

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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**Obtención de variedades de soya (*Glycine max* (L) Merrill) expresando antimicrobianos  
con potencial para controlar la roya asiática de la soya (*Phakopsora pachyrhizi*)**

TESIS

Que Presenta

**José Abrahán Ramírez Pool**

Para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS  
EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA**

Director de Tesis: **Dra. Beatriz Xoconostle Cázares**

México, D.F.

Septiembre, 2015



El presente trabajo de investigación para la obtención del grado de Maestría en Ciencias con Especialidad en Biotecnología, se desarrolló en el laboratorio 24 de Biología Molecular de Plantas del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Zacatenco, bajo la dirección de la Dra. Beatriz Xoconostle Cázares y con asesoría del Dr. Roberto Ruíz Medrano y el Dr. Jesús Hinojosa Moya. En el periodo comprendido de Septiembre del 2013 a Agosto de 2015.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por darme la oportunidad de llegar a este momento.

Al pueblo de México, por brindarme la oportunidad de realizar la maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), quien me otorgó la beca para la maestría.

A la Dra. Ruth Sandoval Luna (t), gracias por introducirme al mundo de la investigación.

A la Dra. Beatriz Xoconostle Cázares, por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por su paciencia, asesoría y disponibilidad para resolver mis dudas. Gracias por transmitir sus conocimientos.

Al Dr. Roberto Ruiz Medrano, gracias por su asesoría y apoyo brindado durante el desarrollo del proyecto investigación.

Al Dr. Jesús Hinojosa Moya, gracias por su asesoría y aportaciones realizadas al presente trabajo.

A Lidia, Bety y don José Luis, gracias por el apoyo recibido durante mi estancia en el laboratorio.

Al M.C. Abel, por las facilidades prestadas para llevar a cabo parte del proyecto en las instalaciones del CNRF.

A Paquito y Robert, gracias por sus enseñanzas, paciencia y por brindarme su amistad.

A mis compañeros de maestría: Mony, Laura, Citla, Andrés, Enrique, Stephanie, Azu, Anamarel, Jesús, Anluí, Lety, Fer y Sarita.... Gracias por los buenos y por los malos ratos.

A los compañeros de laboratorio: Paquito, Roberto, Bere, Rebeca, Humberto, Angie, Vale, Citla, Josué, Andrea, Luisin, Miguel, Jorge, Aleja, Ari, Lidia, Laura, Brendita, Elena, Lilian, Diego, Bruno, Israel, Eduardo, Cynthia, Estela y doña Lulú, gracias por su apoyo, ayuda, paciencia para resolver mis dudas.

A la IBT Mónica, quien en los últimos meses ha contribuido al desarrollo del presente trabajo.

## DEDICATORIA

A mis padres Fanni y Manuel, fuente de inspiración, ejemplo de perseverancia y por su incondicional apoyo.

A Yatziry Hypatia, agua pura y cristalina, mi motor para seguir ante las adversidades, una sonrisa tuya me fortalece.

A Mildred, por tu amor y apoyo para seguir adelante.

A mi hermana Imelda y su familia: Jorge mi cuñado, Brisa, Lluvia y Marisol, mis encantadoras sobrinas, gracias por su infinito apoyo y por sus palabras de aliento que me han motivado para salir adelante.

A Tania, mi hermosa hermanita, también eres parte de mi inspiración para salir adelante.

A mis abuelas Antonia y María, gracia por el apoyo brindado.

A toda mi familia.

A la Familia Torres Pool y Torres Vivanco, por el apoyo brindado durante mi estancia en el D.F.

## Índice de contenido

RESUMEN .....	16
ABSTRACT .....	17
I INTRODUCCIÓN .....	18
I.I Origen .....	18
I.II Evolución.....	19
I.III Panorama internacional de la soya .....	20
I.IV Panorama nacional de la soya .....	21
I.V Generalidades del cultivo .....	23
I.VI Fases de desarrollo de la soya.....	23
I.VI.I Fase vegetativa de la soya .....	23
I.VI.II Fase reproductiva de la soya .....	24
I.VII La roya asiática de la soya .....	26
I.VII.I Distribución geográfica .....	26
I.VII.II Situación de la roya asiática de la soya en México .....	27
I.VII.III Aspectos biológicos de la roya asiática de la soya .....	28
I.VII.IV Epidemiología.....	28
I.VII.V Ciclo de vida de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> .....	29
I.VII.VI Agroclimatología de la roya asiática de la soya .....	30

I.VII.VII Síntomas .....	31
I.VII.VIII Principales cultivos en riesgo.....	33
I.VIII Control de la enfermedad .....	33
I.VIII.I Control cultural.....	33
I.VIII.II Control químico.....	34
I.IX.I Antimicrobiano defensina .....	36
I.X Transformación de plantas mediadas por <i>Agrobacterium</i> .....	38
I.XI Seguridad alimentaría .....	41
I.XII Historia de los transgénicos en México .....	42
I.XIII Regulación de los Organismos Genéticamente Modificados en México	43
I.XIV Soya transgénica .....	44
I.XIV.I Soya resistente a herbicidas .....	44
I.XIV.II Soya GM en México .....	45
II. JUSTIFICACIÓN.....	46
III. OBJETIVO GENERAL .....	46
IV. OBJETIVOS PARTICULARES .....	46
V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	47
VI. MATERIALES Y MÉTODOS .....	48
VI.I Diseño de la unidad de expresión CsPP16-Defensina .....	48
VI.I.I Secuencia del gen CsPP16-Defensina .....	49



VI.I.II Extracción de DNA plasmídico .....	49
VI.I.III Cuantificación del DNA.....	50
VI.I.IV Verificación de la integridad del DNA .....	50
VI.I.VI Amplificación de la construcción CsPP16+Defensina .....	50
VI.I.VII Electroforesis del producto de PCR.....	52
VI.I.VIII Purificación del producto de PCR .....	52
VI.I.IX Obtención de clonas (CsPP16-Defensina).....	53
VI.I.X Transformación de células competentes por electroporación .....	53
VI.I.XI Selección de colonias transformadas.....	55
VI.I.XII Análisis de restricción para corroborar presencia del inserto .....	55
VI.I.XIV Linealización del plásmido para recombinación con el vector binario.....	56
VI.I.XV Sub-clonación en vector binario (expresión).....	57
VI.I.XVI Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> por electroporación .....	58
VI.I.XVII Conservación de cepas .....	59
VI.II Obtención de plantas transgénicas de soya ( <i>Glicine max</i> ) .....	59
VI.II.I Esterilización de las semillas .....	60
VI.II.II Preparación de <i>Agrobacterium</i> .....	60
VI.II.III Imbibición de semillas .....	61

VI.II.IV Preparación de explantes para la infección .....	61
VI.II.V Co-cultivo .....	62
VI.II.VI Inducción de brotes .....	62
VI.II.VII Elongación de brotes .....	63
VI.II.VIII Enraizamiento de plantas.....	63
VI.II.IX Aclimatación de las plantas .....	64
VI.III Análisis de las plantas transgénicas .....	64
VI.III.I PCR punto final para detección de transgen .....	64
VI.III.II Análisis de transcritos por RT- qPCR .....	66
VI.III.IV Extracción de RNA total de soya.....	66
VI.III.V RT-qPCR .....	67
VI.III.VI Detección de la proteína (Western-Blot).....	69
VI.III.VII Preparación de muestras para microscopía confocal .....	70
VI.III.VIII Análisis de fluorescencia por microscopía confocal .....	70
VI.IV Determinación del número de insertos por ddPCR .....	70
VII RESULTADOS .....	74
VII.I Obtención del vector de expresión .....	74
VII.II Obtención de plantas de soya transgénicas.....	79
VII.III RT-qPCR.....	84

<b>VII.V Análisis de acumulación de CsPP16-defensina por microscopía confocal</b>	86
<b>VIII DISCUSIÓN</b>	92
<b>VIII.I Obtención del vector de expresión</b>	92
<b>VIII.II Obtención de plantas de soya genéticamente modificadas</b>	93
<b>VIII.III Corroboración de plantas transgénicas</b>	94
<b>VIII.IV Corroboración de la transcripción de CsPP16-Defensina</b>	94
<b>VIII.V Corroboración de la síntesis de la proteína CsPP16-Defensina</b>	95
<b>VIII.VI Acumulación de la proteína CsPP16-Defensina en las plantas de soya</b>	96
<b>VIII.VII Detección del número de insertos de CsPP16-Defensina en el genoma de la planta</b>	96
<b>IX. CONCLUSIONES</b>	97
<b>X Bibliografía</b>	99
<b>XI ANEXO</b>	106
<b>XI.I Medio Luria Bertani</b>	106
<b>XI.II Medio Gamborg</b>	106
<b>XI.III Vitaminas B5</b>	107
<b>XI.IV Medio MS</b>	107

## Índice de figuras

Fig. 1 Centros de origen de los cultivos agrícolas (Vavilov, 1992).....	18
Fig. 2 Principales países productores (ASERCA, 2015). ....	20
Fig. 3 Principales países importadores (ASERCA, 2015) .....	21
Fig. 4 Superficie sembrada y producción nacional de soya en México (SIAP, 2015).	22
Fig. 5 Clasificación taxonómica de la soya (Ratnaparkhe, et al, 2011). ....	23
Fig. 6 Desarrollo de la planta de soya (Fer y Cainess, 1982).....	25
Fig. 7 Ciclo de infección de la roya asiática de la soya (Goellner, et al, 2010). ....	31
Fig. 8 Síntomas de la roya asiática de la soya (Terán, 2013). ....	32
Fig. 9 Modelo del modo de acción de las defensinas.....	36
Fig. 10 Mapa del plásmido Ti (McLeans, et al, 1998).....	39
Fig. 11 Maquinaria involucrada en la infección de Agrobacterium sp. a plantas (Tzifira y Citovsky, 2002).....	40
Fig. 12 Unidad de expresión a) CsPP16-Defensina y b) CsPP16-Defensina-GFP ....	48
Fig. 13 Vector utilizado, para la clonación de los productos de PCR (CsPP16). Invitrogen. ....	54
Fig. 14 Vectores usados para la expresión de CsPP16 (pB7WG2D,0; pB7WG2D,0)	58
Fig. 15 DNA plasmídico de E. coli, que contienen el gen CsPP16-Defensina. ....	74
Fig. 16 Productos de la amplificación del gen CsPP16-Defensina (~720 pb). ....	74
Fig. 17 Digestión del DNA plasmídico pCR8 <sup>TM</sup> /GW/TOPO-CsPP16-Defencina .....	75
Fig. 18 Análisis de restricción para verificar la orientación de CsPP16-Defensina ....	76
Fig. 19 Linealización de DNA plasmidico pCR8 <sup>TM</sup> /GW/TOPO-CSPP16-Defensina ...	76

Fig. 20 DNA plasmidico pB7WG2,0-CsPP16-Defencina y pB7FWG2,0-CsPP16-Defensina.....	77
Fig. 21 Amplificación del gen CsPP16-Defensina en el vector binario pB7WG2,0. ...	77
Fig. 22 Amplificación del gen CsPP16-Defensina y GFP en el vector binario pB7FWG2,0. ....	78
Fig. 23 Corroboración de la presencia del gen CsPP16-Defensina en el vector binario a partir de DNA plasmídico de A. tumefaciens.....	78
Fig. 24 Detección de la presencia del gen CsPP16-Defensina fusionado a GFP en el vector binario a partir de DNA plasmídico de A. tumefaciens. ....	79
Fig. 25 Primeros pasos de la transformación de soya 1.- esterilización de semillas, 2 y 3.- imbibición de semillas y 4.- incisión de semillas.....	80
Fig. 26 Panel 1.- cotiledones agro-infiltradas 2.- cotiledones en medio de Co-cultivo 3.- lavado de explantes 4.- explantes en medio de inducción de brotes. ....	80
Fig. 27 Explantes en medio de inducción de brotes 1.- Una semana, 2.- Tres semanas y 3.- Cuatro semanas. ....	81
Fig. 28 Panel 1.- Explantes en cajas magenta con medio de inducción de brotes 2.- Explantes en medio de elongación de brotes.....	81
Fig. 29 Explantes en medio de elongación de brotes 1.- Explante una semana después, 2 y 3.- Explantes dos semanas después, donde ya aparecen las raíces. ..	82
Fig. 30 Plantas transgénicas en tierra después de una semana del cambio. ....	83
Fig. 31 Corroboración de la inserción del gen CsPP16-Defensina en plantas de soya. ....	83
Fig. 32 Corroboración de la inserción del gen CsPP16-Defensina fusionado a GFP, en plantas de soya.....	84

Fig. 33 Análisis de la expresión génica de plantas de soya transformadas genéticamente.....	85
Fig. 34 Análisis de expresión de la proteína CsPP16-Defensina fusionada con GFP. ....	86
Fig. 35 Imagen confocal de la superficie del haz de hojas de soya a) GM y b) WT...87	
Fig. 36 Fig. 36 Margen de hojas de soya A) Tricomas con presencia de GFP en plantas GM, B) Tricomas sin presencia de GFP en plantas WT. ....	87
Fig. 37 Imagen confocal del haz de la hoja expresando GFP fusionada a Defensina y CsPP16 en haz (A y C) y cortes longitudinales de hojas de soya (B y D), A y B plantas GM, y C y D plantas WT. ....	89
Fig. 38 Escaneo en cortes trasversales del tallo de plantas de soya A) GM y B) WT. ....	90
Fig. 39 Determinación de número de copias insertadas en el genoma de soya .....	91

## Índice de tablas

Tabla 1 Principales cultivos en riego y valor de su producción (SIAP, 2012).....	33
Tabla 2 Ejemplo de antimicrobianos usados en cultivos agrícolas. ....	35
Tabla 3 Oligos usados para amplificar CsPP16-Defensina.....	51
Tabla 4 Mezcla de reacción para amplificar CsPP16-defensina. ....	51
Tabla 5 Programa empleado en el termociclador.....	52
Tabla 6 Mezcla de análisis de restricción.....	55
Tabla 7 Mezcla de restricción para verificar orientación. ....	56
Tabla 8 Mezcla digestión (linealizar). ....	57
Tabla 9 Secuencia de los oligos usados para la RT-qPCR.....	66
Tabla 10 Mezcla de reacción para la RT-qPCR.....	68
Tabla 11 Programa de amplificación para la RT-qPCR .....	69
Tabla 12 Digestión DNA genómico de soya.....	71
Tabla 13 Mezcla de defensina y cox para el análisis de número de copias.....	71
Tabla 14 Mezcla de reacción para determinar el número de copias. ....	72
Tabla 15 Programa usado para el termociclador. ....	73
Tabla 16 Cultivares usados para la transformación genética de soya. ....	79
Tabla 17 Cepas crio-conservadas.....	92

## RESUMEN

La soya (*Glycyne max* L.) es la oleaginosa de mayor importancia a nivel mundial por su alto contenido de aceites y proteínas, además de ser un cultivo apto para la alimentación humana y animal. Por ser nuestro país un importador de soya, es necesario implementar estrategias de control de plagas y enfermedades que permitan mejorar la producción para reducir las importaciones de este cultivo.

Hace más de 100 años se reporta por primera vez en el continente asiático al agente causal de la roya asiática de la soya (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow & Sydow), este hongo ha ocasionado grandes pérdidas económicas y por tal motivo es considerada una enfermedad devastadora. Hasta el momento el control de esta enfermedad a base de fungicidas no ha mostrado ser del todo eficaz, las condiciones bajo las cuales se desarrolla esta enfermedad limitan la aplicación de los agroquímicos, lo anterior aunado a que hasta el momento no existen cultivares resistentes a la roya asiática de la soya, y con ello se deja a los productores desprotegidos ante este problema.

La ingeniería genética aplicada en plantas ofrece la posibilidad de obtener plantas resistentes a esta enfermedad, con el fin de que la producción de soya ya no se vea seriamente afectada en nuestro país.

El presente trabajo se enfoca en la producción de plantas de soya genéticamente modificada con potencial resistencia a la roya asiática. Para lo cual se diseñó la estrategia de expresar al antimicrobiano defensina, que tiene la capacidad de desestabilizar la membrana plasmática de hongos y bacterias.



## ABSTRACT

The soybean (*Glycine max* L.) is the most important oilseed worldwide because of its high content of oils and proteins. Considering our country is an importer of soybean products, it is necessary to implement strategies to improve its culture in Mexico; in particular, those involving pest control.

Over 100 years ago it was reported for the first time the causal agent of Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow & Sydow) in China. This fungus has caused important economic losses, because of the severity of the damages in the culture. So far, the disease control is based on the use of fungicides; however, despite of the efforts, its control has not been fully effective. Currently, there are not resistant cultivars to the Asian soybean rust, and biotechnological strategies are seen as an alternative to solve this problem. Genetic engineering in plants offers the possibility of obtaining resistant plants to this disease, by expressing new traits with the capacity of controlling the present challenge in soybean.

This work focuses on the production of genetically modified soybean plants with potential resistance to Asian rust. For this the strategy, the antimicrobial defensin was expressed, which has the capacity to destabilize the plasma membrane of fungi and bacteria.

## I INTRODUCCIÓN

La soya (*Glycine max* (L) Merrill), es una planta de origen chino cuyo nombre procede del vocablo japonés “de Shoy” que significa simplemente alimento. Este cultivo es de crucial importancia para la economía y es la base de la industria de aceites vegetales y concentrados para animales (Metha y Barea, 2005).

### I.1 Origen

Una gran mayoría de investigadores coinciden en que la soya se originó en las provincias nororientales de China (Fig.1) y Manchuria, ubicadas entre 35° y 45° de latitud norte, región en la que la soya era cultivada y apreciada para la alimentación humana y animal. Su domesticación ocurrió desde hace al menos 7000 años (Vavilov, 1992). En los años 2828 a.C., el emperador chino Shen Hung describió a la

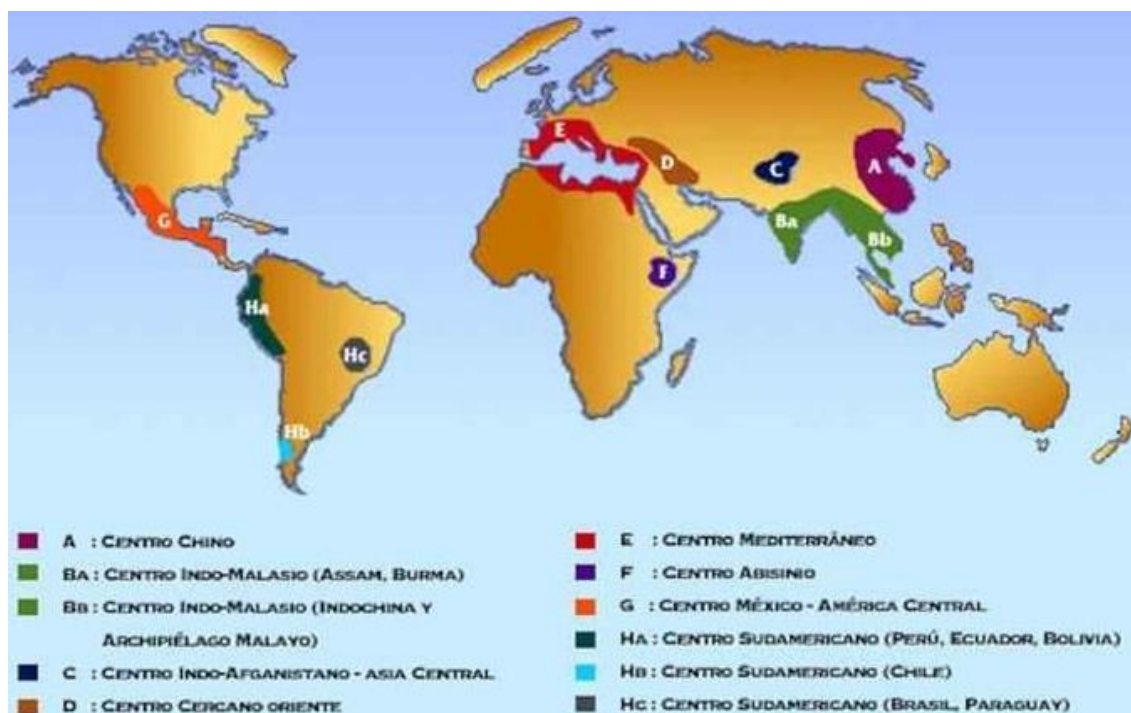


Fig. 1 Centros de origen de los cultivos agrícolas (Vavilov, 1992).

soya en sus escritos y mencionó su utilización en la elaboración de más de 300 productos medicinales.

Los granjeros de China conocían que la soya además de ser valiosa como medicina, también lo era como alimento. La identificaron como uno de los cinco granos sagrados conjuntamente con el arroz, trigo, cebada y mijo, considerados esenciales para la supervivencia de su civilización (Metha y Barea, 2005).

## **I.II Evolución**

Entre los años 200 a.C. y 300 d.C., la soya fue introducida como cultivo alimenticio al sur de China, Japón y Corea. El nombre chino de la soya “Chiang-yu”, se transformó al japonés “Show you”. La transición final a “soya”, “soja” y “Frijol soya”, no se hizo hasta que el mundo occidental descubrió a esta oleaginosa (Metha y Barea, 2005).

El cultivo fue introducido en Europa en 1712 por el botánico alemán Engelbert Kaempfer. En 1804 se introdujo en Estados Unidos de Norteamérica y en 1890 los granjeros ya disponían de hasta ocho variedades de soya. Este mismo año, el Departamento de Agricultura de aquel país inició un estudio para utilizar la soya como abono verde y alimento de ensilaje. En 1904, el investigador George Washington Carver empezó a estudiar a esta leguminosa y descubrió que sus semillas tenían aproximadamente un 38% de proteína cruda (Metha y Barea, 2005).

En Brasil y Argentina la soya fue introducida entre fines del siglo pasado e inicios del presente. En las áreas tropicales de Latinoamérica su importancia como cultivo empezó hace 50 años (Metha y Barea, 2005).

### I.III Panorama internacional de la soya

Dentro de las oleaginosas, el cultivo de soya (*Glycine max* (L) Merrill), es la que tiene mayor importancia a nivel mundial debido a su alto contenido de proteínas y aceites, la FAO reporta que es el producto agrícola de mayor importación en el mundo (Liu, *et al*, 2008). En el contexto internacional, Estados Unidos (EU) es el principal productor, seguido de Brasil, Argentina, China e India (Fig. 2) (ASERCA, 2015).

