



Foto Flickr

ÁREA
DE BIOTECNOLOGÍA
VEGETAL Y FITOPATOLOGÍA

IMPLEMENTACIÓN DE UNA TÉCNICA PARA LA PRODUCCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS DE CLAVEL *Dianthus caryophyllus* L. VARIEDAD BAGATEL

IMPLEMENTATION OF A TECHNIQUE FOR THE PRODUCTION OF TRANSGENIC
CARNATION *Dianthus caryophyllus* L BAGATEL VARIETY PLANTS

Jairo Daniel Burgos Landazábal¹

Liliana Franco-Lara, MSc, PhD^{2, 3}

1 Estudiante de pregrado programa de Biología Aplicada, Facultad de Ciencias, Universidad Militar Nueva Granada,

2 Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Docente programa de Biología Aplicada, Facultad de Ciencias, Universidad Militar Nueva Granada

3 Autor para correspondencia: lfranco@umng.edu.co

RESUMEN

El objetivo de este trabajo era establecer un protocolo para la obtención de plantas transgénicas de clavel *Dianthus caryophyllus* L. variedad Bagatel mediado por *Agrobacterium tumefaciens*, que pueda eventualmente ser utilizado por el programa de mejoramiento de la UMNG. Se generaron las condiciones de regeneración partiendo de entrenudos de plántulas propagadas *in vitro* y se determinó la concentración del agente seleccionante. Los ensayos de transformación se hicieron con el plásmido pBI121, el cual es portador de los genes *NPTII* que confiere resistencia al antibiótico kanamicina y *GUS* que codifica para la enzima β -glucuronidasa, dentro de su T-DNA. Se evaluaron dos protocolos de transformación, con los cuales se logró la obtención de plántulas transformadas completas. La presencia de los transgenes fue detectada en plántulas transformadas por PCR con cebadores específicos para los genes *NPTII* y *GUS*, y la actividad de estos fue comprobada mediante la evaluación de la resistencia a kanamicina y por ensayos histoquímicos con un sustrato para la enzima β -glucuronidasa.

Palabras clave: *Dianthus caryophyllus*, *Agrobacterium tumefaciens*, clavel, plantas transgénicas, transformación

ABSTRACT

The objective of this work was to establish a protocol to obtain transgenic plants of carnation *Dianthus caryophyllus* L. variety Bagatel mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, to be eventually used in the carnation breeding program of UMNG. Conditions for regeneration of internode

segments from *in vitro* propagated plantlets were generated and the concentration of selecting agent was determined. Transformation assays were made with the pBI121 plasmid which carries in its T-DNA the *NPTII* gene that confers resistance to the antibiotic kanamycin and the *GUS* gene, which codes the enzyme β -glucuronidase. Two transformation protocols were evaluated and transformed complete plantlets were obtained with both. The presence of the transgenes was detected in the transformed plantlets by PCR with primers for the *NPTII* and *GUS* genes and its activity was tested by its resistance to kanamycin and by histochemical tests with the substrate for β -glucuronidase.

Keywords: *Dianthus caryophyllus*, *Agrobacterium tumefaciens*, carnation, transgenic plants, transformation

INTRODUCCIÓN

El clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) es una de las flores de corte en cultivo más importantes a nivel mundial, siendo el líder comercial en términos del número de tallos vendidos alrededor del mundo. En 35 años de actividad, Colombia se ha convertido en el primer proveedor de clavel de Estados Unidos, y en menor grado, de los países de la Unión Europea, Reino Unido y Alemania. También es el segundo exportador mundial de flores cortadas con una participación del 19%, después de Holanda responsable del 60% del comercio total, según cifras de Proexport para el año 2006 (<http://www.zeiky.net/vbecontent/library/documents/DocNewsNo8844DocumentNo7309.PDF>). En Colombia en el año 2007, el clavel y el mini clavel correspondieron al 20% de la producción de

flores, ocupando el segundo renglón dentro de la floricultura colombiana (<http://www.asocol-flores.org/>). El mercado de estas flores demanda la implementación de caracteres tales como nuevos colores, formas, fragancias y mayor duración de vida de la flor. Las técnicas biotecnológicas, como parte de programas de mejoramiento genético, pueden proveer herramientas para la introducción estable de transgenes en los cromosomas vegetales ya sea para producir

El clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) es una de las flores de corte en cultivo más importantes a nivel mundial, siendo el líder comercial en términos del número de tallos vendidos alrededor del mundo.

materiales resistentes a patógenos o con nuevas características ornamentales. El método de transformación con *Agrobacterium tumefaciens* ha sido empleado exitosamente por otros autores para la obtención de plantas transgénicas de clavel (Zuker *et al.*, 1999; Estopà *et al.*, 2001; Nontaswatsri *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005; Kinouchi *et al.*, 2006).

