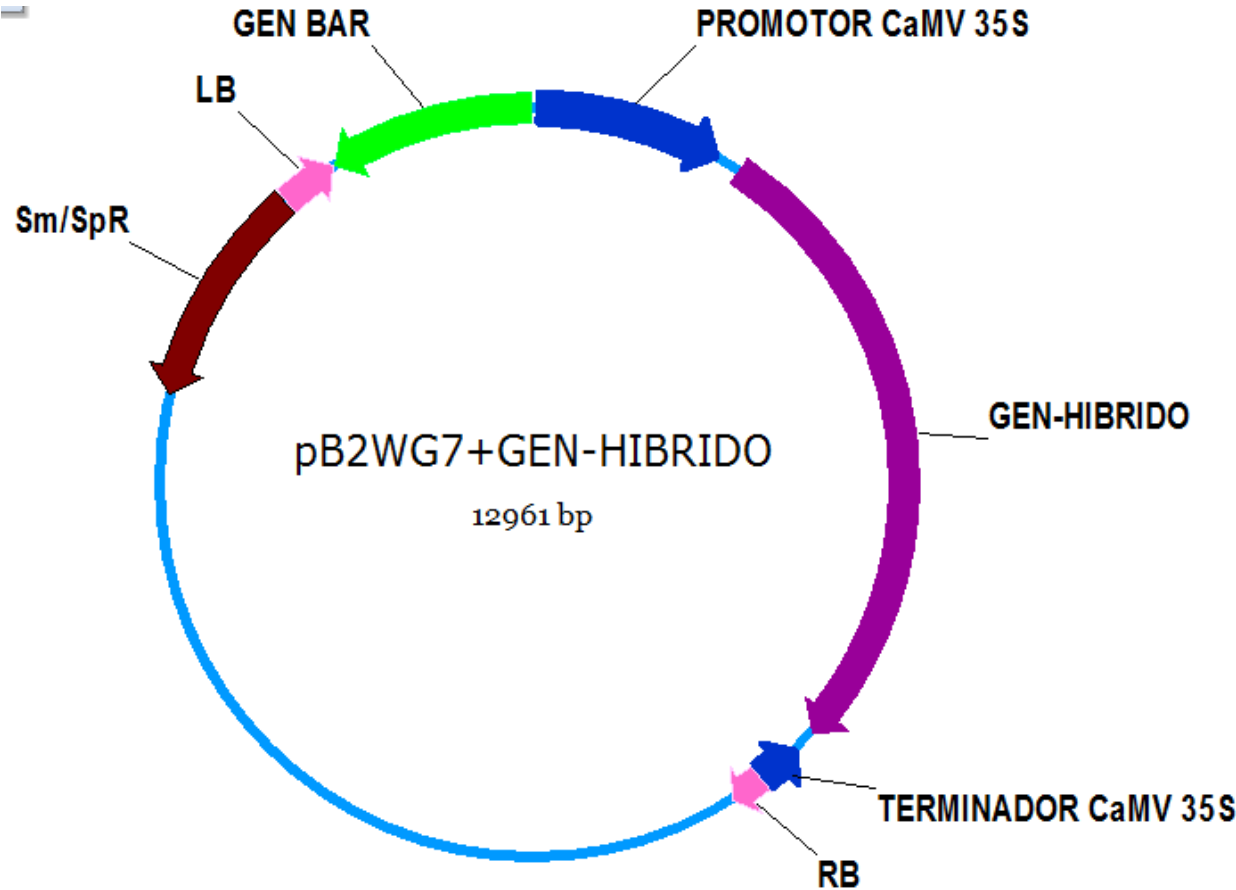
## ANEXO-FIGURAS

### VECTORES

#### ANEXO-FIGURA1: GEN HÍBRIDO DE LA DELTA-ENDOTOXINA EN EL VECTOR DE ENTRADA PCR8/TOPO/GW.



**ANEXO-FIGURA2: VECTOR DE EXPRESION EN PLANTA pB2WG7 CON EL GEN HÍBRIDO DE LA DELTA ENDOTOXINA**



### ANEXO-FIGURA 3

Determinación del Número variable de copias en una planta WT de algodón