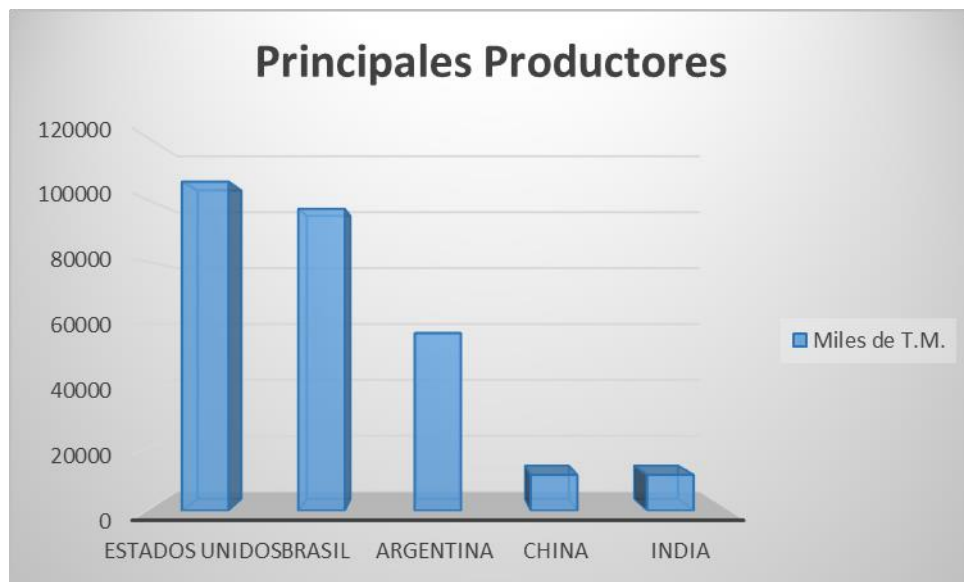


Fig. 2 Principales países productores (ASERCA, 2015).

El año pasado México produjo 387 366 toneladas lo cual hace que se ubique dentro de los primeros 20 países con mayor producción a nivel mundial.

La soya es la base alimenticia de muchos países y por ser una excelente fuente de proteínas la hace el producto agrícola de mayor importación a nivel mundial. Los principales países importadores son: 1.- Japón, 2.- Estados Unidos, 3.- México, 4.- Corea del Sur, 5.- Egipto (Fig. 3) (ASERCA, 2015), es de notarse que nuestro país

no es autosuficiente, puesto que ocupamos el tercer lugar de esta lista, las pérdidas producidas por la roya asiática de la soya, provocan inestabilidad en el precio de esta leguminosa, derivado de un desabasto en la demanda de los principales países consumidores.



Fig. 3 Principales países importadores (ASERCA, 2015).

#### **I.IV Panorama nacional de la soya**

La introducción de la soya en México se debió a la implementación de un programa gubernamental para combatir la desnutrición en niños de escasos recursos que no podían acceder a fuentes de proteínas de origen animal como la leche y el huevo (Torres y Tovar-Palacios, 2009).

Dentro de las características ventajosas que posee la soya se encuentran: elevadas concentraciones de lisina, aminoácido que es limitado en la mayor parte de las proteínas de origen vegetal, por ejemplo el maíz, arroz y trigo consumidos en lugares con gran desnutrición, al combinar la soya con alguno de los cereales antes

mencionados se obtiene un alimento con mayor valor nutricional (Torres y Tovar-Palacios, 2009).

En México se siembran 211, 531 hectáreas de soya en 13 estados; sin embargo los que cuentan con la mayor superficie sembrada son: Tamaulipas, San Luis Potosí, Campeche, Veracruz y Chiapas, quienes concentran más de la mitad de la superficie sembrada (Fig. 4) (SIAP, 2014).

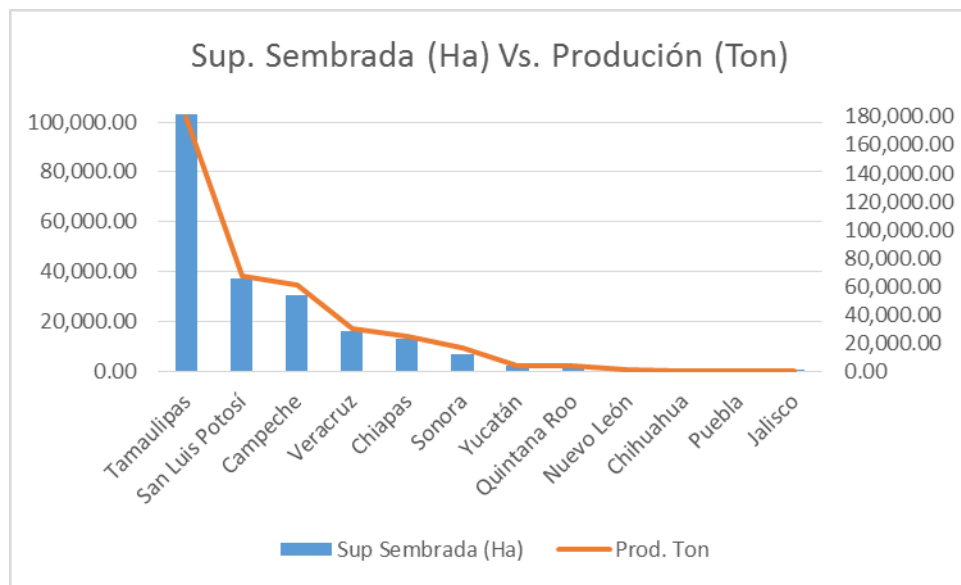


Fig. 4 Superficie sembrada y producción nacional de soya en México (SIAP, 2015).

La producción nacional de soya es de 387 366 toneladas, de las cuales más del 50% son producidas por 5 estados, en orden de producción queda de la siguiente manera; Tamaulipas, San Luis Potosí, Campeche, Veracruz y Chiapas (Fig. 4). El valor de producción es de más de 2 mil millones de pesos anuales (ASERCA, 2015).

## I.V Generalidades del cultivo

La clasificación taxonómica de soya es la siguiente (Ratnaparkhe, *et al*, 2011):

DIVISIÓN	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	Magnoliopsida
ORDEN	Fabales
FAMILIA	Fabaceae (Leguminosae)
SUBFAMILIA	Papilionoideae
TRIBU	Phaseoleae
SUBTRIBU	Glycininae
GÉNERO	<i>Glycine</i> Willd
ESPECIE	<i>Glycine max</i> (L.) Merr

Fig. 5 Clasificación taxonómica de la soya (Ratnaparkhe, *et al*, 2011).

## I.VI Fases de desarrollo de la soya

La descripción más usada de las fases de desarrollo de la soya tanto vegetativa como reproductiva es la descrita por Fehr y colaboradores (1971), las cuales se describen a continuación (Fig. 6):

### I.VI.I Fase vegetativa de la soya

- VE (Emergencia): Emergencia de los cotiledones sobre la superficie del suelo.
- VC (Etapa cotiledonar): Cotiledones expandidos con las hojas unifoliadas de tal modo que los bordes de las hojas no se toquen.

- $V_1$  (Primer nudo): Hojas unifoliadas expandidas, con la primera hoja trifoliada abierta de tal modo que los bordes de cada folio no se toquen.
- $V_2$  (Segundo nudo): Primer trifolio expandido y la segunda hoja trifoliada abierta de tal modo que los bordes de cada foliolo no se toquen.
- $V_3$  (Tercer nudo): Segundo trifolio expandido y la tercera hoja trifoliada abierta de tal modo que los bordes de cada trifolio no se toquen.
- $V_n$  (Enésimo nudo): Enésimo nudo con trifolio abierto sobre tallo principal, con hojas trifoliadas abiertas, antes de la floración.

#### **I.VI.II Fase reproductiva de la soya**

- $R_1$  (Inicio de la floración): Una flor abierta en cualquier nudo del tallo principal.
- $R_2$  (Floración completa): Una flor abierta en uno de los nudos superiores del tallo principal con hojas totalmente desplegadas.
- $R_3$  (Inicio de floración de vainas): Una vaina de 5 mm de largo en uno de los 4 entrenudos superiores.
- $R_4$  (Vainas formadas): Vaina con 2 cm en alguno de los cuatro entre nudos superiores.
- $R_5$  (Inicio de la formación de semillas); Cuando la vaina, en algunos de los cuatro entrenudos superiores empieza a llenar y el grano tenga el tamaño de una lenteja.
- $R_6$  (Semilla completamente desarrollada): Cuando la vaina en alguno de los entrenudos superiores, tenga el grano del tamaño de un chícharo, el follaje de la planta es verde aún.



- R<sub>7</sub> (Inicio de la maduración): Las vainas en alguno de los cuatro entre nudos superiores empieza a tomar un color amarillo tenue, las hojas se tornan amarillas y empiezan a caer.
- R<sub>8</sub> (Maduración completa): Cuando las vainas tienen un color café o gris en alguno de los cuatro entrenudos superiores.



Fig. 6 Desarrollo de la planta de soya (Fer y Caines, 1982).

## **I.VII La roya asiática de la soya**

La roya asiática de la soya (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow & P. Sydow) es una de las enfermedades más devastadoras del cultivo de soya, debido a que un mal manejo de esta enfermedad puede llegar a ocasionar pérdidas superiores al 70% de la producción, lo cual depende también de la susceptibilidad del cultivar, la etapa de desarrollo de la planta y la severidad del patógeno (Bromfield, 1984) (Li, *et al*, 2010). Este patógeno estuvo confinado por más de 20 siglos en el continente asiático, hasta que en los años 90's inicio su dispersión a nivel mundial; también debido a la introducción de este cultivo en otros países (Miles, *et al*, 2003).

### **I.VII.I Distribución geográfica**

Los reportes de esta enfermedad a nivel mundial indican su presencia en los siguientes países:

**Asia:** Japón, India, Rusia, Corea, China, Taiwán, Filipinas, Nepal, Corea, Vietman, Myanmar, Bangladesh, Camboya, Laos, Malasia, Indonesia, Filipinas (USDA-APHIS, 2015).

**África:** Kenia, Ruanda, Uganda, Zambia, Zimbabwe, Mozambique, Nigeria, Sur África (USDA-APHIS, 2015).

**América:** Paraguay, Brasil, Argentina, Bolivia, Uruguay, México, Estados Unidos (USDA-APHIS, 2015).

**Europa:** Hasta el momento es el único continente donde aún no se ha reportado la presencia de este patógeno (Santospietro, 2005; Du Preez, *et al*, 2005; EPPO, 2008).

**Oceanía:** Australia (USDA-APHIS, 2015).

### **I.VII.II Situación de la roya asiática de la soya en México**

El primer reporte de la roya asiática de la soya en nuestro país fue en el año 2006, en plantaciones comerciales sembradas con cultivares Huasteca 400, de los municipios de Ébano y Tamuín en el Estado de San Luis Potosí (Cárcamo y Aguilar, 2006).

Actualmente se ejecutan actividades de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria en el cultivo de soya, frijol, jícama, garbanzo y hospedantes alternos, con el fin de detectar oportunamente la presencia de la roya asiática de la soya a través de las acciones de exploración, parcelas centinelas y rutas de vigilancia (SINAVEF, 2015).

Estas actividades se realizan en los estados de: Campeche, Chiapas, Guerrero, Guanajuato, Estado México, Morelos, Nayarit, San Luis Potosí, Sinaloa, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán (SINAVEF, 2015).

En 2013, se detectaron plantas de jícama positivas a esta enfermedad en Guerrero, Veracruz, Nayarit y Guanajuato. Asimismo, se detectaron plantas positivas de frijol en Nayarit, Tamaulipas. Se detectó la presencia de esta enfermedad en San Luis Potosí, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán y Guerrero en plantaciones de soya. En 2014 se detectaron muestras positivas de frijol en Yucatán. En el cultivo de jícama en Nayarit, Morelos y Guerrero, detectándose también en frijolillo. En el cultivo de soya

se presentaron positivas a roya en Tamaulipas y en Guanajuato. Con base en lo anterior y de acuerdo con la Norma Internacional de Medidas Fitosanitarias No. 8, el estatus de la roya asiática de la soya es presente sólo en algunas áreas con cultivos hospedantes (SCOPE<sub>MX</sub>, 2015).

### **I.VII.III Aspectos biológicos de la roya asiática de la soya**

Los hongos que causan royas (Uredinales) son parásitos obligados, debido a que necesitan tejidos vivos para poder crecer y reproducirse. Tienen ciclos de vida complejos, de hasta 5 fases esporulantes diferentes y muchos requieren de dos hospedantes diferentes para poder completar su ciclo de vida (Goellner, et al, 2010).

### **I.VII.IV Epidemiología**

En general son parásitos hospedante-específicos, a veces causando daños en una sola especie hospedera o solo en especies pertenecientes a un mismo género de hospederos, mientras que otras especies pueden infectar una cantidad de plantas diferentes pertenecientes a géneros distintos. *P. pachyrhizi* puede infectar otros hospederos pertenecientes a la familia Fabaceae. *P. pachyrhizi* produce uredias y telias en hospedantes leguminosos. Las etapas de espermogonio y aecio de esta roya aún son desconocidas, en la mayoría de los hongos estas etapas son el momento en el cual se reproducen de manera sexual y debido a que no se conocen en *P. pachyrhizi*, no es claro cómo lleva a cabo la recombinación sexual. Para la mayoría de las royas las fases de espermogonio y aecio ocurren en hospedantes alternos, pero se desconoce algún hospedante alternativo para la roya asiática de la soya (Kirk, et al, 200).

#### **I.VII.V Ciclo de vida de *Phakopsora pachyrhizi***

La uredospora es la forma asexual de *P. pachyrhizi*, este estado reproductivo es conocido como el causante de la infección en las plantas hospederas. Las uredosporas producidas en la uredia se liberan con ayuda del viento. La penetración de la lámina foliar se realiza directamente por las aberturas estomáticas; es en esta etapa donde se forma el apresorio, esto provoca el colapso, la desorganización y signos de muerte de las células epidermicas (Koch, *et al*, 1983) (Keogh, *et al*, 1980). La infección continúa con el crecimiento de la hifa a través de las células epidermicas y alcanza los espacios intracelulares, hasta formar un tabique que la separa de la hifa primaria, la cual posteriormente se ramifica en hifas secundarias y finalmente las células madre del haustorio se diferencian cerca de las células del mesófilo (Koch, *et al*, 1983). La formación del primer haustorio ocurre de 24 a 48 horas después del contacto inicial entre uredosporas y el hospedante susceptible. A partir de entonces, se produce la colonización intensa de los tejidos del mesófilo y los espacios intracelulares de las hojas se llenan con micelio del hongo. El ciclo primario de la enfermedad se completa cuando se desarrollan uredias y uredosporas (Koch, *et al*, 1983), lo cual ocurre de 5 a 8 días de la infección inicial en las hojas. Lo que propicia un nuevo ciclo del hongo en la misma planta durante el mismo ciclo del cultivo, a esto se le conoce como infección policíclica (Miles, *et al*, 2007).

### **I.VII.VI Agroclimatología de la roya asiática de la soya**

El alcance geográfico logrado por esta enfermedad en los últimos años pone de manifiesto una gran capacidad de adaptación de *P. pachyrhizi* a los límites ambientales.

No obstante, la difusión y el desarrollo de la enfermedad requieren de ciertas condiciones climáticas para que se cumplan diferentes etapas de patogénesis.

Debido a su pequeño tamaño y resistencia, las esporas poseen una capacidad para recorrer grandes distancias, muchas veces del orden de varios miles de kilómetros, llevadas por los vientos. Esta habilidad ha permitido que la enfermedad se difunda gradualmente desde su área de origen del continente Asiático hacia las zonas de cultivos que se fueron instalando en los diversos continentes.

Además, la germinación de uredosporas, penetración, incubación e infección requieren ciertas condiciones ambientales, sobre todo en lo se refiere a humedad y temperatura que regulan la frecuencia y la peligrosidad del ataque.

En general, las condiciones que favorecen el buen desarrollo de la soya, son también las condiciones más adecuadas para esta enfermedad (Miles, *et al*, 2003) temperaturas de 18 a 25°C y humedad relativa alta 75-80% que permita la presencia de rocío en la planta, son las condiciones óptimas para el desarrollo de la enfermedad, aunque la germinación de las esporas puede ocurrir con un mínimo de 6 horas de rocío y temperaturas de entre 8 y 36°C (Ploper, 2004). En condiciones óptimas las esporas germinan de una a cuatro horas después de la deposición en la

superficie de la hoja la penetración de la hoja ocurre en 6 horas a temperaturas de 20 a 25°C (Fig. 7). La mayor tasa de infección se presenta con periodos de 10 a 12 horas de rocío; la interrupción del rocío produce bajas tasas de infección (Hartman, *et al*, 2004). Temperaturas de bajo de los 15°C y arriba de los 28°C, reducen el número de lesiones y hacen más lento el desarrollo de la enfermedad (Hartman, *et al*, 2004).

## Ciclo de infección de la roya

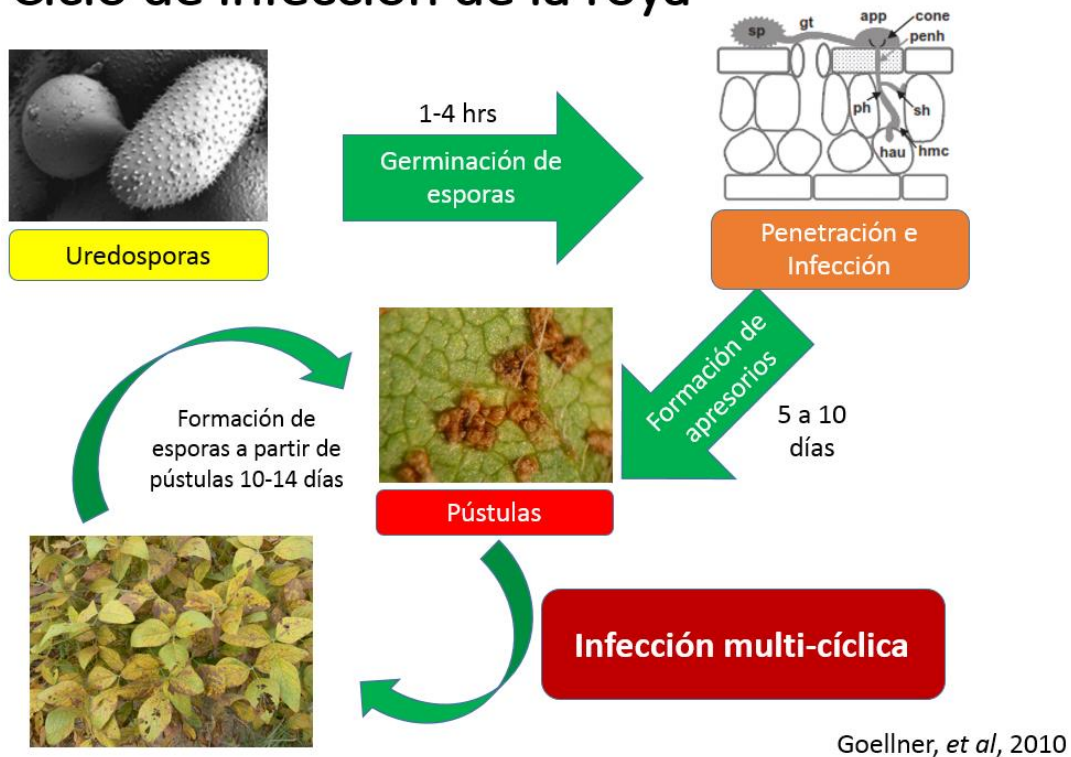


Fig. 7 Ciclo de infección de la roya asiática de la soja (Goellner, *et al*, 2010).

### I.VII.VII Síntomas

La soja es susceptible al ataque de la enfermedad en cualquier etapa de desarrollo; sin embargo, la mayor susceptibilidad se presenta durante la floración. Los síntomas

generalmente se presentan en toda la parte aérea de la planta poco antes, o durante la floración y llenado de grano, apareciendo primeramente pequeñas lesiones amarillentas de aproximadamente 1 mm de diámetro en el haz de las hojas inferiores, conforme avanza la enfermedad hacia el tercio medio superior de la planta, las hojas se tornan amarillentas y las lesiones se manifiestan como pústulas pequeñas de color marrón-amarillento a marrón-rojizo u oscuros (Fig. 7). Las lesiones se presentan en el tercio inferior como consecuencia de una mayor humedad y baja luminosidad (Terán, 2013).

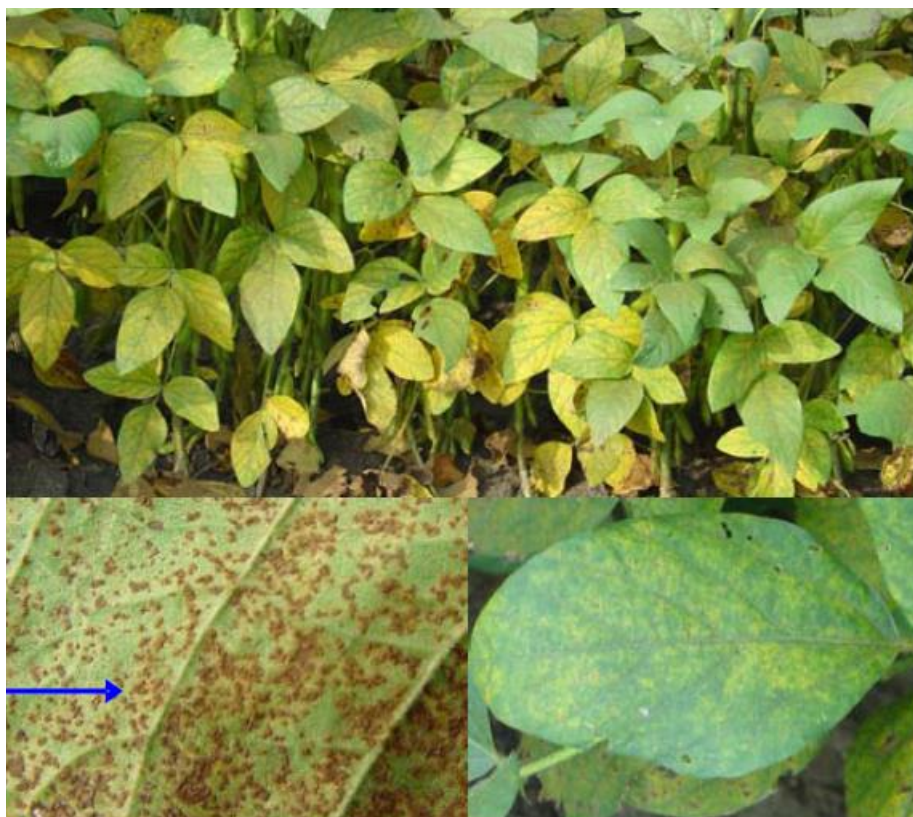


Fig. 8 Síntomas de la roya asiática de la soya (Terán, 2013).