A. tumefaciens es un fitopatógeno del suelo que tiene el potencial de transformar genéticamente las células vegetales, causando tumores o crecimientos neoplásicos conocidos como agallas en corona, que crecen en la zona donde se une la raíz con el tallo, generando

una enfermedad agronómicamente importante que afecta a un gran número de especies de plantas dicotiledóneas (Hoekema *et al.*, 1984; Jen y Chilton, 1986; Escudero *et al.*, 1995; Tas-kin *et al.*, 1999;). Las cepas fitopatógenas poseen un megaplásmido, llamado plásmido Ti, el cual se asocia su capacidad patogénica (Beijersbergen *et al.*, 1992; Sheng y Citovsky, 1996; Gelvin, 2003; Brenic y Winans, 2005; Tzfira y Citovsky, 2006).

La capacidad de formar tumores se atribuye a la integración estable en la célula vegetal de una parte del plásmido Ti, llamado el T-ADN (Bundock y Hooykaas, 1996; Vergunst *et al.*, 1998; Kikuchi *et al.*, 2005) el cual codifica las enzimas responsables de la sobreproducción de reguladores de crecimiento vegetal como auxinas y citoquininas, causando los crecimientos neoplásicos (Komari, *et al.*, 1986; Gelvin, 2003; Brenic y Winans 2005). El T-ADN también codifica las enzimas encargadas de la síntesis de opinas, de manera que los tumores producen estas sustancias que sirven como fuente de carbono y nitrógeno para la bacteria (Sheng y Citovsky, 1996; Brenic y Winans, 2005; Gelvin, 2003; Tzfira *et al.*, 2000). El T-ADN está bordeado por dos secuencias de 25 pb (borde derecho y borde izquierdo), pero como el T-ADN no es una secuencia específica, cualquier fragmento de ADN de aproximadamente el mismo tamaño y localizado entre los dos bordes, podrá ser transportado a la célula vegetal e integrado en el genoma nuclear vegetal, generando plantas transgénicas (Brenic y Winans, 2005; Gelvin, 2003; Jen y Chilton, 1986). Para que la transferencia del T-ADN

tenga lugar, *A. tumefaciens* debe proveer la maquinaria molecular necesaria. Por un lado, los genes *chv* localizados en el cromosoma de la bacteria están involucrados en la quimiotaxis bacteriana hacia la célula vegetal herida (Tzfira y Citovsky, 2006; Brencic y Winans, 2005; Sheng y Citovsky, 1996); y por otro lado las proteínas codificadas por la región de virulencia *vir* localizadas en el plásmido Ti, la cual contiene siete loci (*virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virG* y *virH*), responden a los compuestos secretados por la planta herida para generar una copia del T-DNA, mediar su movimiento a la célula vegetal, su importación al núcleo y finalmente su integración al azar en algún cromosoma (Escudero et al., 1995; Sheng y Citovsky, 1996; Brencic y Winans, 2005; Tzfira y Citovsky, 2006).

El método de transformación con *A. tumefaciens* emplea la capacidad natural de esta bacteria para transferir T-ADN a las células vegetales. Por ejemplo, Hoeckema et al., (1983), usando técnicas de ingeniería genética manipularon un plásmido Ti eliminando el T-ADN, el cual fue transferido a un plásmido más pequeño que podía replicarse tanto en *A. tumefaciens* como en *E. coli*, llamado vector binario. Los plásmidos Ti que carecen de T-ADN se conocen como plásmidos desarmados. El segmento T-ADN integrado en un plásmido más pequeño (plásmido binario), fue manipulado para sustituir los genes que codifican las opinas y los reguladores de crecimiento mediante técnicas estándar de ingeniería genética (Bevan, 1984; Gelvin, 2003; Brencic y Winans, 2005). Estas secuencias son sustituidas por dos genes, el gen de interés y otro que confiere resistencia a un agente seleccionante como por ejemplo kanamicina, geneticina (G418), higromicina B, metotrexato, cloranfenicol, a herbicidas

como la fosfinotricina o glifosato (Bevan, 1984; De Block et al., 1987; An et al., 1987; Gelvin, 2003;) bajo el control de promotores y terminadores que permitan la correcta expresión de las proteínas en un ambiente eucariótico. Cuando los dos plásmidos (desarmado y binario) están presentes dentro de una célula de *A. tumefaciens*, el sistema de transferencia se activa en *trans*, y el T-ADN puede ser insertado en el núcleo vegetal aunque este no se encuentre localizado en el mismo plásmido Ti (Hoeckema et al., 1983; Fillati et al., 1987; Gelvin, 2003).

Los métodos de transformación vegetal requieren del establecimiento de protocolos de cultivo que permitan la producción de una planta completa a partir de una sola célula, idealmente por organogénesis directa sin pasar por callo, para tratar de disminuir al máximo los efectos de la variación somaclonal en las plantas transformadas (Frey y Janick, 1991; Sankhla et al., 1995). Secciones de tejidos vegetales tales como hipocótilos, hojas, tallos y pétalos, cocultivados con *A. tumefaciens* son blanco para la transferencia del T-ADN (Frey y Janick, 1991; Zuker et al., 1999; Estopà et al., 2001; Nontaswatsri et al., 2004; Zhang et al., 2005; Kinouchi et al., 2006). Una vez que ocurre el evento de transferencia del T-ADN, el tejido vegetal es colocado en medio para la regeneración de plántulas (van Alvorst et al., 1992; Venkatachalam et al., 2000). El agente seleccionante elimina las células no transformadas permitiendo que aquellas en donde el gen se expresa sobrevivan en presencia de esta sustancia (Kinouchi, et al., 2006; Gelvin, 2003; An et al., 1987). En este trabajo, el inserto transferido a las plantas transformadas contenía el gen GUS, el cual codifica para la enzima β -glucuronidasa, la cual es empleada como gen reportero (Zuker et al.,