Los síntomas de la roya pueden ser confundidos con otras enfermedades de la soya, como la mancha marrón causada por el hongo *Septoria* sp., pústula bacteriana



causada por *Xanthomonas sp.*, y mildiú veloso causado por *Peronospora manshurica*; principalmente; sin embargo, en ningún caso se observa la formación de pústulas en el envés de la hoja (Terán, 2013).

### **I.VII.VIII Principales cultivos en riesgo**

Los principales cultivos en riesgo (Tabla 1), ante la presencia de esta enfermedad se presentan a continuación (SIAP, 2012):

Tabla 1 Principales cultivos en riego y valor de su producción (SIAP, 2012).

Cultivo	Valor de la producción (miles de pesos)
Frijol	6 889 765.84
Garbanzo	647 040.32
Haba	116 026.33
Jícama	440 863.06
Soya	1 289 273.84
<b>Total</b>	<b>9 382 969.39</b>

### **I.VIII Control de la enfermedad**

Para el control de la roya asiática de la soya se utilizan el control cultural y el control químico.

#### **I.VIII.I Control cultural**

El control cultural está basado en la prevención de la enfermedad mediante el uso de fechas de siembra, es decir sembrar en fechas específicas del año para evitar que el

crecimiento del cultivo no se traslape, con las fechas de mayor incidencia de esta enfermedad. También se implementa el monitoreo para atacar el hongo durante los primeros días de la infección.

### **I.VIII.II Control químico**

El control químico a base de fungicidas, tiene como objetivo la reducción de la carga de esporas en las hojas inferiores y la protección de las hojas medias y superiores. Sin embargo, el momento de la aplicación de los fungicidas dependerá de que se presenten las condiciones climáticas favorables para la enfermedad, la presencia y severidad de la misma, la edad de las plantas y principalmente por la eficiencia del plaguicida seleccionado (Yorinori, *et al*, 2004). Por otra parte, la eficiencia del control dependerá de la aplicación, la sistematicidad y eficiencia del fungicida, el equipo de aplicación, tipo de aplicación (terrestre o aérea), boquillas utilizadas, volumen de agua, tamaño de las gotas y las condiciones climatológicas al momento de la aplicación (Yorinori, *et al*, 2004).

Se ha demostrado que el Mancozeb es un producto eficiente para el control de la enfermedad. El uso de los triazoles (tebuconazole y tetraconazole) y el de las estrobilurinas (azoxystrobin y pyroclostrobin) también han mostrado buenos resultados para el control de esta enfermedad.

### **I.IX Uso de antimicrobianos en la agricultura**

La mayoría de los organismos vivos, incluyendo plantas y animales, cuentan con mecanismos de defensa los cuales son de gran utilidad a la hora de enfrentarse al ataque de patógenos, junto con los cuales han evolucionado (Rojas y Zamora, 2009).

Lo cual los ha llevado a desarrollar complejos sistemas de defensa, que pueden ser barreras físicas y químicas. Dentro de las barreras químicas se encuentran un grupo de proteínas de bajo peso molecular denominadas péptidos antimicrobianos (AMP's) (Rojas y Zamora, 2009).

La ingeniería genética ofrece la alternativa de obtener plantas resistentes a enfermedades producidas por estrés abiótico o biótico, usando métodos de transformación genética que permitan obtener en periodos cortos plantas genéticamente modificadas que expresen proteínas con capacidad antimicrobiana

Se han reportado el uso de diferentes antimicrobianos en plantas, para combatir enfermedades causadas por bacterias y por hongos (Tabla 2.), como lo son; *Erwinia caratovora* y *Fusarium oxysporum* (Nakajima, *et al*, 1997); (Xin-Wu, *et al*, 2005).

Tabla 2 Ejemplo de antimicrobianos usados en cultivos agrícolas.

Cultivo	Patógeno	Antimicrobiano usado
<b>Papa</b>	<i>Verticillium dahliae</i> and / <i>Alternaria Solani</i>	Defensina de alfalfa ( Gao, <i>et al</i> , 2000)
<b>Tabaco</b>	<i>Phytophthora parasítica</i>	Defensina (Park, <i>et al</i> , 2002)
<b>Tomate</b>	<i>Alternaria solani</i>	Defensina (Schaefer, <i>et al</i> , 2005)
<b>Mango</b>	Hongos filamentosos	Defensina J1 (Rivera, <i>et al</i> , 2011)
<b>Frijol</b>	<i>Colletotrichum lindemutianum</i>	Defensina (Espinoza, <i>et al</i> , 2013)
<b>Banano</b>	Hongos filamentosos	Defensina (Upendra, <i>et al</i> , 2014)
<b>Algodón</b>	<i>Fusarium oxysporum</i> / <i>Verticillium dahliae</i>	Defensina NaD1 (Gaspar, <i>et al</i> , 2014)

### I.IX.I Antimicrobiano defensiva

Las defensinas son proteínas ricas en cisteína, se sintetizan en vertebrados e invertebrados y funcionan como antibióticos naturales que se hallan en la superficie de la piel. Son activas contra bacterias, hongos y virus enclaustrados. La mayoría de las defensinas actúan al penetrar la membrana plasmática microbiana por medio de la atracción eléctrica y, una vez que han penetrado, forman un poro en la membrana que genera su lisis.

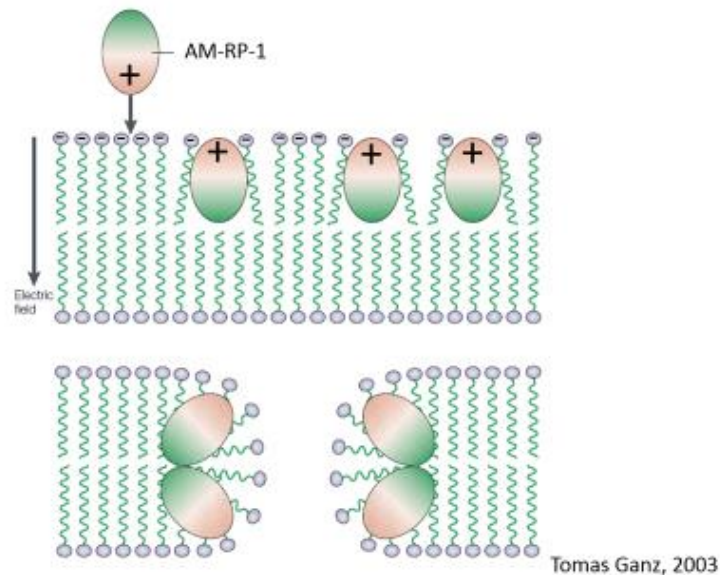


Fig. 9 Modelo del modo de acción de las defensinas.

Adicionalmente, agentes potenciales se sintetizan como péptidos naturales dentro de nuestro organismo: los antimicrobianos. Dentro de éstos, los de más ubicua expresión en humanos son las defensinas. Las defensinas son péptidos altamente conservados en la escala evolutiva formando parte de la respuesta inmune innata, tienen un tamaño de 2–5 kilodaltons (típicamente de 30–45 aminoácidos) y

presentan tres puentes disulfuro en su estructura terciaria. En el humano se sintetizan principalmente en epitelios y leucocitos. Sus propiedades antimicrobianas son de amplio espectro (antibacterianas, antifúngicas, antivirales) variando en efectividad microbicida según su estructura y carga catiónica neta. De acuerdo con su patrón molecular de puentes disulfuro y distribución genómica se clasifican en las familias alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) y teta ( $\theta$ ) (Ganz, 2013).

El modelo de acción de defensinas “alfombras agujero de gusano” es el siguiente (Fig. 9): la mayoría de las defensinas (mostrados como óvalos grandes) son moléculas anfipáticas que tienen grupos cargados positivamente de las cadenas laterales de amino-ácidos (rosa) e hidrofóbicas cadenas de aminoácidos laterales (verde). Esto les permite interactuar con las membranas microbianas, que se muestran esquemáticamente con sus grupos de cabeza de fosfolípidos cargados negativamente (azul) y cadenas de ácido graso hidrófobos (verde). La atracción electrostática y el campo de transmembrana bioeléctrica tiran de las moléculas de péptidos hacia la superficie y hacia dentro de la membrana. Como las moléculas de péptidos se acumulan en una 'alfombra', la membrana se desestabiliza, provocándola transición de la conformación de péptidos en otra disposición (mostrada en el panel inferior) que reduce la tensión, dando como resultado la formación de "agujeros de gusano de la membrana o poros” (Ganz, 2013).

Las defensinas han demostrado ser eficaces para el control de hongos filamentosos (Gaspar, *et al*, 2014), por tal motivo es un excelente candidato para el control de la roya asiática de la soya.

## **I.X Transformación de plantas mediadas por *Agrobacterium***

La ingeniería genética de plantas utiliza mecanismos naturales para la obtención de plantas genéticamente modificadas, tal es el caso de *Agrobacterium*; bacteria de importancia agrícola, que posee la capacidad de infectar un amplio rango de plantas, esta produce una enfermedad conocida como agalla de la corona, inclusive hay quienes la conocen como cáncer de las plantas, ya que producen un tumor en la planta que crece conforme avanza el tiempo. Las dos especies de *Agrobacterium* más usadas en la transformación de plantas son *A. tumefaciens* y es fácilmente identificable ya que produce tumores o agallas en las plantas. *A. rhizogenes* produce proliferación de raíces pilosas. Las bacterias nativas son capaces de modificar el metabolismo de las plantas, induciendo la producción de aminoácidos modificados conocidos como opinas, las cuales son indispensables para el metabolismo de estas bacterias (Estrada-Navarrete, *et al*, 2007).

Los tumores producidos son el resultado de la integración estable de un fragmento de DNA de la bacteria en el genoma de la planta, el cual interviene en los cambios metabólicos, este fragmento de DNA de la bacteria es conocido como T-DNA (Transfer DNA), y contiene los genes responsables de la transferencia e inserción del DNA y se encuentra dentro del plásmido Ti (Tumor induction) (Fig. 9). (Zupan, *et al*, 1996) (Zambbryski y Krawford, 2000).

El T-DNA está delimitado por 2 bordes, los cuales son conocidos como la maquinaria de transferencia; es decir cualquier fragmento de DNA que se encuentre dentro de estos bordes será transferido al genoma de la planta, estos bordes reciben los nombres de borde derecho (RB, Right Border) y borde izquierdo (LB, Left Border). (McLeans, *et al.*, 1998).

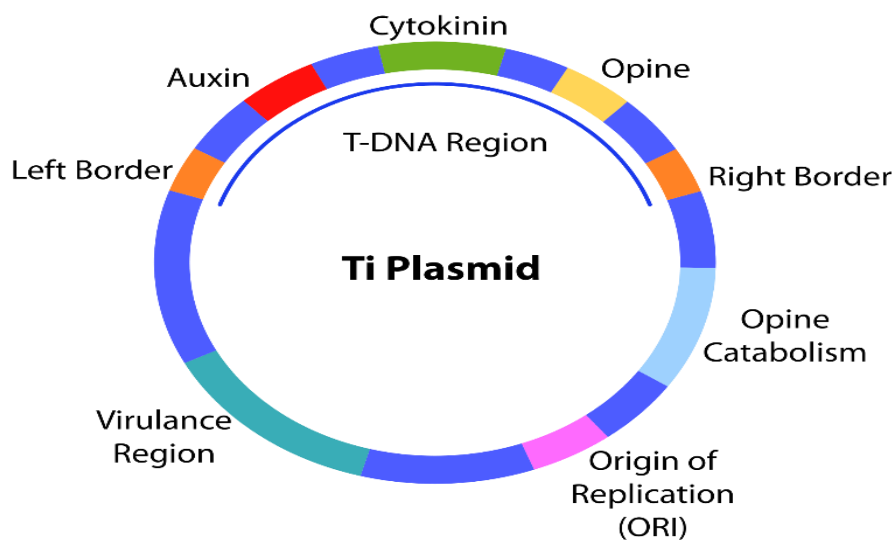


Fig. 10 Mapa del plásmido Ti (McLeans, *et al.*, 1998).

*Agrobacterium* posee una maquinaria genética y bioquímica que interactúa en el proceso de infección, el cual es complejo y no solo depende de la bacteria sino también del sistema de las plantas (Tzifira y Citovsky, 2002).

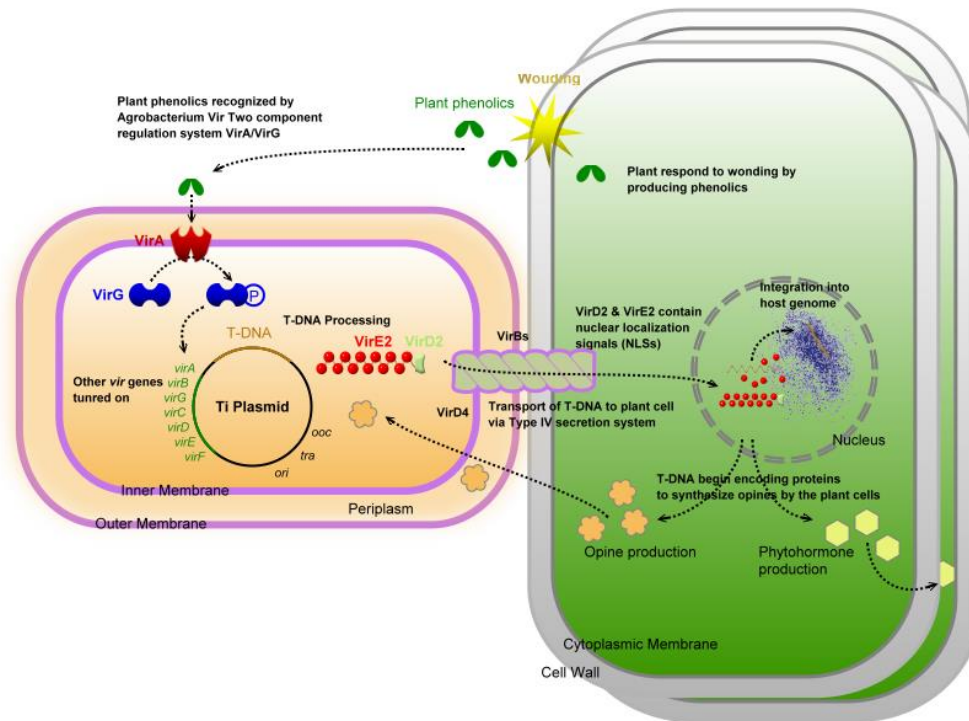


Fig. 11 Maquinaria involucrada en la infección de *Agrobacterium sp.* a plantas (Tzifira y Citovsky, 2002).

La región de los genes *Vir* (genes de virulencia) consta de casi 20 genes, los cuales están divididos en operones que juegan distintas funciones en el proceso de infección: *VirA*, codifica proteínas que regulan los genes *Vir*, es el receptor de los compuestos fenólicos. *VirB*, determina el sistema de transferencia conjugativo. *VirC*, estimula la formación de tumores. *VirD2*, se une covalentemente al T-DNA en su extremo 5' y determina la transferencia ya que tiene una secuencia de localización nuclear en su extremo C-terminal. *VirE2*, recubre al T-DNA para protegerlo de nucleasas durante el trayecto del núcleo de la célula vegetal. *VirF*, viaja independiente mente al T-DNA e incrementa la eficacia de la transformación. *VirG*, codifica las proteínas que regulan los genes *Vir*, activándolos, después de que *VirA* se fosforilado en un residuo de aspartato (Zupan, *et al*, 1995) (McLean, *et al*, 1998).



## **I.XI Seguridad alimentaría**

El concepto de la seguridad alimentaria se creó a mediados de los años 70's, cuando en la Cumbre Mundial sobre la Alimentación (1974) definió la seguridad alimentaria desde el punto de vista de suministro de alimentos: asegurar la disponibilidad y la estabilidad nacional e internacional de los precios de los alimentos básicos (FAO, 2006).

“Existe la seguridad alimentaria cuando todas las personas tienen en todo momento acceso físico y económico a suficientes alimentos inocuos y nutritivos para satisfacer sus necesidades alimenticias y sus preferencias en cuanto a los alimentos a fin de llevar un activa y sana.” (Cumbre Mundial sobre la alimentación, 1996)

Alrededor de 85 millones de personas en todo el mundo sufren de subnutrición, cifra que se ha modificado poco en los últimos años, en la cumbre de 1992, se fijó el objetivo de reducir a la mitad el número de personas que sufren hambre para el 2015. Es motivo de preocupación en particular los lugares donde se concentra el hambre, caracterizados por una persistencia y frecuencia generalizadas de la inseguridad alimentaria, en especial las crisis prolongadas (FAO, 2006).

El “enfoque de doble componente” de la FAO para combatir el hambre combina la agricultura y el desarrollo rural sostenibles con programas específicamente dirigidos a incrementar el acceso directo a los alimentos para los sectores más necesitados (FAO, 2006).

## **I.XII Historia de los transgénicos en México**

La ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados, define a un organismo genéticamente modificado de la siguiente manera:

Cualquier organismo vivo, con excepción de los seres humanos, que ha adquirido una combinación novedosa, generada a través del uso específico de técnicas de biotecnología moderna (Ley OGM's, 2005).

Las plantas genéticamente modificadas tuvieron su primera incursión formal en el campo mexicano en 1989, año que se presentó ante la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) la primera solicitud para importar y liberar en campo, específicamente en el área de Culiacán, Sinaloa. El tomate tuvo la característica de resistencia a insectos, solicitud que fue aprobada y que dio la pauta para iniciar la formación de un grupo de expertos que apoyara al sector oficial en la toma de decisiones sobre futuras solicitudes de experimentación de estos productos (SENASICA, 2010).

En 1989 se formó el Comité Nacional de Bioseguridad Agrícola (CNBA), denominado posteriormente como Subcomité Especializado en Agricultura (SEA), el cual fungió como grupo asesor que apoyaba a la DGSV en la evaluación de la formación sobre solicitudes para la liberación en el campo de productos genéticamente modificados; así como en el establecimiento de regulaciones y políticas relacionadas con el tema (SENASICA, 2010).

Se seleccionaron expertos de las Instituciones de Investigación y Universidades con mayor conocimiento en el área de biotecnología, incluyendo representantes del

CINVESTAV (Centro de investigación y de Estudios Avanzados del IPN); INIFAP (Instituto de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias); UNAM (Universidad Nacional Autónoma de México); SNICS (Sistema Nacional de Investigación y Certificación de Semillas); UACH (Universidad Autónoma Chapingo); CP (Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas), Así como la SS (Secretaría de Salud). (SENASICA, 2010).

### **I.XIII Regulación de los Organismos Genéticamente Modificados en México**

El marco legal en bioseguridad de México está basada bajo acuerdos internacionales.

El Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología, es un acuerdo internacional negociado en el marco del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), suscrito y ratificado por México. Tiene como objetivo contribuir a garantizar un nivel adecuado de protección en la esfera de la transferencia, manipulación y utilización seguras de los organismos vivos modificados resultante de la biotecnología moderna. Se concentra en los movimientos transfronterizos y previene cualquier efecto adverso para la conservación y uso sostenible de la diversidad biológica, considerando los riesgos para la salud humana (AgroBio, 2012).

En el marco nacional existe la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM), el cual tiene como objetivo la regulación de las actividades con OGM's, para lo cual se centra en tres ejes principales 1) Utilización confinada, 2) Liberación al ambiente, este eje regula la fase experimental, el programa piloto y la

liberación comercial de los OGM's, y también regula la importación y exportación, 3) Comercialización (AgroBio, 2012).

Lo anterior con la finalidad de prevenir, evitar o reducir los posibles riesgos que estas actividades puedan ocasionar a la salud humana, sanidad de los cultivos, ganado y especies acuícolas, al medio ambiente y biodiversidad (AgroBio, 2012).

#### **I.XIV Soya transgénica**

La técnica de transformación de soya mediante el uso de *Agrobacterium tumefaciens* ha demostrado ser la más eficaz para la planta de soya, el T-DNA se inserta establemente y es transmitido de generación en generación. El cultivo de tejidos es clave para la generación de las plantas genéticamente modificadas.

##### **I.XIV.I Soya resistente a herbicidas**

La mayoría de las plantas de transgénicas de soya son resistentes a herbicidas, esto derivado de la necesidad de controlar malezas. Las malezas compiten con los cultivos por nutrientes y espacio aéreo, afectando directamente el rendimiento del cultivo, reduciendo la calidad del grano y representan una fuente de inóculo para diferentes enfermedades. La resistencia a herbicidas de baja toxicidad ha beneficiado a los cultivos y a los productores que invierten menos recursos para el control de malezas (Braveman, *et al*, 2003).

La resistencia de la soya al glifosato, ha tenido un beneficio de gran impacto debido a que es un herbicida de amplio espectro, y se puede aplicar en cualquier fase de desarrollo de la planta (Pacheco, 2003).

El glifosato inhibe en las plantas la producción del Enol-piruvil-shikimato-fosfato-sintetasa (EPSP), enzima esencial para la generación de tres aminoácidos indispensables para la planta (Kim, 2002)

Institutos científico independientes de Estados Unidos, Canadá, Japón, la Unión Europea y Alemania han realizado diferentes estudios en cultivos de soya genéticamente modificados, guiando se por los criterios más estrictos. Y hasta el momento todos han llegado a la misma conclusión; la soya GM no supone ningún riesgo para la salud humana y animal, y tampoco representa peligro para el medio ambiente (Kim, 2002).