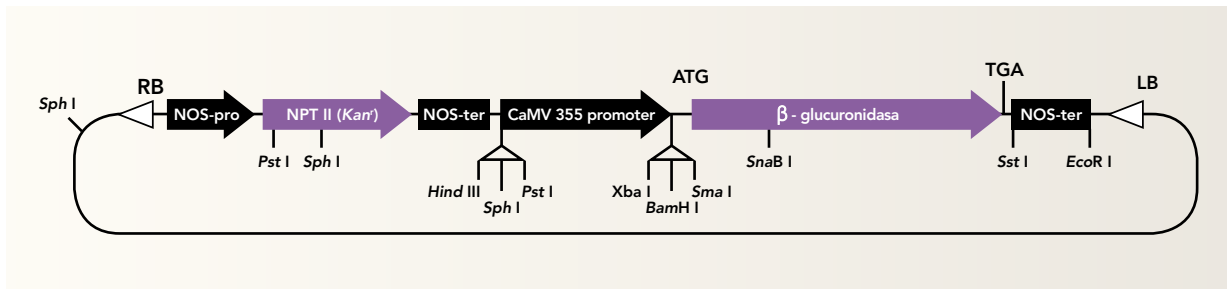


Figura 1. T-DNA del plásmido pBI121
Tomado de <http://www.fbmc.fcen.uba.ar/gtp05agbt.pdf>

1999; Estopà *et al.*, 2001; da Silva y Fukai, 2002; Nontaswatsri, *et al.*, 2004) pues en presencia del sustrato X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolyl- β -D-glucuronido), produce una precipitación azul sobre el tejido que expresa la proteína. La expresión relativa de este gen puede estimarse empleando el sustrato 4-methylumbelliferyl-b-D-glucuronido (MUG), el cual cuando es transformado se convierte en un producto fluorescente medible (Jefferson *et al.*, 1987; Shen *et al.*, 1993; Krasnyanski *et al.*, 2001).

El objetivo principal de este proyecto era estandarizar la técnica de transformación genética con *Agrobacterium tumefaciens* en la variedad Bagatel de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.), con el fin de utilizarla en el futuro como herramienta biotecnológica del programa de mejoramiento de la UMNG que pretende la producción de materiales resistentes a parásitos vasculares o con nuevos fenotipos ornamentales, mediante la introducción de elementos genéticos transponibles o nuevos genes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Los ensayos se realizaron utilizando la variedad de clavel (*Dianthus caryophyllus*) comercial

Bagatel, partiendo de material propagado *in vitro*. Esta variedad fue escogida por sus características agronómicas y de mercado. Para la transformación se utilizó la cepa de *A. tumefaciens* LBA4404 (Invitrogen) la cual contiene el plásmido Ti desarmado pAL4404, portador de la región *vir* y *ori* del plásmido Ti, pero que carece de T-ADN (Gelvin, 2003). El vector binario pBI121 fue introducido en *A. tumefaciens* por electroporación y contiene el T-ADN, es portador del gen *GUS* bajo el dominio del promotor *CaMV 35S* y el gen *NPTII* controlado por promotor *nos* (Figura 1). Para los ensayos de transformación *in vitro*, se utilizó la cepa desarmada LBA4404 (pAL 4404), la cual contiene el vector binario pBI121. La electroporación se hizo en un electroporador Eppendorf a 2,0 kV por 5,6 milisegundos. Las bacterias transformadas se sembraron en 11.2 g l⁻¹ de medio YM, con 10 g l⁻¹, 10 g l⁻¹ de agar bacteriológico y pH 7.0, con la adición de 100 mg l⁻¹ de estreptomycin y 50 mg l⁻¹ de kanamicina.

Cultivo de tejidos

Durante todo el experimento, las plántulas *in vitro* se micropropagaron cada cuatro semanas, a partir de segmentos internodales en medio basal que contenía 4.4 g l⁻¹ de sales MS

(Murashige y Skoog, 1962), 20 g l⁻¹ de sacarosa, 13 g l⁻¹ de agar y pH 5.8. Este medio basal se empleó como base para la regeneración a partir de entrenudos y hojas mediante la adición de reguladores de crecimiento, así como para los ensayos de transformación. Las plántulas se mantuvieron a 26°C, con fotoperiodo de 16h luz/8h oscuridad.