#### **I.XIV.II Soya GM en México**

La soya resistente a herbicida se sembró por primera vez en 1997, como parte de pruebas experimentales, en 2010 se autorizó la siembra piloto de 26 500 hectáreas de soya tolerante a herbicida en 7 estados de la república mexicana. Para el 2011 se autorizó la siembra experimental y piloto de soya resistente a glifosato e inhibidores de enzima acetolactato sintetasa (ALS) y de alto contenido de ácido oleico. En 2012 se autoriza la siembra comercial de 253 000 hectáreas soya genéticamente modificada, en los estados de Campeche, Chiapas, Tamaulipas, San Luis Potosí, Veracruz y Yucatán. (Gutiérrez, *et al*, 2015).

## II. JUSTIFICACIÓN

El control actual de la roya asiática en soya basado en fungicidas químicos no es eficaz. Considerando la importancia del cultivo, y que México como miembro de la Organización Mundial de la Salud, tiene dentro de sus compromisos proveer a sus ciudadanos alimentos, es necesario el empleo de la biotecnología moderna para generar nuevas variedades de soya con resistencia a esta enfermedad cuarentenaria.

## III. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad de la defensina en controlar a la enfermedad conocida como roya asiática de la soya.

## IV. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Generar una unidad de expresión para soya con el marcador de resistencia a herbicida glufosinato de amonio.
- 2.- Transformar genéticamente soya con la construcción genética vía *Agrobacterium tumefaciens*
- 3.- Regenerar plantas empleando al gen de resistencia a herbicida.
- 4.- Retar a la planta con esporas del hongo *Phakopsora pachyrhizi* y evaluar su potencial resistencia.

## V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Generación una unidad de expresión para soya con el gen *ver* que provee de resistencia al herbicida glufosinato de amonio, en un vector de expresión de plantas.

Transformar genéticamente soya con la construcción genética vía *Agrobacterium tumefaciens* AGL1.

Regenerar plantas empleando al gen de resistencia a herbicida a través del uso de la regeneración con cotiledón adherido al embrión.

Retar a la planta con esporas del hongo *Phakopsora pachyrhizi* y evaluar su patogenicidad y virulencia empleando la clasificación de virulencia establecida por el SENASICA.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### VI.I Diseño de la unidad de expresión CsPP16-Defensina

En base a los resultados obtenidos previamente por el grupo de trabajo y en base a lo reportado en la literatura se decidió usar defensina humana para el control de la roya asiática de la soya, ya que ha demostrado ser un eficaz antimicrobiano para hongos. Tomando en cuenta que parte de la producción de soya se destina al consumo humano, la defensina humana no representaría problemas de inmunidad para el consumidor, pues forma parte de la defensa inmune innata y está presente en secreciones, principalmente saliva y sudor. En el extremo amino de la defensina se encuentra el gen que codifica para la proteína de floema CsPP16, que tiene la capacidad de ser supracelular al transportarse de célula a célula y a larga distancia en el floema de plantas vasculares (Xoconostle-Cázares, et al, 1999).



Fig. 12 Unidad de expresión a) CsPP16-Defensina y b) CsPP16-Defensina-GFP.

A partir de una cepa de *E. coli* proporcionada por el M.C. Miguel Guerra Lupian, se realizó la purificación del plásmido recombinante con la construcción CsPP16-Defensina y su fusión con GFP (Fig. 12 a y b). Se cultivó la cepa en medio LB (Luria Bertani) a 37°C toda la noche a 120 rpm (revoluciones por minuto), posteriormente se realizó la extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina (Birboim y Dolly, 1979),



posteriormente se verificó la calidad del DNA y también se cuantificó. Posteriormente se amplificó el gen de interés.

### **VI.I.I Secuencia del gen CsPP16-Defensina**

Gen que codifica para CsPP16 (16K)

```
ATGGGGATGGGAATGATGGAGGTCCATTTGATTAGTGGTAAAGGACTTCAAGCCCACGACCCT
CTTAATAAACCAATTGACCCTTATGCTGAGATCAACTTCAAGGGCCAAGAACGCATGAGCAAA
GTTGCTAAAAATGCAGGACCAAATCCATTATGGGATGAGAAATTTAAATTCCTAGCCGAGTAC
CCTGGGAGCGGTGGTGACTIONTCCATATCTTATTCAAGGTCATGGACCATGACGCTATAGATGGT
GATGATTACATTGGCGATGTCAAAATAGATGTCAAGAATTTATTAGCGGAAGGAGTTAGAAAA
GGAAAGTCGGAGATGCCGCCTAGAATGTACCATGTCTTAGCACACAAAATCCACTTCAAGGGA
GAAATTGAAGTTGGAGTGTCTTCAAGCTGCAAGGCGGCGGGGGATGTGGAGGATGTTACCCA
TGGGAAAACCTTAGCGGTGGTGGTGGTAGCGGTGGTGGTGGTAGCGG
```

Polilinker:

```
TGGTGGTGGTAGCGGTGGTGGTGGTAGCGCTGCTGCT
```

Defensina humana

```
ATGAGAGTTCTTTATCTTCTTTTCAGCTTCCTTTTCATTTTCCTTATGCCACTTCCAGGTGTT
TTCGGTGGTATTGGTGGTATCCAGTTACATGCCTTAAGAGCGGTGCTATTTGCCATCCAGTTTTC
TGCCCAAGAAGATATAAGCAAATTGGTACATGCGGTCTTCCAGGTACAAGATGCTGCAAGAAG
AAGTAG
```

### **VI.I.II Extracción de DNA plasmídico**

A partir del medio LB se obtuvieron las células de *E. coli*, por centrifugación a 13,000 rpm por 3 min a temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante por decantación y se repitió este paso tres veces. La pastilla celular se resuspendió en 100 µL de solución I (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM, pH8.0), luego en el mismo tubo se le agregaron 200 µL de solución II (NaOH 0.2 N, SDS 1%) y se incubó en hielo por 15 min, con la finalidad de lisar las células. Después se le agregaron 150 µL de la solución III (acetato de potasio 3M, pH 4.5), posteriormente se mezcló por inversión y se incubó 5 min en hielo. Enseguida se centrifugó la mezcla a 13,000 rpm

durante 5 min a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. A continuación se agregó un volumen de Fenol-Cloroformo-Isoamílico (25-24-1) se mezcló por inversión y se centrifugó por 5 min a 13,000 rpm. Consecutivamente, se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo y se precipitó el DNA con 2 volúmenes de etanol absoluto, se mezcló ligeramente y se incubó el tubo a -80°C por 30 min. A continuación se centrifugó la muestra por 20 min a 13,000 rpm a 4°C. Luego se eliminó el sobrenadante y la pastilla obtenida se lavó con 250 µL de etanol al 70% en tres ocasiones, la pastilla se secó a temperatura ambiente y posteriormente se resuspendió en 25 µL de agua MilliQ estéril. A continuación se le agregó 1 µL de RNasa A (10mg/mL) y se incubó a 37°C por 30 min.

#### **VI.I.III Cuantificación del DNA**

Se cuantificó la cantidad de DNA de cada una de las muestras en un Nanodrop (NanoDrop1000 Thermo Scientific).

#### **VI.I.IV Verificación de la integridad del DNA**

El DNA se analizó en electroforesis, empleando un gel de agarosa al 1.2% P/V (100 mL de TBE 0.5%, 1.2 g de agarosa).

#### **VI.I.VI Amplificación de la construcción CsPP16+Defensina**

Se realizó la amplificación de la construcción de interés, mediante PCR. Se usaron los siguientes oligonucleótidos (Tabla 3):

Tabla 3 Oligos usados para amplificar CsPP16-Defensina.

Oligo	Secuencia 5'-3'	Tamaño (pb)
<b>16K Directo</b>	ATGGGGATGGGAATGATGGAGGT	720
<b>Def Reverso (C/T)</b>	CTACTTCTTCTTGCAGCATCTTG	
<b>Def Reverso (S/T)</b>	CTTCTTCTTGCAGCATCTTGTACCTGGAGG	717

Para la amplificación se utilizó la siguiente mezcla de reacción (Tabla 4):

Tabla 4 Mezcla de reacción para amplificar CsPP16-defensina.

Componente	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
<b>H<sub>2</sub>O MilliQ estéril</b>	7.2
<b>Buffer 10 X</b>	1.25
<b>dNTP's (2.5 mM c/u)</b>	1.00
<b>16K Directo (5 <math>\mu\text{M}</math>)</b>	1.00
<b>Def Reverso C/T y S/T (5 <math>\mu\text{M}</math>)</b>	1.00
<b>Taq Polimerasa (TAKARA 0.5 U/<math>\mu\text{L}</math>)</b>	0.05
<b>Molde (DNA 50-100 ng/ <math>\mu\text{L}</math>)</b>	1.00
<b>Volumen final</b>	12.5

El programa de amplificación usado en el termociclador fue el siguiente (Tabla 5):

Tabla 5 Programa empleado en el termociclador.

<b>Amplificación CsPP16+Defensina</b>			
<b>Paso</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
<b>1</b>	94	4:00	1
<b>2</b>	94	0:30	30
<b>3</b>	60	0:30	
<b>4</b>	72	0:45	
<b>5</b>	72	4:00	1
<b>6</b>	4	∞	--

#### **VI.I.VII Electroforesis del producto de PCR**

Se preparó agarosa al 1 % P/V (100 mL de TBE 0.5%, 1.0 g de agarosa), la electroforesis se realizó a 90 Volt por 50 min, el producto de la PCR fue visualizado en un transiluminador con luz UV. La imagen se documentó usando el fotodocumentador EDAS 120 Kodak.

#### **VI.I.VIII Purificación del producto de PCR**

El producto de PCR (CsPP16+Defensina) se purificó utilizando el sistema comercial Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de realizar la electroforesis se cortaron las bandas de DNA del gel de agarosa y se pusieron en un microtubo de 1.5 mL, se agregaron 3 volúmenes de ADB, se incubó 10 min a 55°C y se mezcló gentilmente. Se transfirió la mezcla a una

columna Zymo-Spin™ en un tubo de recolección, se centrifugó 1 min a 13,000 rpm y se desechó el sobrenadante. A la columna se le agregaron 200 µL de Buffer DNA Wash, se centrifugó por 30 seg a 13,000 rpm y se desechó el sobrenadante, este paso se repitió una vez más, se pasó la columna a un tubo nuevo y se agregaron 10 µL de Buffer de elución para DNA directamente a la columna y se centrifugó por 1 min a 13,000 rpm.

#### **VI.I.IX Obtención de clonas (CsPP16-Defensina)**

El producto de PCR purificado se ligó al vector de clonación comercial pCR™8/GW/TOPO de Invitrogen (Fig. 13), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se hizo la siguiente mezcla: 2 µL de agua MilliQ estéril, 2 µL del producto de PCR purificado, 1 µL de solución salina y 1 µL del vector (pCR™8/GW/TOPO), se mezcló por pipeteo y se incubó a 22°C toda la noche. Posteriormente se utilizó la ligación para transformar células competentes de *Escherichia coli* (TOP10).

#### **VI.I.X Transformación de células competentes por electroporación**

Los viales de las células electrocompetentes TOP10 se pusieron a descongelar en hielo junto con 2 µL de la ligación, 20 min antes se puso a enfriar en hielo la cubeta de electroporación, una vez descongeladas la células se mezcló por pipeteo con el producto de ligación. Enseguida se pasó todo el volumen a la cubeta de electroporación, luego se colocó en el electroporador (EasyjecT Optima, EQUIBIO) y se dio el pulso eléctrico en la opción *E. coli* y 1 mm en distancia de electrodos de la cubeta. Inmediatamente se le agregaron 200 µL de medio LB sin antibiótico, se recuperó el volumen anterior y se colocó en un tubo de 1.5 mL nuevo, las células

transformadas se pusieron a incubar por 2 horas a 37°C en agitación. Luego la suspensión se distribuyó uniformemente en medio LB solido en cajas Petri con (Espectinomicina (Spc) 100µL/mL). Las cajas se incubaron a 37°C toda la noche, para luego seleccionar las colonias transformadas.

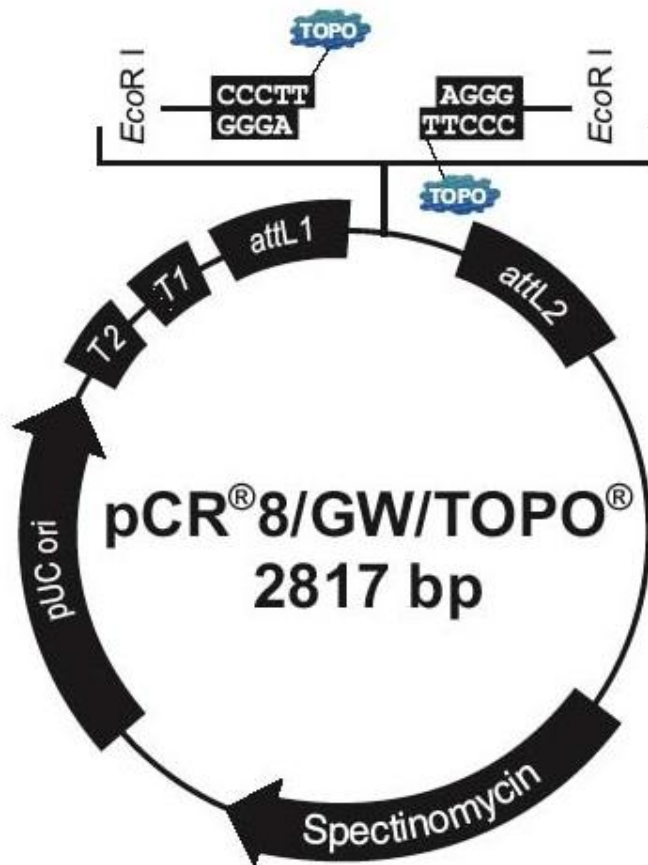


Fig. 13 Vector utilizado, para la clonación de los productos de PCR (CsPP16). Invitrogen.

### **VI.I.XI Selección de colonias transformadas**

Del crecimiento obtenido en el paso anterior se picaron con palillos estériles diez colonias por cada caja, en otra caja Petri con medio LB solido (Spc 100 µg/mL) se estriaron las colonias para así tener una caja maestra y el palillo se colocó en un tubo de ensayo el cual contenía 3 mL de medio LB líquido (Spc 100 µg/mL), los tubos de ensayo se incubaron a 37°C toda la noche en agitación y las cajas Petri se incubaron a la misma temperatura, la extracción del DNA plasmídico se realizó bajo el mismo procedimiento descrito anteriormente (VI.I.II).

### **VI.I.XII Análisis de restricción para corroborar presencia del inserto**

Una vez obtenido el DNA plasmídico, se realizó el análisis de restricción mediante una digestión con EcoRI (Tabla 6).

Tabla 6 Mezcla de análisis de restricción.

<b>Componente</b>	<b>Cantidad para 1 reacción</b>
<b>Agua MilliQ estéril</b>	5.8 µL
<b>CutSmart (10X)</b>	1.0 µL
<b>RNasa A</b>	0.1 µL
<b>Molde (DNA 5000-10 000 ng/µL)</b>	3 µL
<b>EcoRI (2 U)</b>	0.1 µL

### VI.I.XIII Análisis de restricción para corroborar orientación

Se seleccionaron las cepas que contenían el inserto y al mismo DNA plasmídico se le realizó otro análisis de restricción enzimática para verificar que los insertos tuvieran la orientación correcta (Tabla 7).

Tabla 7 Mezcla de restricción para verificar orientación.

Componente	Cantidad para 1 reacción
Agua MilliQ estéril	5 $\mu$ L
BSA (100X)	0.1 $\mu$ L
CutSmart (10X)	1.0 $\mu$ L
RNasa A	0.5 $\mu$ L
EcoRV (2U)	0.2 $\mu$ L
DraI(2 U)	0.2 $\mu$ L
Molde (DNA 5000-10 000 ng/ $\mu$ L)	3.0 $\mu$ L

### VI.I.XIV Linealización del plásmido para recombinación con el vector binario

Al DNA plasmídico de las cepas con el inserto con orientación correcta, se les realizó una tercera digestión para linealizar el plásmido (Tabla 8).



Tabla 8 Mezcla digestión (linealizar).

Componente	Cantidad para 1 reacción
Agua MilliQ estéril	37.0 $\mu$ L
Buffer 3 (10X)	6.0 $\mu$ L
BSA (100X)	0.6 $\mu$ L
RNasa A	0.4 $\mu$ L
EcoRV (20 U)	1.0 $\mu$ L
Molde (DNA 5000-10 000 ng/ $\mu$ L)	15 $\mu$ L

#### VI.I.XV Sub-clonación en vector binario (expresión)

La recombinación de los plásmidos obtenidos en el paso anterior se realizaron de la siguiente manera; CsPP16+Defensina (C/T) – pB7GW2 y CsPP16+Defensina (S/T) – pB7FGW2 (Fig. 14). Para este paso las reacciones se realizaron de la siguiente manera: 1  $\mu$ L del vector de expresión, 2  $\mu$ L del plásmido linealizado, 0.5  $\mu$ L de enzima LR Clonasa de Invitrogen y 2.5  $\mu$ L de agua MilliQ estéril, se mezclaron por pipeteo y se incubaron toda la noche a 22°C, después de haber terminado el tiempo de incubación, el producto de la recombinación fue usado para realizar la transformación de células competentes TOP10 de *E. coli*, esto se realizó bajo el procedimiento antes descrito (VI.I.X). Posteriormente se realizó la extracción de DNA plasmídico y por corroboración de PCR (VI.I.II) se seleccionaron las cepas con nuestro vector de expresión.

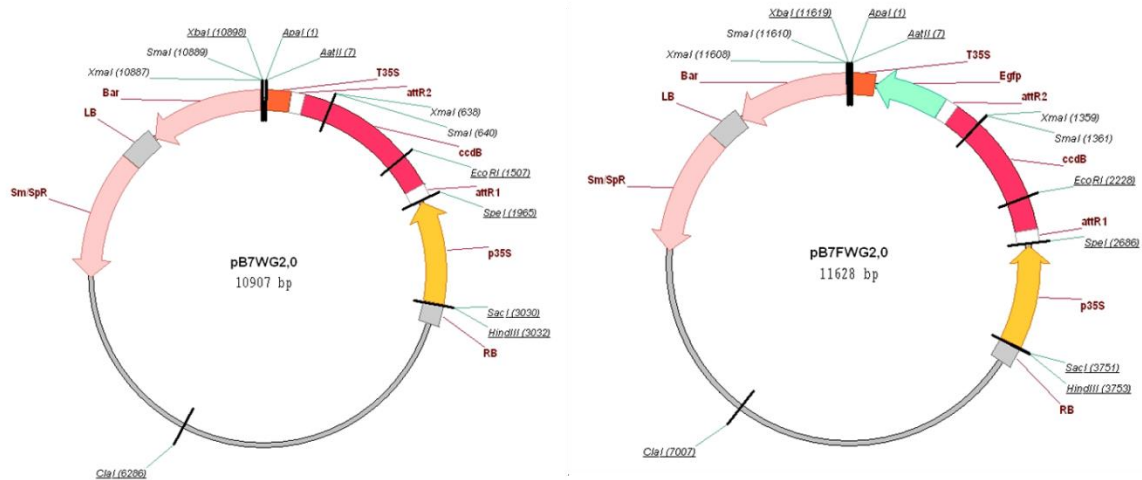


Fig. 14 Vectores usados para la expresión de CsPP16 (pB7WG2D,0; pB7WG2D,0)

### VI.I.XVI Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* por electroporación

Con los plásmidos obtenidos en el paso anterior se realizó la transformación de *Agrobacterium tumefaciens* (AGL1) electrocompetentes. Se descongelaron en hielo las células y se agregaron 2  $\mu$ L del DNA plasmídico, previamente se pusieron a enfriar las cubetas de electroporación, una vez descongeladas la células se mezcló por pipeteo junto con el DNA, se tomó todo el volumen y se depositó en la cubeta de electroporación de 1 mL, este se puso en el electroporador y se le dio el pulso eléctrico (1800 V), enseguida se le agregaron 300  $\mu$ L de medio SOC (triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM y glucosa 20 mM pH 7.0), se recuperó todo el volumen contenido en la cubeta y se transfirió a un tubo de 1.5 mL donde se incubó por 3 horas a 28°C en agitación. Después se distribuyeron homogéneamente en cajas Petri de LB sólido que contenían tres antibióticos (Kanamicina 50  $\mu$ g/ $\mu$ L, Espectinomina 100  $\mu$ g/ $\mu$ L y Carbenicilina 100  $\mu$ g/ $\mu$ L), éstas fueron incubadas a 28°C por 5 días, posteriormente se picaron colonias con ayuda de palillos y se obtuvieron cajas maestras y crecimientos en medio líquido.

Una vez que crecieron las colonias en el medio líquido se realizó una extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina cuyo proceso ha sido descrito anteriormente (VI.I.II). La corroboración de la presencia de los vectores binarios y el inserto se realizó por PCR punto final usando los oligos que amplifican CsPP16+Defensina.

#### **VI.I.XVII Conservación de cepas**

Las cepas con las construcciones [(*E. coli*-16K+Defensina en pCR<sup>TM</sup>8/GW/TOPO); (*E. coli*-16K+Defensina en pB7WG2D,0); (*E. coli*-16K+Defensina en pB7FWG2D,0); (*A. tumefaciens*-16K+Defensina en pB7WG2D,0); (*A. tumefaciens*-16K+Defensina en pB7FWG2D,0)] se conservaron en glicerol al 30%, las cepas de *E. coli* se crecieron en medio líquido LB (Espectinomicina) a 37°C por 18 horas, las cepas de *A. tumefaciens* se crecieron en medio líquido LB (Kanamicina, Espectinomicina y Carbenicilina). Por cada cepa se tomó un tubo criogénico y se le agregó 500 µL del medio de cultivo y 500 µL de glicerol al 30% estéril, estos tubos se pusieron en hielo seco por 20 min y luego se conservaron a -80°C (Sambrook, 1999).

#### **VI.II Obtención de plantas transgénicas de soya (*Glicine max*)**

Se realizó la transformación genética de soya usando el protocolo de la Universidad de Iowa modificado (Paz, et al, 2009), este método consiste en transformar el embrión adherido a uno de los cotiledones para regenerar a la soya vía embriogénesis directa.

Para la transformación de soya se usaron cuatro distintos cultivares, dos cultivares elite procedentes de China (un cultivar con alta producción de proteínas y otro

cultivar altamente productor de aceites), y otros dos cultivares elite de nuestro país desarrolladas por el INIFAP (Huasteca 200 y Huasteca 400).

El método de transformación se describe a continuación:

#### **VI.II.I Esterilización de las semillas**

Las semillas de soya se colocaron en cajas Petri (60 semillas/caja) se prepararon 6 cajas por cada cultivar, estas se colocaron en un desecador el cual contenía un vaso de precipitado de 250 mL con 100 mL de cloro, luego se agregaron lentamente 3.5 mL de HCl (12 N), enseguida se cerró el desecador, de esta forma se dejaron expuestas las semillas al gas de cloro por 16 h. una vez transcurrido el tiempo de exposición se cerraron las cajas y se retiraron del desecador, las cajas con las semillas se dejaron en aeración por 30 min en una campana de flujo laminar.

Una vez terminado el proceso anterior las semillas estaban listas para iniciar el proceso de transformación genética, por tal motivo se sellaron las cajas y se conservaron así hasta el momento de su uso.

#### **VI.II.II Preparación de *Agrobacterium***

Se preparó medio LB líquido modificado (Anexo 2, con Espectinomicina, Kanamicina y Carbenicilina), en tubos de ensayo se agregaron 3 mL de medio LB. Las cepas de *Agrobacterium* fueron retiradas del ultracongelador y se pusieron en hielo seco, con un palillo se picaron los tubos criogénicos, e inmediatamente se colocaron en los tubos de ensayo con medio LB, éstos se incubaron a 28°C por 36 h a ~250 rpm. Del crecimiento anterior se tomó un inóculo de 1 mL, éste se agregó a un matraz de 500 mL que contenía 100 mL de medio LB, se dejó incubando toda la noche a 28°C a

~250 rpm (hasta llegar a una  $OD_{620} = 0.8-1.0$ ). Posteriormente se colectó el cultivo en tubos Falcon de 50 mL y se centrifugaron a 4,000 rpm por 15 min a temperatura ambiente (22°C), luego se resuspendió la pastilla bacteriana en 25 mL de medio de infección, para obtener una densidad celular de  $0.5 \times 10^8$  células/mL aproximadamente.

Antes de usarse las células para la transformación se agitaron gentilmente a 60 rpm por 30 min.

### **VI.II.III Imbibición de semillas**

En una campana de flujo laminar se colocaron las cajas Petri que contenían las semillas de soya y se les agregó agua a  $\frac{3}{4}$  de la capacidad de la caja, se cerraron las cajas y se cubrieron con papel aluminio para mantenerlas en oscuridad durante toda la noche a temperatura ambiente.

### **VI.II.IV Preparación de explantes para la infección**

En una campana de flujo laminar se les retiró el papel aluminio a las cajas Petri que contenían las semillas de soya imbibidas, se tomaban grupos de 20 semillas y se colocaban en una sanita absorbente estéril para eliminar el exceso de humedad. Posteriormente, con ayuda de una navaja de #15, se les realizó un corte longitudinal a lo largo del hilum de la semilla para separar los cotiledones y remover la testa. Una vez separados los cotiledones se tomó el que tenía el nodo axilar y se le realizó una incisión al eje radicular. Se colocaron 30 cotiledones por caja Petri y se le agregaron 30 mL de medio de infección (Medio Gamborg Sol. Inorganica 1/10X, Vitaminas B5 medio Gamborg 1/10X, Sulfato Ferroso 2.8 mg, NaEDTA 3.8 mg, Sacarosa 30 g,

MES 3.9 g, pH 5.7, GA<sub>3</sub> 0.25 mg, BAP 1.11 mg, Acetosiringona 40 mg) con *Agrobacterium GL1*. Se incubaron por 30 min a temperatura ambiente con ligeras agitaciones ocasionales.

#### **VI.II.V Co-cultivo**

Después de la infección, se removió el exceso de medio de infección de las cajas Petri y con una sanita estéril se retiró el exceso de humedad de los explantes. Enseguida se transfirieron los explantes al medio de Co-cultivo (Medio Gamborg Sol. Inorgánica 1/10X, Vitaminas B5 medio Gamborg 1/10X, Sulfato Ferroso 2.8 mg, NaEDTA 3.8 mg, Sacarosa 30 g, MES 3.9 g, Noble Agar 4.5 g, pH 5.4, GA<sub>3</sub> 0.25 mg, BAP 1.67 mg, Cisteína 400 mg, DTT 154.2 mg, Acetosiringona 140 mg), sobre el medio se colocó papel filtro estéril con la finalidad de reducir crecimientos bacterianos durante el Co-cultivo. Se colocaron aproximadamente 10 explantes por caja Petri.

Se sellaron las cajas con parafilm y se incubaron a 24°C de 3 a 5 días bajo un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

#### **VI.II.VI Inducción de brotes**

Después de los 3-5 días de Co-cultivo, se removieron los explantes del medio de Co-cultivo y se pasaron a una caja Petri vacía a la cual después se le agregaron 50 mL de medio de lavado (medio Gamborg Sol. Inorgánica 1X, Vitaminas B5 medio Gamborg 1X, Sulfato Ferroso 28 mg, NaEDTA 38 mg, Sacarosa 30 g, MES 0.59 g, pH 5.7, BAP 1.11 mg, Meropenem 50 mg, Cefotaxima 100 mg, Vancomicina 50 mg), para eliminar el exceso de humedad se pasaron los explantes a una sanita estéril. Se

colocaron los explantes con el lado adaxial en contacto con el medio de inducción de brotes (medio MS Sol. Inorgánica 1X, Vitaminas B5 medio Gamborg 1X, Sulfato Ferroso 28 mg, NaEDTA 38 mg, Sacarosa 30 mg, MES 0.59 g, Noble Agar 7 g, pH 5.7, BAP 1.67 mg, Meropenem 50 mg, Cefotaxima 100 mg, Vancomicina 50 mg, Glufosinato de amonio 8 mg) en un ángulo de 30° a 45°. Las cajas se sellaron con parafilm y se pusieron a incubar a 24°C, bajo un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. El medio de inducción de brotes se cambió a los 14 días a medio fresco, los explantes estuvieron en este medio por 28 días (4 semanas).

#### **VI.II.VII Elongación de brotes**

Después de las 4 semanas en medio de inducción de brotes, los explantes se prepararon para cambiarse de medio, a cada uno se le realizó una incisión en la base. Los explantes se cambiaron al medio de elongación de brotes (medio MS Sol. Inorgánica 1X, Vitaminas B5 medio Gamborg 1X, Sulfato Ferroso 28 mg, NaEDTA 38 mg, Sacarosa 30 g, MES 0.59 g, Noble Agar 7g, pH 5.7, Aspargina 50 mg, Ácido Glutámico 100 mg, IAA 0.1 mg, GA<sub>3</sub> 0.5 mg, Zeatin-R 1 mg, Meropenem 50 mg, Cefotaxima 100 mg, Vancomicina 50 mg, Glufosinato de amonio 8 mg). Los explantes se cambiaron medio fresco cada 2 semanas.

Los explantes estuvieron en medio de elongación de brotes hasta que alcanzaron una altura de aproximadamente 8 cm.

#### **VI.II.VIII Enraizamiento de plantas**

Después de que los explantes alcanzan los 8 cm de altura se pasan al medio de enraizamiento (medio MS Sol. Inorgánica ½ X, Vitaminas B5 medio Gamborg ½ X,

Sulfato Ferroso 28 mg, NaEDTA 38 mg, Sacarosa 20 g, MES 0.59 g, Noble Agar 7 g, pH 5.6, IBA 1 mg, Glufosinato 3 mg), a los que les realizó una incisión en la base y se pasaron al nuevo medio de cultivo.

Las cajas se sellaron con parafilm y se pusieron a incubar a 24°C bajo fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad, de 1 a 2 semanas.

### **VI.II.IX Aclimatación de las plantas**

Una vez que aparecieron las primeras raíces en las plantas, estaban listas para pasar a tierra. Previamente se lavaron las macetas y se preparó tierra estéril (1 vol de tierra; 1 vol de Peat Moss: 0.5 Vol de Agrolita). Las plantas se pasaron a las macetas que ya contenían tierra, se eliminó el exceso de medio con agua destilada, las plantas se cubrieron con plástico y se llevaron a la cámara de crecimiento a 24°C bajo fotoperiodo (16:8), después de una semana se retiró el plástico a las plantas se dejaron una semana más en la cámara, posteriormente se pasaron al invernadero.

### **VI.III Análisis de las plantas transgénicas**

#### **VI.III.I PCR punto final para detección de transgen**

La comprobación para la detección de plantas transgénicas se realizó mediante la amplificación del marco de lectura abierta (CsPP16+Defensina, ~720 pb) y del gen reportero GFP (~720 pb). Para cada uno de los cultivares transformados se realizó la extracción de DNA genómico, mediante la criofractura con nitrógeno líquido. Se pesaron 100 mg de tejido fresco, se colocaron en un tubo de 2 mL junto con un balín y se pusieron en nitrógeno líquido por 20 min, luego se llevaron macerar en el TissueLyser LT (QIAGEN) por 4 min a 50 rpm, después se les retiró el balín.



Enseguida se le agregaron 600  $\mu\text{L}$  de CTAB y se incubó a  $65^{\circ}\text{C}$  por 20 min, después se dejó a enfriar a temperatura ambiente. Se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de cloroformo y se agitó, se puso a centrifugar por 2 minutos a 13,000 rpm, el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio. Posteriormente se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de acetato de sodio 3M y 600  $\mu\text{L}$  de fenol-cloroformo, se agitó y centrifugó 13,000 rpm por 5 min, el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio. Al tubo con el sobrenadante anterior se le agregó 600  $\mu\text{L}$  de Fenol-Cloroformo, se agitó y se centrifugó 15 min a 13,000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$ , el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio, enseguida se agregaron 0.6 volúmenes ( $\sim 360 \mu\text{L}$ ) de Etanol-Metanol-Ácido Acético (21:3:1) y se dejó precipitar toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Al día siguiente se centrifugó a 13,000 rpm por 20 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , se desechó el sobrenadante, en el tubo quedó una pastilla compacta. A esta pastilla se le agregaron 300  $\mu\text{L}$  de Agua MilliQ y 10  $\mu\text{L}$  de Acetato de Sodio 3M, se agitó hasta que la pastilla se disolvió completamente y luego se agregaron 690  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto, se agitó y se centrifugó a 13,000 rpm por 3 min y se desechó el sobrenadante. Del paso anterior se obtuvo una pastilla, a la cual se le agregó 1000  $\mu\text{L}$  de Etanol al 70%, se centrifugó a 13,000 rpm por 3 min y se desechó el sobrenadante. La pastilla obtenida en el paso anterior se secó a  $65^{\circ}\text{C}$  por 10 min y se eluyó en 25  $\mu\text{L}$  de Agua MilliQ y se le agregó 0.1  $\mu\text{L}$  de RNasa A (10mg/mL) y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 min.

Posteriormente se llevaron las muestras a una dilución de 100 ng/ $\mu\text{L}$ , que fueron usadas para amplificar los fragmentos antes mencionados. Se usaron los siguientes oligos previamente descritos.

### VI.III.II Análisis de transcritos por RT-qPCR

El análisis se realizó para cuantificar los niveles de expresión del inserto (CsPP16+Defensina).

Los oligos utilizados para este análisis son los siguientes (Tabla 9):

Tabla 9 Secuencia de los oligos usados para la RT-qPCR.

Oligo	Secuencia 5'-3'	Tamaño (pb)
DEF-FOR	TATGCCACTTCCAGGTGTTT	150 pb
DEF-REV	AAACTGGATGGCAAATAGCAC	
COXf	GTATGCCACGTTCGCATTCCAGA	85 pb
COXr	GCCAAAAGTCTAAGGGCATTC	

### VI.III.IV Extracción de RNA total de soya

La extracción de RNA de soya se realizó con el Kit Direct-zol™ RNA MiniPrep, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se tomaron hojas de soya y se pesaron 100 mg, se colocaron en un tubo de 2 mL y se les colocó un balín, enseguida se dejaron en nitrógeno líquido por 20 min, luego se llevaron macerar en el TissueLyser LT (QIAGEN) por 4 min a 50 rpm, después del paso anterior se retiró el balín con un magneto. Al tubo se le agregaron 750 µL de TRI Reagent®, después se centrifugaron los tubos a 13,000 rpm por 1 min, el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio libre de RNasa A. A la muestra obtenida en el paso anterior se le agregó 1 volumen de etanol absoluto (1:1), se mezcló y enseguida se transfirió a una columna Zymo-Spin™ IIC contenida en un tubo de

recolección y se centrifugó por 1 min a 13,000 rpm. Enseguida se desechó el sobrenadante y se le agregó a la columna 400  $\mu$ L de RNA Wash Buffer y se centrifugó 1 min a 13,000 rpm, luego se desechó el sobrenadante y se le agregaron 20  $\mu$ L de DNAase I Reaction Mix (2  $\mu$ L de DNAase I y 18  $\mu$ L de DNA Digestion Buffer), y se incubó 15 min a temperatura ambiente, después se le agregaron 400  $\mu$ L de Direct-zol™ RNA PreWahs a la columna y se centrifugó 1 min a 13,000 rpm, luego se desechó el sobrenadante, el paso anterior se repitió una vez más. Se agregaron 700  $\mu$ L de RNA Wash Buffer a la columna y se centrifugó 2 min a 13,000 rpm, se desechó el sobrenadante y se centrifugó la columna una vez más para remover completamente el Buffer anterior, se pasó la columna a un tubo de 1.5 mL limpio libre de RNasa A, enseguida se le agregaron 25  $\mu$ L de agua MilliQ libre de RNasa y DNasa, para eluir el RNA, se dejó incubando a 37°C por 10 min y luego se centrifugo por 1 min a 13,000 rpm y se cuantifico con el NanoDrop (ND-1000).

#### **VI.III.V RT-qPCR**

La cuantificación de expresión de transcritos se realizó en el equipo StepOne Plus™, para este análisis se utilizó la cuantificación relativa por curva estándar, de tal modo que se utilizó una concentración conocida (10 ng/ $\mu$ L) de transcritos y se hicieron 8 diluciones a partir de ésta, usando la siguiente formula se calculó el número de transcritos:  $m = (n)(1.096 \times 10^{-21} \text{ g/bp})$ , donde  $m$ = la masa del genoma en gramos y  $n$ =tamaño del genoma en pb. Las muestras de RNA se llevaron a una concentración de 50 ng/ $\mu$ L. La reacción de la PCR en tiempo real se realizó usando el kit KAPA SYBR® FAST Universal One-Step qRT-PCR, siguiendo las instrucciones del fabricante (Tabla 10).

Tabla 10 Mezcla de reacción para la RT-qPCR.

Componente	Cantidad 1X
<b>Agua MilliQ estéril</b>	3.2 $\mu$ L
<b>2X KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix</b>	5.0 $\mu$ L
<b>50X ROX High</b>	0.2 $\mu$ L
<b>10 mM DEF-FOR / COXf</b>	0.2 $\mu$ L
<b>10 mM DEF-REV /COXr</b>	0.2 $\mu$ L
<b>50X KAPA RT Mix</b>	0.2 $\mu$ L
<b>RNA</b>	1.0 $\mu$ L

Por cada muestra se realizaron 3 repeticiones y dos mezclas diferentes una para la detección de defensina y la otra para la amplificación del gen endógeno citocromo oxidasa (COX), éste último también es usado como gen normalizador.

El programa de amplificación también se realizó bajo las instrucciones del fabricante (Tabla 11).

Tabla 11 Programa de amplificación para la RT-qPCR

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclo
<b>Síntesis de cDNA</b>	42°	5 min	1
<b>Inactivación de la RT</b>	95°	3 min	1
<b>Desnaturalización</b>	95°	5 seg	40
<b>Alineación y extensión</b>	60°	20 seg	
<b>Curva de disociación</b>	La indicada por el equipo		

#### VI.III.VI Detección de la proteína (Western-Blot)

El ensayo de Western-blot se realizó como se indica a continuación, se hizo la extracción total de proteínas a partir de hojas de soya, las cuales se pusieron en un tubo de 2 mL, se le agregó un balín y se dejaron 20 min en nitrógeno líquido, luego se llevó a macerar en el TissueLyser LT (QIAGEN) por 4 min a 50 rpm, inmediatamente después se retiró el balín se le agregó el buffer de extracción de proteínas, se homogenizó con un vórtex y luego se centrifugó a 13,000 rpm por 2 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio para ser conservado a 4°C, el extracto de la proteína se mezcló con el buffer desnaturalizante 2X y se trataron térmicamente a 90°C por 5 min, las muestras se corrieron por electroforesis en un SDS-PAGE al 12%. Las proteínas se transfirieron a una membrana PVDF (Whatman™) previamente activada con metanol, la transferencia se realizó toda la noche a 25 V, al día siguiente se bloqueó la membrana (PBS 1X, leche descremada 1%, Tween-20 0.1%), luego se realizaron 3 lavados con PBS 1X. Enseguida se dejó

incubando toda la noche a 4°C con el primer anticuerpo policlonal contra GFP (1:5000-PBS 1X, leche descremada 5%, Tween-20 0.1%), al día siguiente se lavó la membrana 5 veces (PBS 1X, Tween-20 0.1%), para luego ser incubadas con el segundo anticuerpo IgG acoplado a HRP (1:500-PBS 1 X, leche descremada 5%, Tween-20 0.1%) por 3 horas a temperatura ambiente, después se lavaron 5 veces (PBS 1X, Tween-20 0.1%). La señal de la peroxidasa de HRP se reveló con ayuda del kit de luminiscencia Amersham Prime Western Blotting Kit Reaction (ECL-GE Healthcare™, EE.UU.) y revelado en placas fotográficas Hyperfilm (ECL-GE Healthcare™, EE.UU.).

#### **VI.III.VII Preparación de muestras para microscopía confocal**

Para este análisis se tomaron tejidos de la planta (hojas y tallos), con ayuda de un micrótopo (MICROM, HM315) se realizaron cortes a los diferentes tejidos, enseguida se montaron los tejidos en glicerol al 50%, entre un portaobjetos y un cubreobjetos sobre puestos y se sellaron con esmalte.

#### **VI.III.VIII Análisis de fluorescencia por microscopía confocal**

Las imágenes se tomaron con el Microscopio confocal TCS-SPE de la marca Leica (Objetivos 20 y 40X), se usaron longitudes de onda de 448 nm para excitar y 525/550 nm, para la detección de GFP. Las imágenes se analizaron en el programa Las AF.

#### **VI.IV Determinación del número de insertos por ddPCR**

Se calculó el peso del genoma de la soya ~25 ng (978 Mb) y se realizó una digestión previa al DNA con la enzima EcoRI (Tabla 12).

Tabla 12 Digestión DNA genómico de soya.

Componente	Cantidad para 1 reacción
Agua MilliQ estéril	3.8 µL
CutSmart (10X)	1.0 µL
RNasa A	0.1 µL
EcoRI (20 U)	0.1 µL
Molde (DNA 100 ng/µL)	5.0 µL

Se preparó un mix de los oligos y sondas que se usaron, en el ddPCR; una mezcla para detectar defensina y otra para cox.

Las mezclas se prepararon de la siguiente manera (Tabla 13):

Tabla 13 Mezcla de defensina y cox para el análisis de número de copias.

Componente	Cantidad para 1 reacción	Cantidad para 20 reacciones
H <sub>2</sub> O	0.59 µL	11.8 µL
Def For (100 µM)	0.18 µL	3.6 µL
Def Rev (100 µM)	0.18 µL	3.6 µL
Def Sonda FAM (100 µM)	0.05 µL	1.0 µL
<b>Vol. Final</b>	<b>1.00 µL</b>	<b>20.0 µL</b>
H <sub>2</sub> O	0.59 µL	11.8 µL
Cox For (100 µM)	0.18 µL	3.6 µL
Cox Rev (100 µM)	0.18 µL	3.6 µL
Cox Sonda HEX (100 µM)	0.05 µL	1.0 µL
<b>Vol. Final</b>	<b>1.00 µL</b>	<b>20.0 µL</b>

Después de preparar las digestiones de DNA genómico de soya y la mezcla de oligos y sondas, se preparó la mezcla de reacción para la ddPCR siguiendo las instrucciones del fabricante (Tabla 14).

Se analizó una muestra por cada cultivar por duplicado, antes de llevar las muestras al termociclador se generaron droplets (nanogotas de la reacción recubiertas por aceite), las cuales se obtuvieron con el equipo “QX200 droplet generator”. Los droplets se transfirieron a una placa para PCR.

Tabla 14 Mezcla de reacción para determinar el número de copias.

<b>Componente</b>	<b>Cantidad para 1 reacción</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	7.0 µL
<b>2x ddPCR Supermix for Probes</b>	10.0 µL
<b>20x (Mix defensina)</b>	1.0 µL
<b>20x (Mix cox)</b>	1.0 µL
<b>DNA digerido (25 ng/µL)</b>	1.0 µL
<b>Volumen Final</b>	<b>20.0 µL</b>

El programa de amplificación usado para el termociclador fue el siguiente (Tabla 15):



Tabla 15 Programa usado para el termociclador.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclo
<b>Activación de enzima</b>	95°	10 min	1
<b>Desnaturalización</b>	94°	30 seg	40
<b>Alineación y extensión</b>	58°	1 min	
<b>Desactivación de enzima</b>	98°	10 min	1
<b>Hold</b>	4°	∞	1

Después de la amplificación se llevó la placa al lector de gotas “QX200 droplet reader”, y con la ayuda del software “QuantaSoft” se determinó el número de insertos del gen CcPP16-Defensina en el genoma de soya.

## VII RESULTADOS

### VII.I Obtención del vector de expresión

Después de haber obtenido el crecimiento bacteriano que contenían el gen de interés (CsPP16+Defensina) y haber realizado la extracción del DNA plasmídico, se verificó la presencia del mismo (Fig. 15).

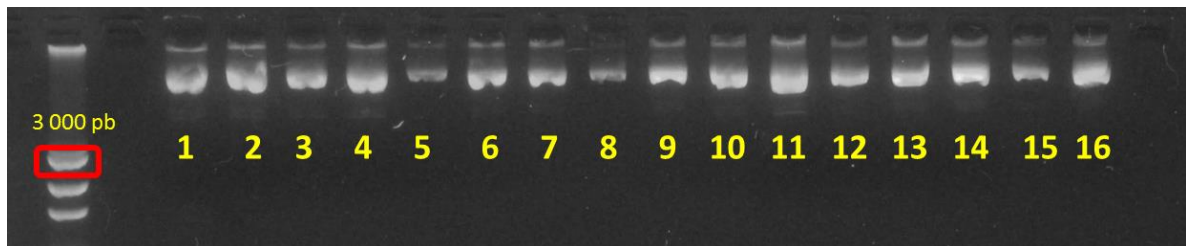


Fig. 15 DNA plasmídico de *E. coli*, que contienen el gen CsPP16-Defensina.