Se realizaron ensayos de regeneración para la obtención de plantas completas, en lo posible evitando la callogénesis, a partir de segmentos de hojas (cortadas en los bordes con bisturí) y entrenudos de 0.5 a 1cm a los cuales se les eliminaron las yemas, de plantas de 4-5 semanas de edad. Se empleó un medio basal modificado con diferentes concentraciones de

20 y 40 explantes por tratamiento, distribuidos en frascos de medio que contenían cuatro entrenudos. La evaluación de los explantes se realizó 4 semanas después de ser sembrados en los diferentes tratamientos, y consistió en registrar la presencia de callo, coloración de los brotes (verdes o amarillos), el número de brotes directos producidos por explante y el tiempo de aparición de estos.

Para promover la rizogénesis, los brotes que regeneraron a partir de los explantes de entrenudos fueron sembrados en medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 0.1 mg l⁻¹ ANA pH 5.8 (Zuker *et al.*, 1999). La evaluación de los brotes se realizó cada 7 días durante un mes y medio después de ser sembrados en el medio de cultivo se registró la formación o no de raíces.

Los métodos de transformación vegetal requieren del establecimiento de protocolos de cultivo que permitan la producción de una planta completa a partir de una sola célula, idealmente por organogénesis directa sin pasar por callo, para tratar de disminuir al máximo los efectos de la variación somaclonal en las plantas transformadas

Determinación de la concentración seleccionante de kanamicina

Explantes de entrenudo se colocaron en el medio inductor de regeneración evaluado anteriormente, compuesto de 4.4g l⁻¹ MS (Murashige y Skoog, 1962), 20g l⁻¹ de sacarosa, 13g l⁻¹ de agar y un

reguladores de crecimiento ANA, TDZ y BAP (Tabla 1), según ensayos reportados para la regeneración de entrenudos (Nontaswatsri *et al.*, 2004) y hojas (Frey y Janick, 1991; van Alvorst *et al.*, 1992), y se evaluaron dos concentraciones de sacarosa 20 g l⁻¹ y 30 g l⁻¹. En todos los ensayos, incluidos los controles, se evaluaron entre

pH 5.8, 0.1mg l⁻¹ de ANA y 1mg l⁻¹ de TDZ, sin kanamicina. Una semana después, los explantes (aproximadamente 20 por tratamiento) se trasladaron al mismo medio de regeneración suplementado con 50, 100 y 150 mg l⁻¹ kanamicina y un control sin kanamicina de acuerdo a lo reportado por Estopà *et al.*, 2001 y Zhang *et*

al., 2005. El efecto de la kanamicina se evaluó mediante observaciones cada 5 días durante un mes, registrando la inducción de callo, el número de explantes que regeneraron, y si los brotes se tornaban cloróticos o no.

Transformación con *Agrobacterium tumefaciens*

Se realizaron dos ensayos de transformación. En ambos casos se partió de entrenudos de 4–5mm provenientes de plántulas de 5 semanas de micropropagadas. Estos se introdujeron en 20ml de medio líquido MS con 20 g l⁻¹ de sacarosa y pH 5,8, al cual se adicionaron 100 µl de un cultivo de *A. tumefaciens*, crecido en medio YM (0,4 g l⁻¹ extracto de levadura, 10 g l⁻¹ manitol, 0,1 g l⁻¹ NaCl, 0,2 g l⁻¹ MgSO₄*7H₂O y 0,5 g l⁻¹ K₂HPO₄*3H₂O, pH 7,0), con 100 µg ml⁻¹ Streptomycin y 50 µg ml⁻¹ kanamicina a 30°C por 16

h. Los explantes se incubaron en este medio a temperatura ambiente por 20 minutos.

En el ensayo de transformación 1 (T1), los entrenudos se cocultivaron en medio de regeneración (4.4 g l⁻¹ MS, 20 g l⁻¹ sacarosa, 13 g l⁻¹ agar, 0.1 mg l⁻¹ ANA, 1 mg l⁻¹ TDZ y pH 5,8, sin antibióticos) por tres días, a temperatura ambiente, con un fotoperiodo de 16h luz/8h oscuridad. Posteriormente, los entrenudos se transfirieron por 21 días al mismo medio de regeneración suplementado con 75 µg ml⁻¹ de kanamicina y 250 µg ml⁻¹ de carbenicilina, en las mismas condiciones de incubación. Después de este periodo, la concentración de kanamicina se incrementó a 100 mg l⁻¹ durante el resto del experimento y se mantuvo durante el cultivo de los brotes regenerados. El segundo ensayo de transformación (T2) fue similar al primero, excepto porque el periodo de cocultivo fue de 5 días en las mismas condiciones de incubación, y la

	Repetición	Tratamiento	Explante	Sacarosa (g l ⁻¹)	ANA (mg l ⁻¹)	TDZ (mg l ⁻¹)	BAP (mg l ⁻¹)	Referencia
Experimento 1	1	1	Entrenudo	30	0,1	1	-	Nontaswatsri et al., 2004
		2	Hoja		0,3	-	0,3	Van Altvorst et al., 1992
		3	Hoja		1,1	0,1	-	Frey y Janick et al., 1991
		4 Control	Entrenudo		-	-	-	
		5 Control	Hoja		-	-	-	
Experimento 2	1	1	Entrenudo	20	0,1	1	-	Nontaswatsri et al., 2004
		2	Hoja		0,3	-	0,3	Van Altvorst et al., 1992
		3	Hoja		1,1	0,1	-	Frey y Janick et al., 1991
		4 Control	Entrenudo		-	-	-	
		5 Control	Hoja		-	-	-	
	2	1	Entrenudo	20	0,1	1	-	Nontaswatsri et al., 2004
		2 Control	Entrenudo		-	-	-	