Las diluciones realizadas a partir del DNA plasmídico, se usaron para la PCR en la cual se obtuvieron 5 muestras positivas que contenían el gen de interés y 4 muestras se amplificaron sin el codón de paro (estas se usaron para fusionar CsPP16 con GFP). Las primeras cinco muestras amplificaron un fragmento de 720 pb (1-5), mientras que las otras cuatro dieron un producto de 717 pb (6-9) (Fig.16).

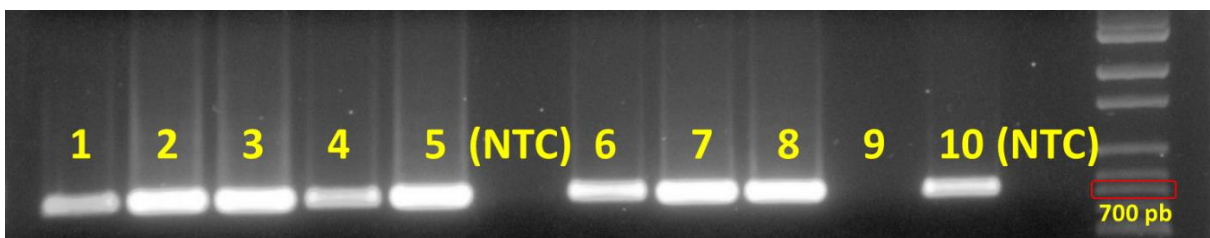


Fig. 16 Productos de la amplificación del gen CsPP16-Defensina (~720 pb).

Los productos anteriores se purificaron y cada uno se ligó al vector pCR™8/GW/TOPO.

Después de haber clonado las cepas de *E. coli*, y crecido las colonias en medio líquido, y haber realizado la extracción para corroborar la clonación de los genes de interés se realizó la digestión enzimática con la enzima EcoRI (Fig. 17). Las muestras 1-6 corresponden al gen completo, mientras que las muestras 7-11 corresponden al gen sin el codón de paro.

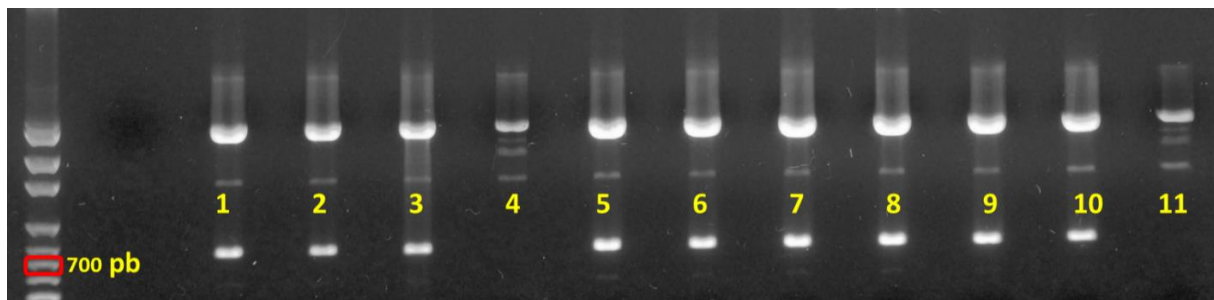


Fig. 17 Digestión del DNA plasmídico pCR8<sup>TM</sup>/GW/TOPO-CsPP16-Defencina.

Para verificar cuál de las clonas contenían la dirección correcta 5'→3' se hizo un análisis de restricción. Para cortar un fragmento del vector binario se usó EcoRV y para cortar nuestro gen se usó la enzima de restricción DraI. (Fig. 18). Las muestras 3 y 6 resultaron con la orientación adecuada para nuestro gen fusionado a GFP y las muestras 7, 9 y 12 dieron positivas para nuestro gen con codón de paro.

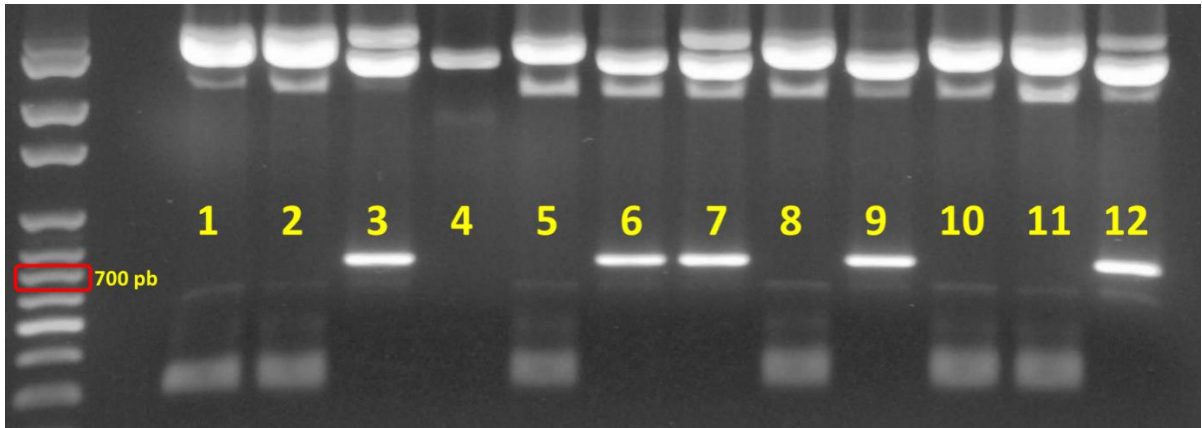


Fig. 18 Análisis de restricción para verificar la orientación de CsPP16-Defensina.

Las cepas de *E. coli*, con la orientación correcta se linealizaron (Fig. 19), las muestras 1 y 2 tienen un peso de 3 537 pb, que corresponde al gen con codón de paro, las muestras 3 y 4 corresponden a las muestras sin codón de paro y tienen un peso de 3 534 pb.

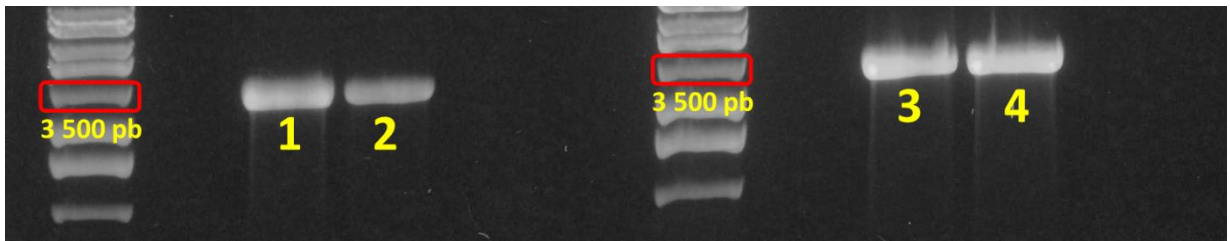


Fig. 19 Linealización de DNA plasmidico pCR8™/GW/TOPO-CSPP16-Defensina.

Las muestras anteriores se subclonaron por recombinación de los sitios Att, en los vectores de sobre expresión (pB7WG2,0 y pB7FWG2,0). Después de la subclonación se realizó la transformación de cepas de *E. coli* con los vectores binarios, para luego hacer la extracción de DNA (Fig. 20). Las muestras de la 1 a la

10, son muestras del gen completo, mientras que las de la 11 a 18 son del gen fusionado a GFP.

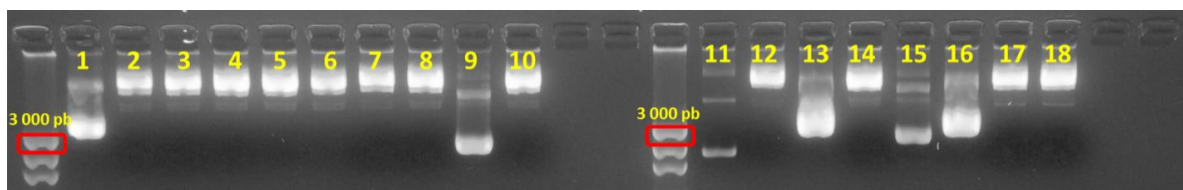


Fig. 20 DNA plasmidico pB7WG2,0-CsPP16-Defencina (1-10) y pB7FWG2,0-CsPP16-Defensina (11-18).

Después de corroborar la integridad del DNA plasmídico se realizó una PCR para verificar la presencia del gen de interés.

En la PCR se amplificó el gen de interés completo (Fig. 21).

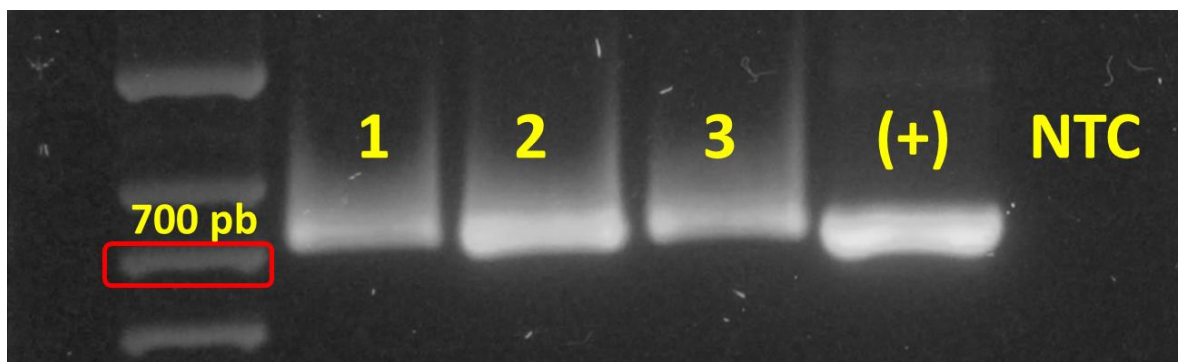


Fig. 21 Amplificación del gen CsPP16-Defensina en el vector binario pB7WG2,0.

Por otro lado se realizó la amplificación del gen fusionado a GFP en *E. coli*, para una sola muestra se realizaron dos PCRs, una para amplificar CsPP16-Defensina y otra para amplificar GFP (Fig. 22).

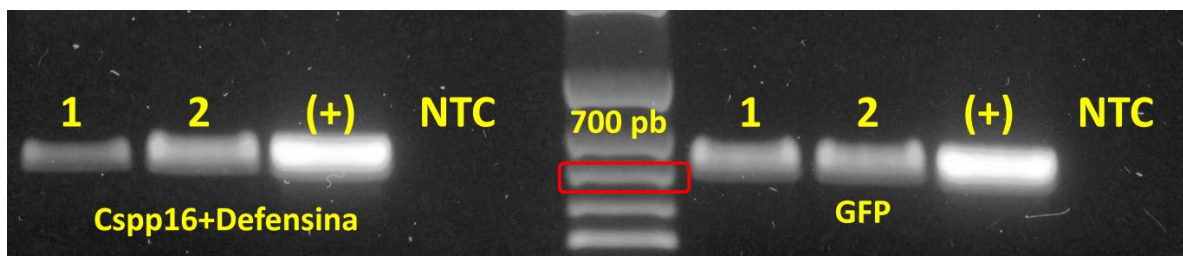


Fig. 22 Amplificación del gen CsPP16-Defensina y GFP en el vector binario pB7FWG2,0.

Una vez que se corroboró la presencia de los genes de interés se purificó el DNA plasmídico y se usó para transformar cepas de *A. tumefaciens* por electroporación.

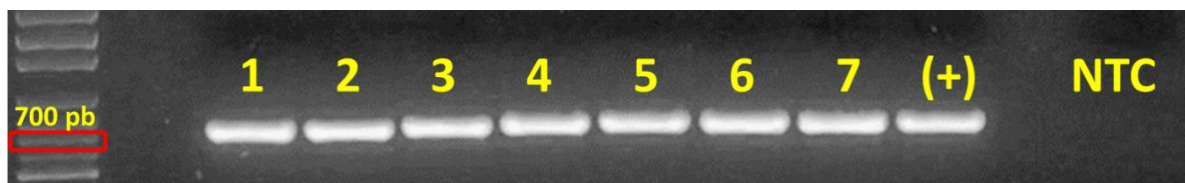


Fig. 23 Corroboración de la presencia del gen CsPP16-Defensina en el vector binario a partir de DNA plasmídico de *A. tumefaciens*.

Los productos de la PCR para amplificar el gen completo, se corrieron en un gel de agarosa (Fig. 23), en el cual se muestran los resultados.

Para corroborar el gen fusionado a GFP, se realizó una PCR, pero esta vez se amplificó el producto de la fusión completa que nos dio un producto de 1 440 pb (Fig. 24).

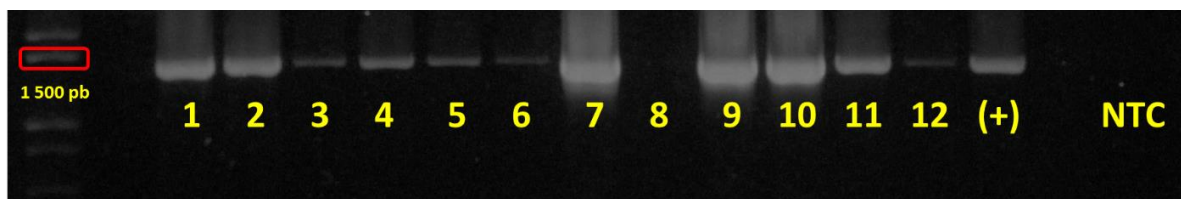


Fig. 24 Detección de la presencia del gen CsPP16-Defensina fusionado a GFP en el vector binario a partir de DNA plasmídico de *A. tumefaciens*.

## VII.II Obtención de plantas de soya transgénicas

Ya obtenidos los vectores de expresión en *Agrobacterium tumefaciens*, se inició la transformación de plantas de soya. Para lo cual se usaron cuatro cultivares (Tabla 16).

Tabla 16 Cultivares usados para la transformación genética de soya.

Cultivar	Construcción
Soya con alto contenido de aceite	CsPP16-Defensina
Soya con alto contenido de proteínas	CsPP16-Defensina
Huasteca 200	CsPP16-Defensina;
Huasteca 400	CsPP16-Defensina CsPP16-Defensina-GFP

Los primeros pasos para la transformación de plantas, fue la esterilización de las semillas, la imbibición y la incisión de semillas, en la figura 25 se muestran en orden cada uno de los pasos antes mencionados, esto se realizó para cada uno de los diferentes cultivares.

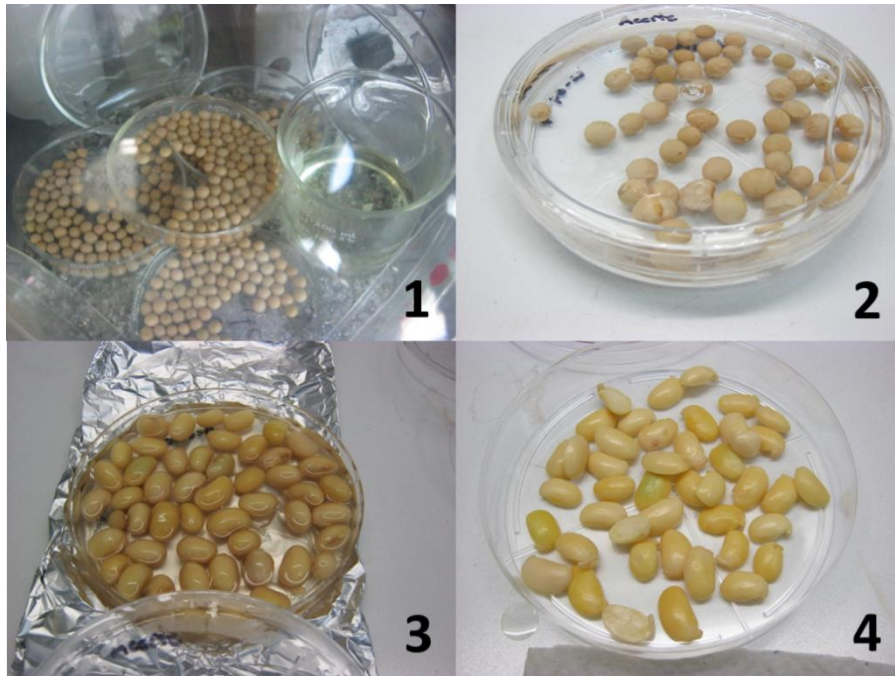


Fig. 25 Primeros pasos de la transformación de soya 1.- esterilización de semillas, 2 y 3.- imbibición de semillas y 4.- incisión de semillas.

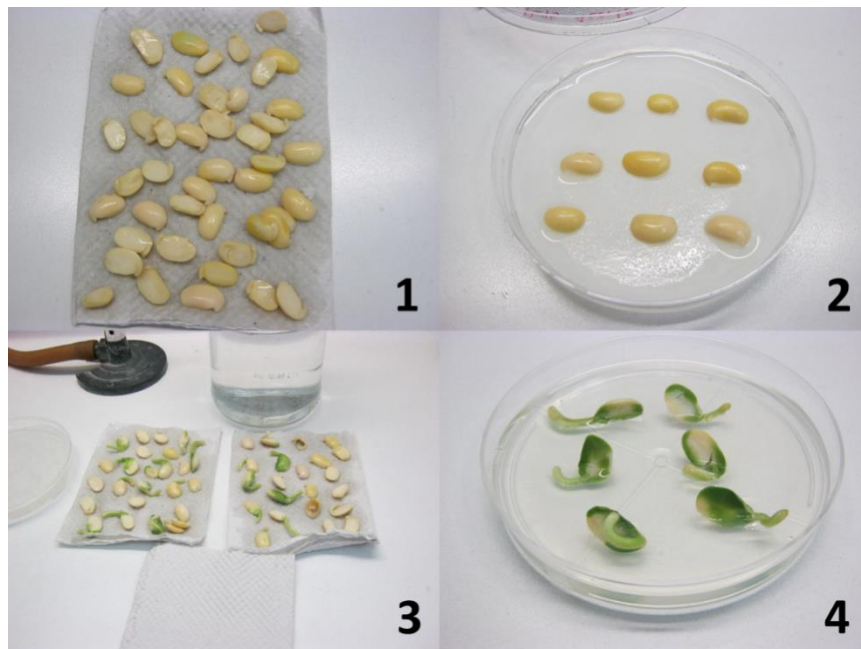


Fig. 26 Panel 1.- cotiledones agro-infiltradas 2.- cotiledones en medio de Co-cultivo 3.- lavado de explantes 4.- explantes en medio de inducción de brotes.



Después de concluir el paso anterior se agro-infiltraron los embriones de soya, para luego ser transferidos al medio de Co-cultivo (Fig. 26, 1 y 2).

En la figura 26, se observan los explantes agro-infiltrados, los explantes en medio de co-cultivo, los explantes a los 5 días y su transferencia al medio de inducción de brotes.



Fig. 27 Explantes en medio de inducción de brotes 1.- Una semana, 2.- Tres semanas y 3.- Cuatro semanas.

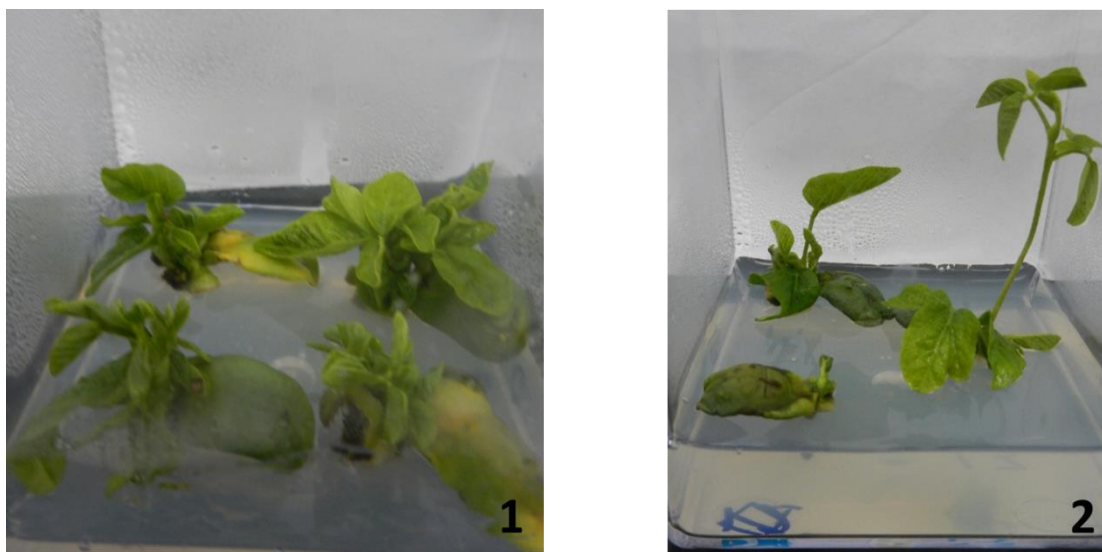


Fig. 28 Panel 1.- Explantes en cajas magenta con medio de inducción de brotes 2.- Explantes en medio de elongación de brotes.

Los explantes se mantuvieron por 4 semanas en el medio de inducción de brotes, en el segundo cambio de medio los explantes se cambian a cajas magenta para que su crecimiento no se vea limitado (Fig. 28, 1).



Fig. 29 Explantes en medio de elongación de brotes 1.-Explante una semana después, 2 y 3.- Explantes dos semanas después, donde ya aparecen las raíces.

Después de haber pasado por el medio de inducción de brotes, se traspasa al medio de elongación de brotes (Fig. 28, 2), donde debe pasar 8 semanas; sin embargo las plantas pueden ser transferidas al medio de inducción de raíces cuando alcanzan una altura de 8 cm.

Las plantas pasan dos semanas en el medio de inducción de raíces (Fig. 29) y después se pasan a tierra (Fig. 30), durante el proceso de cambio de medio de cultivo a maceta se toman muestras para corroborar la presencia del transgen.



Fig. 30 Plantas transgénicas en tierra después de una semana del cambio.

De las muestras tomadas se realizó la extracción de DNA y se realizaron las amplificaciones de los genes CsPP16-Defensina, CsPP16-Defensina-GFP.

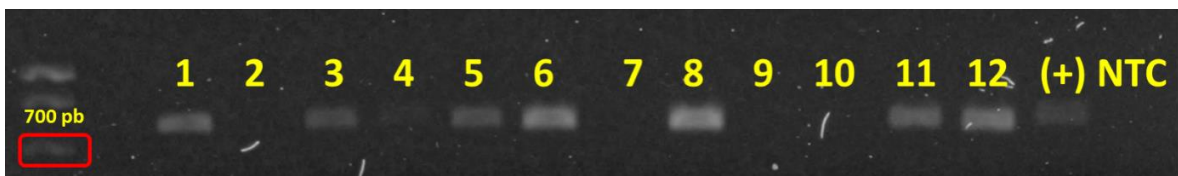


Fig. 31 Corroboración de la inserción del gen CsPP16-Defensina en plantas de soya.

De las 12 plantas a las cuales se les realizó la extracción de DNA, únicamente 8 resultaron positivas para el transgen de defensina (Fig. 31).

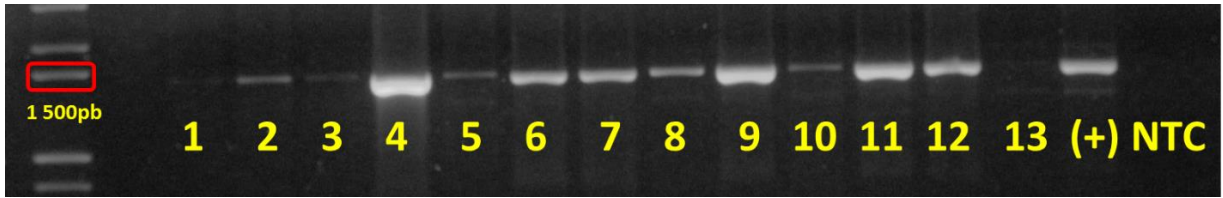


Fig. 32 Corroboración de la inserción del gen CsPP16-Defensina fusionado a GFP, en plantas de soya.

Se analizaron 13 plantas de soya las cuales fueron agro-infiltradas con la construcción de defensina fusionada a GFP, de estas 11 resultaron positivas (Fig. 32).

### VII.III RT-qPCR

La cuantificación de los transcritos de CcPP16-Defensina, se analizó usando el método de  $\Delta\Delta Ct$  (Fig. 33), el cual nos ayuda a interpretar de mejor forma los resultados obtenidos, de manera general se puede observar que el cultivar H400, presenta una mayor expresión del gen de interés.

En la figura 33, se presentan los resultados de dos muestras diferentes para cada uno de los cultivares, las muestras que se presentan previamente fueron analizadas para detectar la presencia del transgen.

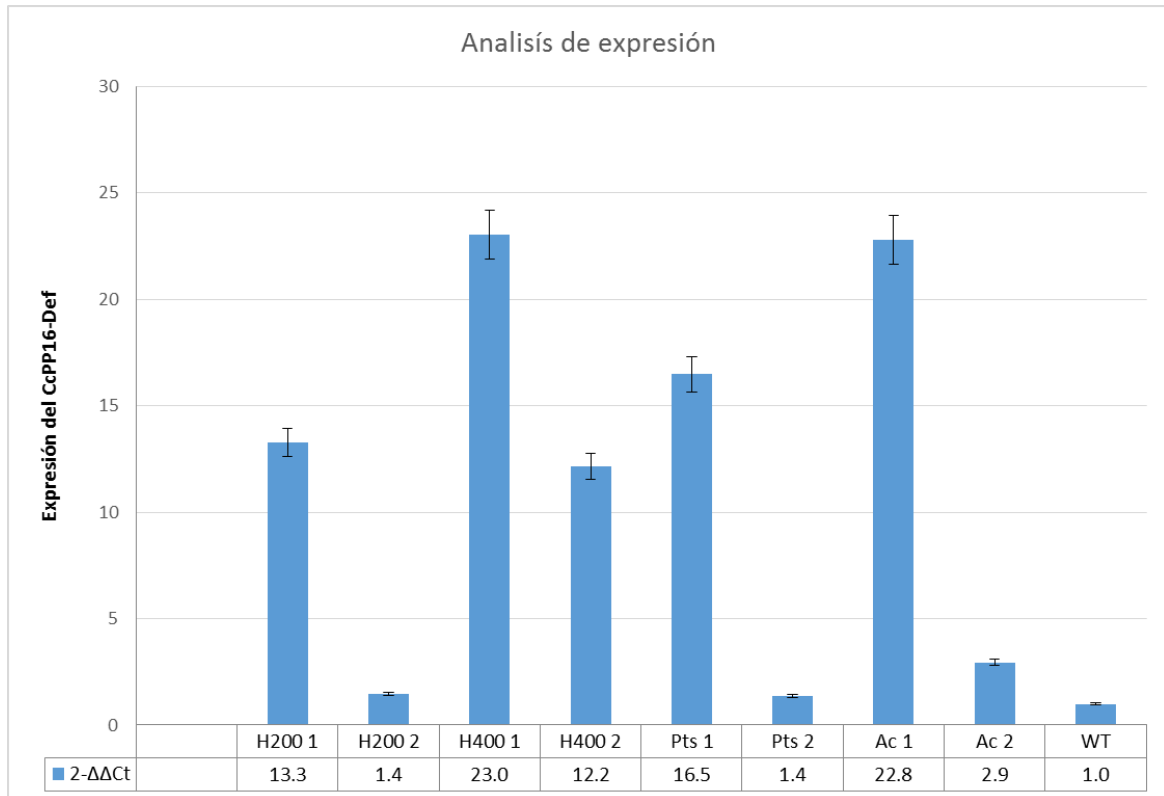


Fig. 33 Análisis de la expresión génica de plantas de soja transformadas genéticamente.

#### VII.IV Detección de la proteína (Western-Blot)

Para detectar la expresión de la proteína CsPP16-Defensina, se llevó a cabo la inmunodetección de GFP.

Para el análisis mediante el Western-Blot, se usaron muestras a las cuales ya se les había detectado el transgen. La fusión de GFP con CsPP16-Defensina tiene un peso aproximado de 44 KDa. La detección de la proteína se realizó en los cuatro cultivares transformado (Fig. 34), se usó como control negativo una planta convencional.

Este ensayo demuestra la expresión de la proteína CsPP16, la cual se indica con la flecha amarilla.

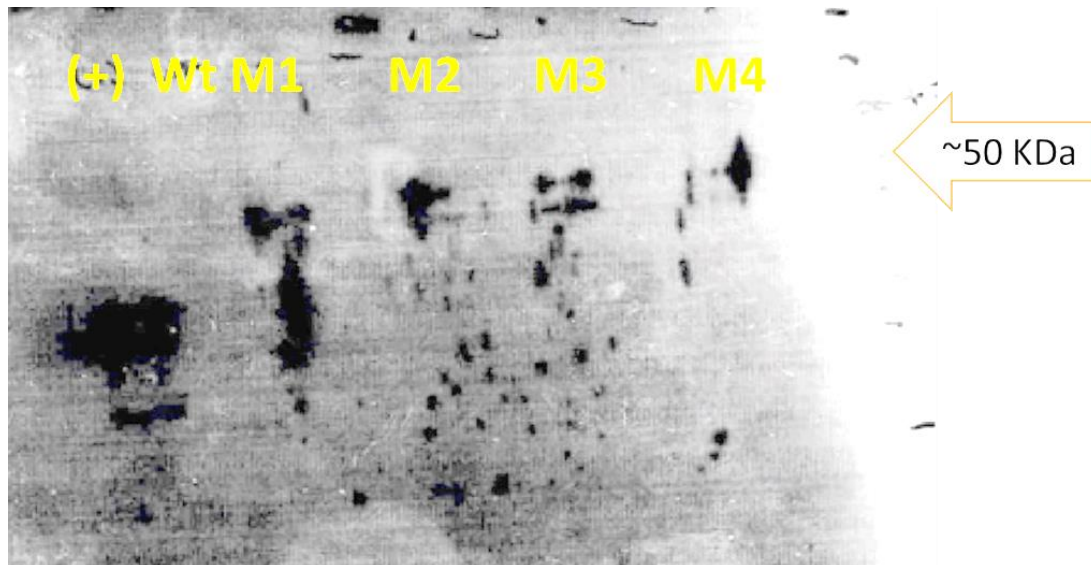


Fig. 34 Análisis de expresión de la proteína CsPP16-Defensina fusionada con GFP.

#### VII.V Análisis de acumulación de CsPP16-defensina por microscopía confocal

Para la detección de GFP en las plantas transgénicas, se realizaron cortes de hojas y tallos de las plantas. (Fig. 35, 36, 37, 38).

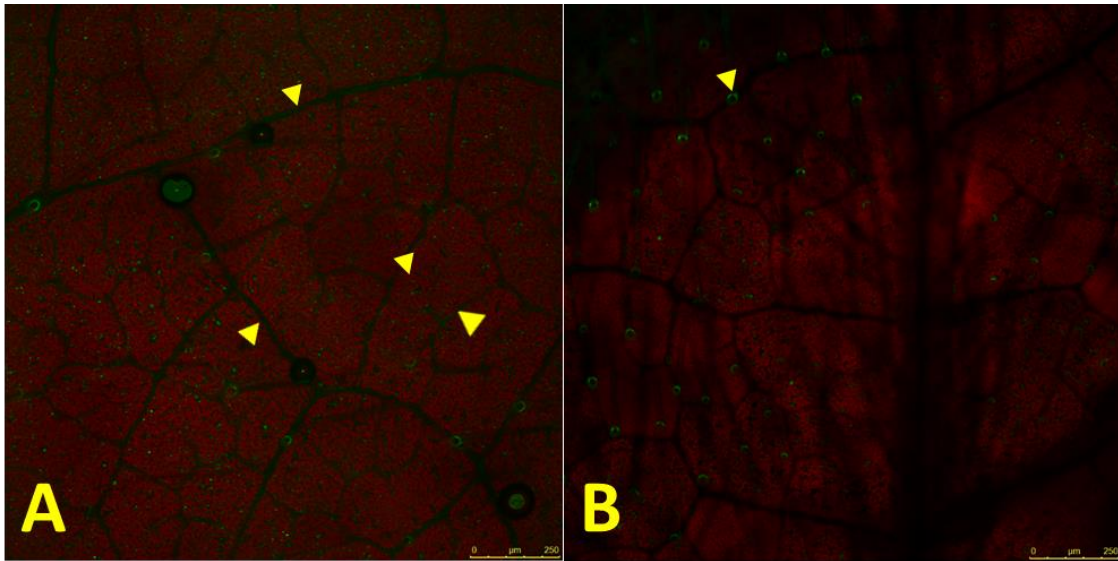


Fig. 35 Imagen confocal de la superficie del haz de hojas de soya a) GM y b) WT.

En la figura 35, en el panel A) muestra la presencia de GFP en nervaduras del segundo y tercer orden, en contraste con el panel B) únicamente se detecta la autofluorescencia en la base de los tricomas y de la clorofila en color rojo.

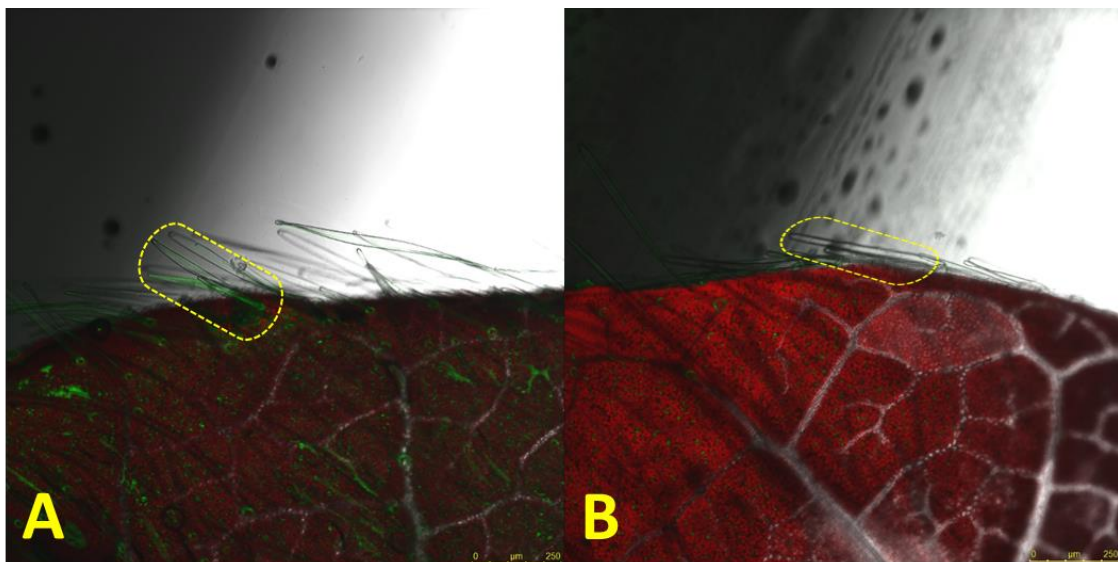


Fig. 36 Margen de hojas de soya A) Tricomas con presencia de GFP en plantas GM, B) Tricomas sin presencia de GFP en plantas WT.

En la figura 36, panel A, se observa la presencia de GFP en los tricomas que se encuentran en el margen de la hoja, también se observa la acumulación de GFP en las nervaduras de la hoja, por otra parte en el panel B únicamente se observa la autofluorescencia de la base de los tricomas.

En la figura 37 panel A, la cual corresponde a un escaneo superficial del haz de las hojas de soya, se observa GFP en las células oclusivas y el ostiolo de los estomas de la planta, GFP está presente en los tricomas glandulares. En el panel C, únicamente se observa la autofluorescencia de la epidermis de las hojas.

El panel B, de la figura 37, corresponde a un corte transversal de la hoja y se observa GFP en estomas y los anillos del xilema, el panel D, se muestra un corte transversal de una hoja WT, en la que únicamente se observa la autofluorescencia de la epidermis de la hoja.



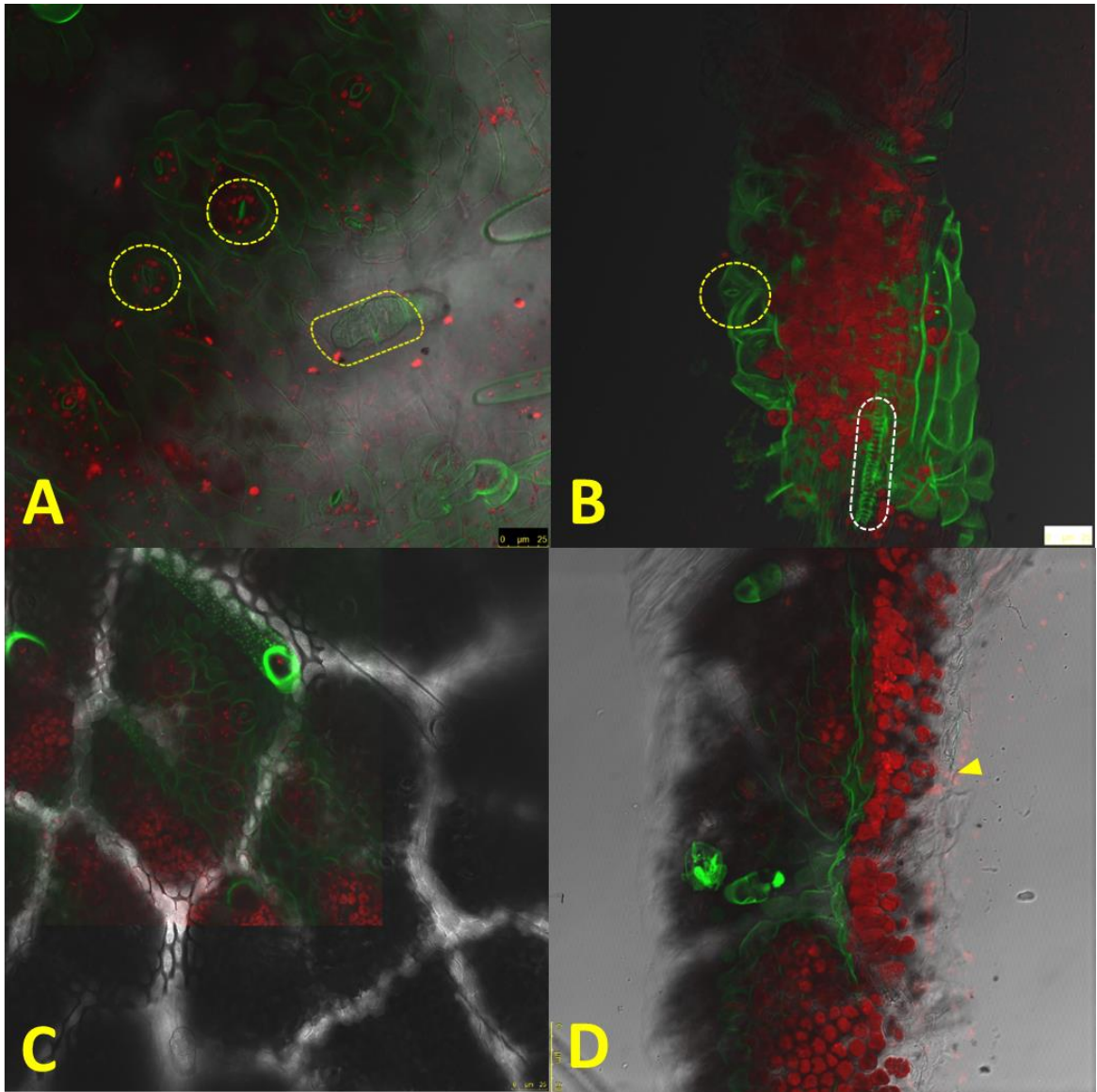


Fig. 37 Imagen confocal del haz de la hoja expresando GFP fusionada a Defensina y CsPP16 en haz (A y C) y cortes longitudinales de hojas de soja (B y D), A y B plantas GM, y C y D plantas WT.

La figura 38 corresponde a un corte transversal del tallo de las plantas de soya en la cual se observa GFP en el área vascular de la planta, se observan los anillos fluorescentes, en el xilema y parte del cambium, y se puede notar que no están presentes en la imagen del panel B, que corresponde a una planta WT.

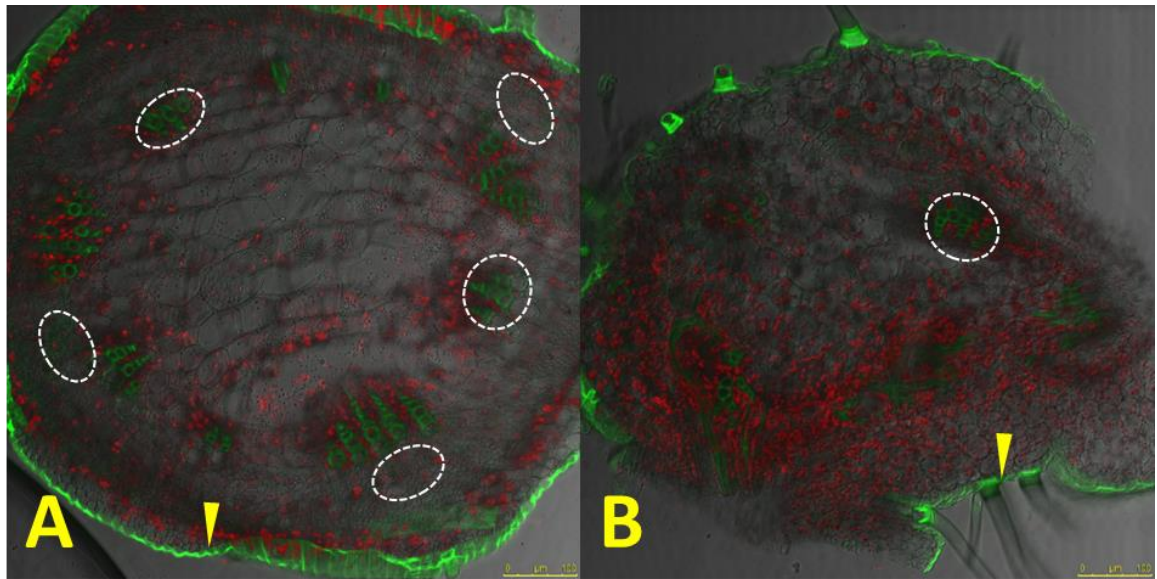


Fig. 38 Escaneo en cortes trasversales del tallo de plantas de soya A) GM y B) WT.

## VII.VI Número de copias insertadas en el genoma de la soya

Para corroborar la transformación de las plantas de soya se realizó una ddPCR para determinar el número de copias del gen CsPP16-Defensina insertados en el genoma, en las cultivares elite altamente productoras de proteínas el gen se insertó 2 veces, mientras que en los cultivares H400 existen 4 copias del genoma en las plantas transformadas.

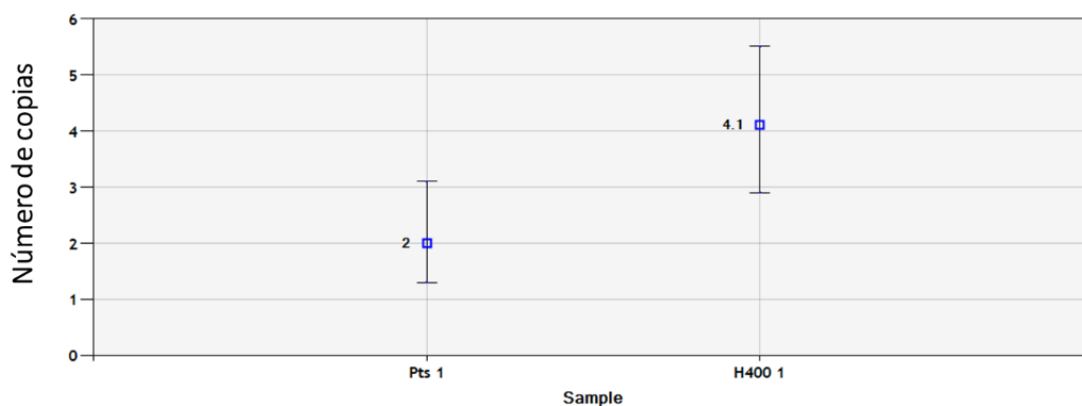


Fig. 39 Determinación de número de copias insertadas en el genoma de soya

## VIII DISCUSIÓN

### VIII.I Obtención del vector de expresión

Se obtuvieron dos vectores de expresión del transgen en plantas, uno en pB7GW2D,0 y otro en pB7FGW2D,0. Durante el proceso llevado a cabo para obtener los vectores de expresión se conservaron las cepas obtenidas, en el siguiente cuadro se muestran las cepas conservadas.