Tabla 1. Concentración de reguladores de crecimiento evaluados para regeneración a partir de segmentos de hoja y entrenudos
ANA: 1-acido naftalenacético. TDZ: tidiazuron. BAP: 6-benzilaminopurina.

concentración de kanamicina fue de 125 mg l⁻¹ durante los primeros 21 días, después de los cuales se incrementó a 150 mg l⁻¹. En ambos ensayos, el medio de regeneración con antibióticos se cambió cada 10 días hasta la aparición de brotes, y el número de brotes se evaluó en cada pase. También se dispuso de controles de selección, correspondientes a entrenudos no inoculados con *A. tumefaciens*, cultivados en el mismo medio de regeneración y con las concentraciones de kanamicina usadas en cada ensayo

(sin carbenicilina), y controles de regeneración, correspondientes a entrenudos no inoculados, cultivados en medio de regeneración sin antibióticos. Los brotes se cortaban del explante cuando alcanzaban aproximadamente 4 a 5 cm de longitud, y se cultivaban en medio de enraizamiento MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 0,01 mg l⁻¹ IBA y 0,1 mg l⁻¹ ANA, para estimular su crecimiento y permitir la formación de raíces.

Detección de genes *NPTII* y *GUS* por PCR en plantas transformadas

La presencia de *NPTII* se determinó mediante selección con kanamicina (ver arriba) y por PCR. El gen *GUS* fue detectado mediante análisis histoquímico y PCR.

El ADN de las plántulas derivados de brotes transformados fue extraído por el método de

Doyle y Doyle (1990). El tejido fresco se maceró con Nitrógeno líquido y se incubó a 60°C en buffer CTAB (2% CTAB, 1,4M NaCl, 20mM EDTA, 100mM Tris HCl, 0,2% mercaptoetanol adicionado justo antes del procedimiento), por 30 minutos. Posteriormente, se hicieron extracciones orgánicas con cloroformo-isoamil alcohol (24:1). EL ADN se precipitó con isopropanol frío y el "pellet" se resuspendió en TE (10mM Tris HCl, 1mM EDTA pH 8,0). El ADN fue tratado con 10 mg l⁻¹ RNasa a 37°C por 60 minutos. Posteriormente el ADN se precipitó con acetato de amonio 2.5 M y etanol absoluto, se lavó con etanol al 75% y finalmente se resuspendió en TE. Los extractos de ADN se almacenaron a -30°C.

La presencia de los transgenes se confirmó mediante PCR usando cebadores específicos para las regiones codificantes de *NPTII* y *GUS*

Gen		Secuencia	Referencia	T° anillamiento	Tamaño de la banda
<i>GUS</i>	F	5'-CTGTAGAAACCCCA-ACCCGTG-3'	Texeira et al., 2002; Nontaswatsri et al., 2004	56°C	690 pb
	R ₁	5'-AAAGTCCCCTAGT-GCCTTGCCAGTTGC-3'	Jeyaramraja y Meenakshi, 2005		
	F	5'-CTGTAGAAACCCCA-ACCCGTG-3'	Texeira et al., 2002; Nontaswatsri et al., 2004		1244 pb
	R ₂	5'-AAAGTCCCCTAGT-GCCTTGCCAGTTGC-3'	Venkatachalam et al., 2000		
<i>NPTII</i>	F	5'-GAGAGGCTATTCGGC-TATGA-3'	Nontaswatsri et al., 2004	59°C	448 pb
	R	5'-GATGCTCTTCGTCCA-GATCA-3'	Nontaswatsri et al., 2004		

Tabla 2. Cebadores utilizados la detección de *NPTII* y *GUS* por PCR en plantas transformadas. Los productos de PCR se evaluaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) en buffer TBE 1X (0,09 M Tris-borato, 0,02M EDTA), teñidos con bromuro de etidio al 0,5 µg ml⁻¹.

(Tabla 2). Las reacciones se ajustaron a un volumen final de 15 μ l, con 2 μ l de ADN (en dilución 1:10 o 1:20 en agua), y concentración final de buffer PCR 1X, dNTPs 0,2 mM, MgCl₂ 2,5 mM, 1 μ M de cada cebador y 0,75u de *Taq* ADN polimerasa (BIOLASE™). El perfil térmico para ambos pares de cebadores fue: 5 minutos a 95°C, 35 ciclos de denaturación 1 minuto a 94°C, anillamiento 2 minutos (56° para GUS y 59 °C para NPTII) y extensión 2 minutos a 72°C y, por último extensión de 10 minutos a 72°C. Los controles positivo y negativo contenían 2 μ l de ADN de *A. tumefaciens* portador del plásmido pBI121 y agua, respectivamente.