Tabla 17 Cepas crio-conservadas.

Construcción	Cepa en la que se conservo
pCR <sup>TM</sup> 8/GW/TOPO-CsPP16-Def(C/T)	<i>E. Coli</i>
pCR <sup>TM</sup> 8/GW/TOPO-CsPP16-Def(C/T)	<i>E. Coli</i>
pB7WG2D,0-CsPP16-Def	<i>E. Coli</i>
pB7FWG2D,0-CsPP16-Def	<i>E. Coli</i>
pB7WG2D,0-CsPP16-Def	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
pB7FWG2D,0-CsPP16-Def	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>

Las construcciones de CsPP16-Defensina contenidas en pCR<sup>TM</sup>8/GW/TOPO pueden ser usadas para probar otros vectores binarios ya que la recombinación de los sitios Att1 y Att2, permite recombinar este gen con otros vectores que pertenezcan a la tecnología Gateway.

## **VIII.II Obtención de plantas de soya genéticamente modificadas**

La transformación de soya se realizó usando el protocolo de la Universidad de Iowa (Paz, et al, 2009), para lo cual se utiliza el embrión adherido a uno de los cotiledones y a partir de este se obtiene una planta de soya, mediante el uso de dos diferentes medios (Gamborg's B5 y MS), además se usan distintas hormonas para estimular el crecimiento de los explantes.

Para la transformación de soya se usaron cuatro cultivares distintos, los cuales han sido descritos previamente.

La obtención de plantas GM, siguiendo las recomendaciones publicadas de la Universidad de Iowa toma alrededor de cuatro meses, sin embargo al eliminar el uso de glufosinato de amonio después de la etapa de Co-cultivo, se obtiene un mayor número de explantes recuperados. Cuando se usó el herbicida después de la etapa de Co-cultivo, se obtuvo una regeneración de explantes de entre un 20 y 40%, y cuando se eliminó el uso herbicida, la regeneración aumentó, obteniéndose entre el 50 y 65% de regeneración en la primera etapa. Hasta antes de pasar las plantas a tierra se calculó un índice de regeneración de entre un 20 y 35 % bajo las instrucciones del protocolo y para el método modificado la regeneración fue de entre el 40 y 50%. Uno de los pasos críticos en la transformación de plantas fue el paso de medio de cultivo a tierra, ya que alrededor del 50% de las plantas transferidas a tierra no se acondicionaron adecuadamente y murieron.

Otro paso crítico identificado en el proceso de transformación de plantas es el retiro de la testa y la incisión de los cotiledones de la semilla, debido a que la testa sirve a

las semillas imbibidas como protección contra la deshidratación. Al retirar la testa los cotiledones quedan desprotegidos y una alta pérdida de humedad trae como consecuencia la muerte del embrión. Por tal motivo, es recomendable que durante este paso los cotiledones sean sumergidos lo más pronto posible en el medio de agro-infiltración.

Durante el proceso de obtención de plantas GM, se realizó extracción de DNA, RNA y proteínas a las plantas para llevar a cabo los análisis correspondientes.

### **VIII.III Corroboración de plantas transgénicas**

Se les realizó extracción de DNA a las plantas que sobrevivieron al herbicida, y por PCR se corroboró la presencia de CsPP16-Defensina, el porcentaje de plantas con presencia del transgen fue de entre un 60 y 80% según el cultivar. Hasta esta etapa podíamos decir que en el genoma de la planta se insertó el gen de nuestro interés.

### **VIII.IV Corroboración de la transcripción de CsPP16-Defensina**

La extracción de RNA se realizó para corroborar si el gen se estaba transcribiendo, es decir que pasaba de DNA a RNAm, para posteriormente sintetizar la proteína. Para este análisis se tomaron grupos de 5 plantas por cultivar y se analizaron por RT-qPCR, para lo cual se midieron los niveles de expresión de CsPP16-Defensina, usándose como normalizador el gen endógeno cox (citocromo oxidasa), los resultados se analizaron con el método  $\Delta\Delta Ct$ , este método es el más usado para medir la expresión génica. Los resultados dicen que en efecto tenemos RNA's del gen de interés y que hay variabilidad de la expresión entre los mismos cultivares, podemos asegurar esto porque en las gráficas se observa que en los cultivares H200

y las altamente productoras de proteínas hay niveles de expresión 0.4 veces más que en la muestra de referencia, por otro lado en los cultivares H400 y altamente productoras de aceites los niveles de expresión son hasta 23 veces más que en la muestra de referencia.

Los resultados obtenidos de la expresión, sugieren que puede haber distintos factores que eviten la uniforme expresión en todas las plantas. El lugar de inserción del gen es clave para explicar estos resultados, en plantas la expresión puede estar regulada por la región del genoma en la cual se insertó el gen de interés, el gen pudo haberse insertado en una región del genoma transcripcionalmente activo y esto favorece al gen para expresarse, y por otra parte puede suceder lo contrario, que el gen se inserte en una región transcripcionalmente inactiva o bajamente activa y no permita que el gen se exprese. Por otro lado la planta puede regular la expresión de genes mediante el complejo Dicer-like, este complejo puede identificar la presencia de un alto número de mRNAs y destruirlos evitando la traducción de proteínas.

Hasta este punto podemos asegurar que tenemos la inserción de CsPP16 y también se está transcribiendo.

### **VIII.V Corroboración de la síntesis de la proteína CsPP16-Defensina**

Para detección de la proteína se realizó un análisis de Western-Blot, se usó el extracto crudo de proteínas de plantas de soya transformadas con el gen CsPP16-Defensina fusionado a GFP. Los resultados demuestran la expresión de la proteína en las plantas de soya.

#### **VIII.VI Acumulación de la proteína CsPP16-Defensina en las plantas de soya**

Para el análisis de la acumulación de proteínas se usaron las plantas transformadas con CsPP16-Defensina fusionada a GFP. Los resultados indican la acumulación de la proteína en diferentes partes de la planta.

Se detectó la presencia de la proteína en hojas; encontrándose en el mesófilo y nervaduras de 2°, 3° y 4° orden, así como en la epidermis, también hay evidencia de que se encuentra en los tricomas y estomas. Lo anterior es de completamente alentador debido a que la germinación de las uredosporas de la roya asiática de la soya inicia en la epidermis de las hojas y durante la penetración atraviesa tanto los estomas, como la epidermis, esto da una gran ventaja a las plantas debido a que puede defenderse de este patógeno durante las primeras etapas de la infección, lo cual brinda una mayor ventaja a comparación de los fungicidas.

Por otra parte la detección de la proteína en el sistema vascular de la plantas, en tallo y hojas, también brinda protección al ataque del patógeno en etapas avanzadas de la infección.

#### **VIII.VII Detección del número de insertos de CsPP16-Defensina en el genoma de la planta**

En cultivares elite altamente productoras de proteínas se detectaron 2 copias del gen de interés, mientras que en cultivares H400 se detectaron 4 copias del gen en el genoma de la planta.



## IX. CONCLUSIONES

Se cuenta con el fragmento de CsPP16-Defensina en el vector pCR<sup>TM</sup>/GW/TOPO conservado y puede ser usado para recombinarse con vectores binarios de la tecnología Gateway.

Se cuenta con CsPP16-Defensina en vectores binarios, listos para ser usados para la transformación genética de soya.

Se demostró la eficacia del protocolo de la Universidad de Iowa (Paz, et al, 2005), para la transformación de soya. Asimismo, se obtuvo una mejor eficiencia modificando el protocolo de transformación de soya, lo cual representa un aporte al método de obtención, mismo que se puede aplicar a diferentes variedades de este cultivar.

Se demostró la presencia del inserto del CsPP16-Defensina, la transcripción de los mRNAs, y la expresión de la proteína. Estas evidencias experimentales indican que la unidad de expresión empleada es funcional.

La proteína se localiza en estructuras estratégicas de la planta, para defenderse ante el ataque de la roya asiática de la soya, tal es la evidencia de la detección de la proteína en células de mesófilo y estomas.

El número de insertos del gen CsPP16-Defensina juega un papel importante en la expresión de la proteína.

Los resultados obtenidos de los análisis que se hicieron a las plantas de soya indican ser muy prometedoras para defenderse ante el ataque de la roya asiática de la soya

en campo. Como perspectivas del trabajo presentado, será muy importante retar a las plantas obtenidas con uredosporas de la soya asiática, con el objeto de cuantificar los niveles de protección que poseen las plantas genéticamente modificadas de soya contra este patógeno.

## X Bibliografía

Agencia de Servicios a la Comercialización y Desarrollo de Mercados Agropecuarios (ASERCA). 2015. Panorama Mundial de los Granos. SAGARPA. México, DF.

AgroBio. 2012. Marco Regulatorio de los Organismos Genéticamente Modificados (OGM) Destinados a la Agricultura. CIBIOGEM. México, D.F.

Birnboim C. J., J. Dolly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.

Braverman V., G. López R., y M. Saint B. 2003. Usos y aplicaciones de la Biotecnología Moderna. Asociación Americana de la Soya.

Bromfield K., R. 1984. Soybean Rust. *American Phytopathological Society.* 11: 65 pp.

Cámara de Diputados del Congreso de la Unión. 2005. Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados. *Diario Oficial de la Federación.* México, D.F.

Cárcamo R. A., y J. Aguilar R. 2006. First Report of Asian Soybean Rust Caused by *Phakopsora pachyrhizi* from Mexico. *Plant Disease.* 90: 1260 pp.

Du Preez E., N. Van R., K. Lawrance., M. Miles., and R. Frederick. 2005. First Report of Soybean Rust (*Phakopsora Pachyrhizi*) on Dry Beans in South Africa. *Plant Disease.* 89: 206 pp.

Espinosa-Huerta E., A. Quintero-Jiménez., B. Sánchez-García M., J. Acosta-Galleos A., M. Mora-AvilésA. 2013. Resistencia a *Colletotrichum lindemuthianum* en frijol común transgénico, expresando el gen defensina de *Arabidopsis thaliana*. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 7: pp.

Estrada-Navarrete G., X. Alvarado-Affantranger., J. Olivares E., G. Guillen., C. Díaz-Camino., F. Campos., C. Quinto., P. Gresshoff M., and F. Sanchez. 2007. Fast, efficient and reproducible genetic transformation of *Phaseolus spp.* by *Agrobacterium rhizogenes*. Nature Protocols. 2: 1819-1824 pp.

FAO. 2006. Informe de Políticas, Dirección de Economía Agrícola y del Desarrollo. Suiza.

Fehr W. R., C. Caviness E., D. Burmod T., and J. Pennington S. 1971. Stage of development descriptions for soybean, *Glycine max* (L.) Merril. Crop Sci. 11: 929-931 pp.

Ganz T. 2003. Defensin: antimicrobial peptides of innate immunity. Nature Reviews Immunology. 3: 710-720 pp.

Gao A. G., S. Hakimi M., C. Mittanck A., Y. Wu., B. Woerner M., D. Stark M., D. Shah M., J. Liang., and C. Rommens M. 2000. Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. Nat Biotechnol. 18: 1307-1310pp.

Gaspar M. Y., A. McKenna J., S. McGinness B., J. Hinch., S. Poon., A. Connelly A., A. Andersn M., and L. Heath R. 2014. Field resistance to *Fusarium oxysporum* and *Verticillium dahliae* in transgenic cotton expressing the plant defensin NaD1. Journal of Experimental Botany. 65: 1541-1550 pp.

Gutiérrez G. D. F., R. Medrano R., B. Xoconostle C. 2015. Estado Actual de los Cultivos Genéticamente Modificados en México y su Contexto Internacional. Purrua Print. México, D.F.

Hartman G. L., M. Miles R., and R. Frederick D. 2004. Epidemiology and spread of soybean rust. American Seed Trade Association Conference Proceedings.

Keogh R. C., B. Deverall J., and M. Stella. 1980. Comparison of histological and physiological responses to *Phkopsora pachyrhizi* in resistant and susceptible soybean. Transactions of the British Mycological Society. 74: 329-333.

Kim N. 2002. Preguntas y respuestas acerca el tema de la soya biotecnológicamente desarrollada. Asociación Americana de Soya.

Kirk P. M., P. Cannon F., J. David C., and J. Stalpers A. 2001. ). Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi Ninth Edition. wallingford, UK: CABI Publishing.

Koch E., F. Ebrahimnesbat., and H. Hope H. 1983. Light and electron-microscopic studies on the development of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Syd) in susceptible soybean leaves. Phytopathologische Zeitschrift. 106: 302-320 pp.

Li X., P. Esker D., Z. Pan., A. Dias P., I. Xue., and X. Yang B. 2010. The uniquenesses of the soybean rust pathosystem: and improved understanding of the risk in different regions of the world. Plant Disease. 94: 796-806 pp.

Liu X., J. Jing., G. Wang., and S. Herbert J. 2008. Soybean yield physiology and development of high-yielding practices in Northeast China. Field Crops Research. 105: 157-171 pp.

McLeans B.J., E. Greene A., and P. zambryski C. 1998. Mutans of Agrobacterium VirA that activate the vir gene expression in the absence of the inducer acetosyringone. J. Biol. Chem. 269: 2645-2651 pp.

Metha Y. R., y J. Barea. 1994. Enfermedades de la soya y su manejo. CIAT. Bolivia. 86 p.

Miles M. R., C. Levy., W. Morel., T. Mueller., T. Steinlage., V. Rij N., R. Frederick D., and G. Hartam L. 2007. International fungicide efficacy trial for the management of soybean rust. Plant Disease. Vol. 91 # 11. 1450-1458 pp.

Miles M. R., R. Frederick D., and G. Hartman L. 2003. Soybean Rust: Is the US Soybean Crop at Risk? American Phytopathological Society. APS Net.

Nakajima H., T. Muranaka., F. Ishige., K. Akutsu., and K. Oeda. 1997. Fungal and bacterial disease resistance in transgenic plants expressing human lysozyme. Plant Cell Reports. 16: 674-679 pp.

Pacheco M. B. 2003. Control en la importación de productos transgénicos. Tesis UNAM. Facultad de Derecho. México, D.F.

Park C. H., Y. Kang H., H. Chun J., 2002. Characterization of a stamen-specific cDNA encoding a novel plant defensin in chinese. Plant Mol. Biol. 50: 59-69 pp.

Paz M., J. Martinez C., A. Kalvig., T. Fonger., K. Wang. 2006. Agrobacterium-mediated transformation of soybean and recovery of transgenic soybean plants. Plant Transformation Facility. Iowa State University.

Ploper D. L. 2004. La roya de la soja. In principales conclusiones del panamerican Soybean Rust Workshop. Publicación especial No. 24. Tucumán, Argentina. 24 pp.

Ratnaparkhe M., B., R. Singh J., and J. Doyle J. 2011. Wild Crop realites: Genomic and breeding resourcses. Chittarabjan Kole (Ed). Springer. Berlin Heidelberg. 83-116 pp.

Rivera D. M., R. Astorga C. K., S. Vallejo C., I. Vargas A., E. Sánchez S., 2011. Embriones Transgénicos de Mango (*Mangifera indica*) cv. "Ataulfo" con el gen de la defensina J1. Revista Mexicana de Fitopatología. 29: pp.

Rojas A. A. C., y H. Zamora E. M. 2010. Defensinas de plantas y su uso potencial como controladores de plagas en la agricultura. Acta Biológica Colombiana. Vol. 15 # 3: 33-46 pp.

Sambrook J., E. Fritsch F., and T. Maniatis. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Santospietro G. 2005. *Phakopsora pachyrhizi*. Virginia Instirute. Disponible en: <http://pathport.vbi.vt.edu/pathinfo/pathogens/P-p.html>

Schaefer S. C., K. Gasic., B. Cammue., W. Broekaert., E. Van Damme J. M. W. Peumans J., and S. Kobarn S. 2005. Enanced resistance to early bliht in transgenic tomato lines expressing heterologous plant defense genes. Planta 222: 858-866.

Servicio de Información Agroalimentaria y Pescara (SIAP). 2014. Producción Nacional de Soya. SAGARPA. México, DF.

Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). 2010. Historia en México de los OGM's. SAGARPA. México, D.F.

Sistema Coordinado de para la Vigilancia de Plagas Reglamentadas y su Epidemiología (SCOPE<sub>MX</sub>). 2015. Estatus Fitosanitario de la Roya Asiática de la Soya. SAGARPA. México, D.F. <http://www.scopemx.uaslp.mx/>

Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria (SINAVEF). 2015. Epidemiología Fitosanitaria. SAGARPA. México, D.F. <http://portal.sinavef.gob.mx/EpidemiologiaFitosanitariaInicio.html>

Terán V. A. P. 2013. Ficha Técnica No. 23 Roya Asiática de la Soya *Phakopsora pachyrhizi* Sydow. SENASICA. México, D.F. 26 pp.

Torres T. N., y A. Tovar-Palacio R. 2009. La historia del uso de la soya en México, su valor nutricional y su efecto en la salud. Salud pública México. 51 #3: 246-254 pp.

Tzifira T., Citovsky. 2002. Partners-in-infection: host proteins involved in the transformation of plant cells by *Agrobacterium*. Trends in Cell Biology. 12: 121-129 pp.

United States Department of Agriculture – Animal and Plant Health Inspection Service (USDA-APHIS). 2015. Disponible en: <http://www.aphis.usda.gov/wps/portal/aphis/home/>

Upendra K. S. S., B. Ghag S., and R. Ganapathi T. 2014. Transgenic Approaches for Development of Disease Resistance in Banana. Plant Cell Culture Technology. 337: 18-23 pp.



Vavilov N. I. 1992. Origin And Geography of Cultivated Plants. Doris Love. Cambridge University press. Great Britain. 505 p.

Xin-Wu P., C. Shi-Kai., W. Rui-Ming., Y. Shang., H. Jia-Qiang., Z. Yong-Qiang., W. Bing-Shang., W. Zhi-Xing., and J. Shi-Rong. 2005. Creation of Transgenic Bananas Expressing Human Lysozyme Genes for Panama Wilt Resistance. Journal of Integrative Plant Biology. Vol. 47 # 8: 971-977.

Xoconostle-Cázares B., X. Yu., R. Ruiz-Medrano., L. Wang H., J. Monser., B. Yoo C., K. Mc Faland C., V. Franceschi R., and W. Lucas J. 1999. Plant homolog to viral movement protein that potentially transports mRNA into the phloem. Science. 283: 94-98 pp.

Yorinori J. T., J. Nunes Jr., and J. Lazzarotto J. 2004. Ferrugem "asiática" de soja no Brasil: evolução importância econômica e controle. EMPRA. Londrina, Brasil. 247: 36 pp.

Zambryski P., and K. Crawford. 2000. PLASMODESMATA: Gatekeepers for Cell-to-Cell Transport of Developmental Signals in Plants. Cell and Developmental Biology. Annual Reviews. 16: 393-421.

Zupan J. R., V. Citovsky., and P. Zambryski. 1996. *Agrobacterium* VirE2 protein mediates nuclear uptake of single-stranded DNA in plant cells. Cell Biology. 93: 2392-2397 pp.

## XI ANEXO

### XI.I Medio Luria Bertani

Cantidades para la preparación de 1 litro

<b>Bacto Triptona</b>		<b>10 g</b>
<b>Extracto de levadura</b>		5 g
<b>NaCl</b>		10 g
<b>*Bacto Agar (para medio solido)</b>		15 g

### XI.II Medio Gamborg

<b>Reactivo</b>	<b>Conc. Final</b>	<b>1 L</b>
<b>CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O</b>	0.150 g/L	1.500 g
<b>KNO<sub>3</sub></b>	2.528 g/L	25.280 g
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	0.150 g/L	1.500 g
<b>FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O</b>	27.860 mg/L	0.280 g
<b>NA<sub>2</sub> EDTA 2H<sub>2</sub>O</b>	37.250 mg/L	0.373 g
<b>MnSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O</b>	10.000 mg/L	0.100 g
<b>KI</b>	0.750 mg/L	0.0075 g
<b>ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O</b>	2.0 mg/L	0.200 g
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	3.000 mg/L	0.300 g
<b>MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O</b>	0.246 g/L	2.460 g
<b>CoCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O *</b>	0.025 mg/L	0.025 mL
<b>CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O *</b>	0.025 mg/L	0.025 mL
<b>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O</b>	0.250 mg/L	0.250 mL
<b>*</b>		

### XI.III Vitaminas B5

Reactivo	Cantidad para un litro 100X
<b>Ac. Nicotínico</b>	100 mg
<b>Tiamina HCl</b>	1000 mg
<b>Piridoxina HCl</b>	10 mg
<b>Mioinositol</b>	10 g

### XI.IV Medio MS

Solución stock inorgánica (10x)

Reactivo	Conc. Final	1 L	3 L
<b>CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O</b>	0.440 g/L	4.400 g	13.200 g
<b>KNO<sub>3</sub></b>	1.900 g/L	19.000 g	57.000 g
<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b>	1.650 g/L	16.500 g	49.500 g
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	0.170 g/L	1.700 g	5.100 g
<b>FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O</b>	27.860 g/L	0.280 g	0.840 g
<b>NA<sub>2</sub> EDTA 2H<sub>2</sub>O</b>	37.250 mg/L	0.373 g	1.110 g
<b>MnSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O</b>	16.880 mg/L	0.169 g	0.507 g
<b>KI</b>	0.830 mg/L	0.0083 g	0.025 g
<b>ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O</b>	8.600 mg/L	0.086 g	0.258 g
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	6.200 mg/L	0.062 g	0.186 g
<b>MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O</b>	0.370 g/L	3.700 g	11.100 g
<b>CoCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O *</b>	0.025 mg/L	0.025 mL	0.075 mL
<b>CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O *</b>	0.025 mg/L	0.025 mL	0.075 mL
<b>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O *</b>	0.250 mg/L	0.250 mL	0.750 mL