Detección del gen *GUS* por métodos histoquímicos

El sustrato utilizado para la detección histoquímica fue el 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronido-ciclohexyl (X-Gluc), que al ser hidrolizado por la β -glucuronidasa produce un precipitado de color azul. Se preparó una solución de 2,0 mM X-Gluc, en 0,1 M buffer fosfato (NaPO₄ pH 7,0), 10 mM EDTA disódico y 0,1 % de triton X-100 (Jefferson, 1987). Muestras de hojas, tallos y raíces fueron incubadas en la solución fresca durante 24 horas, a 37°C en agitación. Posteriormente, con el fin de decolorar la clorofila presente en los tejidos para observar la precipitación azul, se hicieron lavados sucesivos en soluciones de etanol al 35%, 70% y finalmente en etanol absoluto, en cada caso por 12 h a temperatura ambiente. Aproximadamente 50 hojas de 11 clones fueron analizados por microscopía óptica a 100X, 400X y 1000X mediante cortes a mano alzada.

	Repetición	Tratamiento	Explante	Eficiencia de regeneración
Experimento 1	1	1	Entrenudo	13/28 (46,4%)
		2	Hoja	0/28 (0,0%)
		3	Hoja	0/28 (0,0%)
		4 Control	Entrenudo	3/20 (15,0%)
		5 Control	Hoja	0/32 (0,0%)
Experimento 2	1	1	Entrenudo	26/36 (72.2%)
		2	Hoja	0/36 (0,0%)
		3	Hoja	0/36 (0,0%)
		4 Control	Entrenudo	3/20 (15,0%)
		5 Control	Hoja	0/20 (0,0%)
	2	1	Entrenudo	41/60 (68.3%)
		2 Control	Entrenudo	2/20 (10%)

Tabla 3. Resultados de ensayos de regeneración de explantes de hoja y entrenudo. Eficiencia de regeneración: número explantes regenerados/ número de explantes evaluados

RESULTADOS

En la primera parte de este trabajo se evaluaron tres medios reportados anteriormente para regeneración a partir de hojas y entrenudos con el fin de determinar cual de estos permitía la regeneración de brotes, en lo posible sin pasar por la fase de callo (Tabla 1). Se hicieron ensayos a dos concentraciones de sacarosa 20 g l⁻¹ y 30 g l⁻¹. Los resultados indican que el medio que induce la regeneración de entrenudos (MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 0.1 mg l⁻¹ ANA y 0,3 mg l⁻¹ TDZ), fue más eficiente que los medios para explantes de hoja (MS (Murashige y Skoog, 1962) con 0,3 mg l⁻¹ ANA, 0,3 mg l⁻¹ BAP y MS (Murashige y Skoog, 1962) con 1,1 mg l⁻¹ ANA 0.1

mg l⁻¹ TDZ), a partir de los cuales no se obtuvieron brotes (Tabla 3). La eficiencia de regeneración de entrenudos fue solo del 46% cuando el medio tenía 30 gl⁻¹ de sacarosa, pero cuando contenía 20 gl⁻¹ de sacarosa se incrementó a 72% y 68%, en dos experimentos independientes (Tabla 3; Figura 2A y 2B). Los primeros primordios aparecieron a partir del cuarto día. Inesperadamente se observó una eficiencia de regeneración de entre el 10% y 15% en los controles de regeneración, en los cuales los entrenudos fueron cultivados en medio sin reguladores de crecimiento. En consecuencia, se decidió usar entrenudos para los experimentos posteriores.

Para promover el enraizamiento de los brotes obtenidos por regeneración, 26 de estos fueron colocados en el medio basal suplementado con 0,1 mg l⁻¹ de ANA después de un mes los brotes generaron raíces, mientras que los brotes colocados en medio basal sin esta hormona no desarrollaron raíces, pero si grandes hojas en la base del tallo.

Antes de la transformación, se realizaron ensayos para determinar la concentración seleccionante de kanamicina, como una condición necesaria para la transformación. Se evaluaron tres concentraciones de kanamicina (50, 100 y 150 mg l⁻¹), adicionada una semana después de colocar los explantes en medio de regeneración. La concentración de 50 mg l⁻¹ de kanamicina permitió la regeneración de brotes en 50% de los entrenudos evaluados, así como la supervivencia del 50% de los brotes

Concentración Kanamicina (mg l ⁻¹)	Eficiencia de regeneración (%)	% formación de callo	% supervivencia de brotes
50	(8/16) 50	88	50
100	(5/16) 31	37	0
150	(0/16) 0	25	0
Control (sin kanamicina)	(17/0) 85	85	71

Tabla 4. Efecto de diferentes concentraciones de kanamicina en la regeneración de explantes de entrenudo, a los 25 días.

Eficiencia de regeneración (%): en paréntesis número brotes regenerados / número explantes evaluados.

% formación callo: número explantes con abundante callo / número explantes evaluados.

% supervivencia de brotes: número brotes no cloróticos / número brotes obtenidos.

obtenidos (presencia de brotes no cloróticos) (Figura 2C). A 100 mg l⁻¹ la eficiencia de regeneración fue baja (31%) pero los brotes que se tornaron cloróticos y no sobrevivieron (Figura 2D). La máxima concentración evaluada fue 150 mg l⁻¹, en la cual no hubo regeneración de brotes (Figura 2E). Por el contrario, la eficiencia de regeneración de los controles sin kanamicina fue del 85%, pero solo sobrevivieron 71% de los brotes regenerados (Tabla 4).

A continuación se realizaron dos ensayos de transformación, empleado la cepa de *A. tumefaciens* LBA 4404 portadora del plásmido pBI121, el cual contiene el gen reportero *GUS* y el gen de selección *NPTII*, que confiere resistencia al antibiótico kanamicina (Figura 1). Se evaluaron dos protocolos diferentes de transformación (T1 y T2) que diferían en el tiempo de cocultivo y la concentración de kanamicina para selección. En el primer tratamiento los entrenudos fueron inoculados con *A. tumefaciens*, se cocultivaron por 3 días y se colocaron en medio de regeneración suplementado con 75 µg ml⁻¹ de kanamicina y 250 µg

Tratamiento	Tasa de regeneración (%)	Tasa de callogenésis (%)	No. brotes regenerados	Eficiencia de transformación (%)
Transformación 1 (T1)	11/64 (17,2%)	19/64 (29,6%)	17	17/64 (26,6%)
Control 1 (C1)	1/8 (12,5%)	4/8 (50,0%)	1	-
Transformación 2 T2	8/58 (13,7%)	6/58 (10,3%)	12	12/58 (20,7%)
Control 2 C2	0/24 (0,0)	6/24 (25,0%)	0	-
Control Regeneración CR	6/15 (40,0%)	12/15 (80,0%)	10	-

Tabla 5. Resultados de experimentos de transformación.

Tasa de regeneración (%): número explantes regenerados / número explantes evaluados.

Tasa de callogenésis (%): número explantes con callo / número explantes evaluados.

Eficiencia de transformación (%): número brotes regenerados no cloróticos / número explantes inoculados.

ml⁻¹ de carbenicilina por 21 días, después de los cuales se colocaron a 100 mg l⁻¹ de kanamicina por el resto del experimento. Bajo estas condiciones, 17.2% de los explantes regeneraron por lo menos un brote, y el número total de brotes obtenido fue de 17 (Tabla 5; Figura 2G y 2H). La eficiencia de transformación (número de brotes regenerados no cloróticos sobre el número total de explantes inoculados) fue del 26.6%. En comparación, el control en el cual los entrenudos no fueron inoculados con *Agrobacterium* pero fueron cultivados durante los mismos tiempos y concentraciones de kanamicina, produjo solo un brote que se tornó clorótico. En el segundo tratamiento, el periodo de inoculación se incrementó a 5 días, y los explantes se colocaron en medio seleccionante a 100 µg ml⁻¹ de kanamicina y 250 µg ml⁻¹ de carbenicilina por 21 días, tras lo cual se trasladaron a 125 mg l⁻¹ de kanamicina (Figura 2I). Bajo estas condiciones el porcentaje de regeneración fue solo del 13.7% y la eficiencia de

transformación fue del 20.7%, en comparación al control de transformación donde no hubo brotes regenerados (Tabla 5; Figura 2J).

Los brotes derivados de brotes transformados, no lograron enraizar en medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962) con 0,1 mg l⁻¹ ANA en concentraciones de kanamicina de 75, 100, 125 y 150 mg l⁻¹, aunque estos no se tornaban cloróticos. Posteriormente, se encontró que la formación de raíces se podía inducir mediante la adición de 0,01 mg l⁻¹ IBA en presencia de 150 mg l⁻¹ de kanamicina, condiciones en las cuales se obtuvieron plántulas completas. En todos los casos, los brotes regenerados sobrevivieron en medio con kanamicina. En los controles (explantes no cocultivados en medio de regeneración con kanamicina) no se obtuvieron brotes regenerados, en ninguno de los dos experimentos de transformación (Tabla 5; Figura 2K). Por otro lado, a pesar de se esperaba que el medio de regeneración de entrenudos no indujera formación de callo, este se

presentó en todos los casos (tanto de regeneración como de transformación) en porcentajes variables (Tabla 5; Figura 2E y 2G).

Para determinar si en los brotes transformados el gen *GUS* también expresaba la enzima β -glucuronidasa, estos fueron sumergidos en X-Gluc, el cual se convierte en un sustrato azul que se precipita en el lugar donde se encuentra la enzima. Como producto del primer ensayo de transformación (T1) se obtuvieron 17 brotes, de estos, 16 brotes completos o secciones de estos fueron sometidos a la prueba con X-Gluc. La típica pigmentación azul fue observada en 15 de 16 brotes evaluados, mientras que de los brotes obtenidos en el segundo ensayo (T2) 7 de 9 brotes fueron positivos (Figura 3). En algunos casos se hicieron cortes de los tejidos antes de adicionar el X-Gluc lo que permitió detectar también el sustrato azul (resultados no mostrados).

Adicionalmente, la presencia de los genes *NPTII* y *GUS* fue confirmada por PCR usando cebadores específicos para cada gen. Los cebadores NPTIIF/NPTIIR (Tabla 2), permitieron la amplificación de un fragmente de 448 pb del gen *NPTII* (Figura 4A) a partir de extractos de ADN provenientes de plántulas transformadas que habían sido propagadas en medio con kanamicina. La presencia del gen *GUS* se confirmó con las parejas de cebadores GUSF/GUSR₁ y GUSF/GUSR₂, las cuales produjeron bandas de 690 y 1244pb respectivamente (Figuras 4B y 4C), partiendo de ADN de plántulas transformadas. En todos los casos, se obtuvieron bandas del mismo tamaño en el control positivo (plásmido pBI121) y en los extractos de plantas transformadas, y no se observaron bandas en los controles negativos correspondientes a ADN de plántulas no transformadas y control de agua (Figura 4A, 4B y 4C).

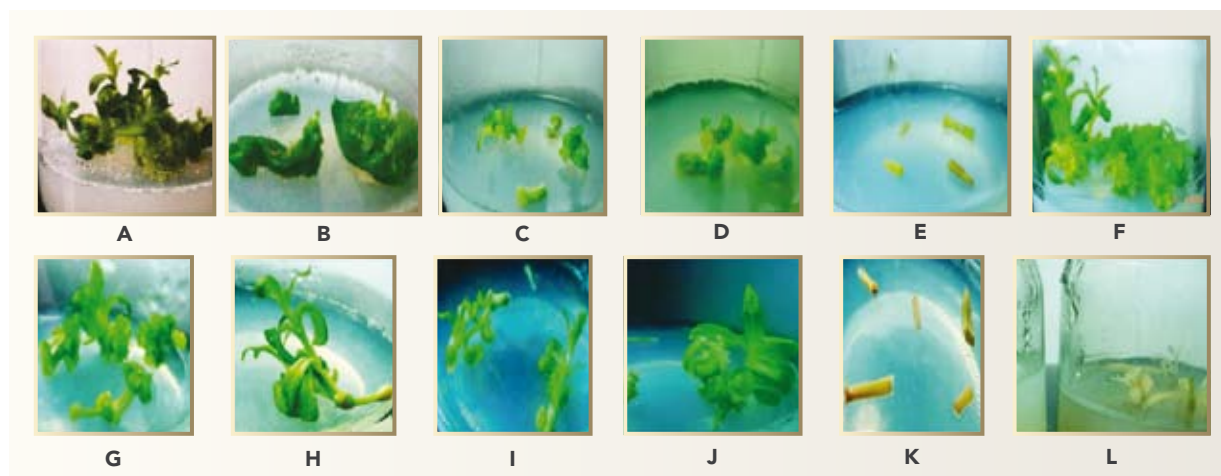


Figura 2. A, Ensayos de regeneración entrenudos; B, ensayos de regeneración con hojas (Frey y Janick, 1991); C, efecto inhibitorio de la regeneración de entrenudos (no transformados) en medio suplementado con 50 mg l⁻¹ kanamicina; D, 100 mg l⁻¹ kanamicina; E, 150 mg l⁻¹ kanamicina; F, control de regeneración sin kanamicina; G, regeneración de entrenudos transformados (T1) con 75 mg l⁻¹ a los 21 días de cocultivo; H, 100 mg l⁻¹ de kanamicina (T1) a los 42 días de cocultivo; I, 125 mg l⁻¹ Kanamicina (T2) a los 21 días de cocultivo; J, 150 mg l⁻¹ Kanamicina (T2) a los 42 días de cocultivo; K, control no transformado en 150 mg l⁻¹ de kanamicina a los 21 días de colocarse en medio con antibiótico; L, Comparación plántulas transformadas (izquierda) y no transformada (derecha) micropropagadas en medio de regeneración con 150 mg l⁻¹ kanamicina a los 112 días de cocultivo.

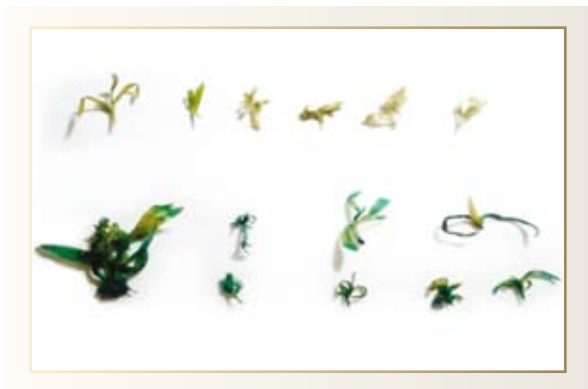


Figura 3. Detección histoquímica de la expresión del gen GUS con X-Gluc. Arriba, brotes no cocultivados crecidos en medio de regeneración con kanamicina, tratados con X-Gluc que no muestran coloración azul. Abajo, ejemplos de brotes transformados teñidos con X-Gluc, mostrando coloración azul.

DISCUSIÓN

A pesar de la fuerte oposición de algunos grupos a la siembra de plantas transgénicas, la tendencia en el mundo es un incremento de este tipo de cultivos. Según la ISAAA, en los países en vías de desarrollo, el número de hectáreas cultivadas con cultivos biotecnológicos o transgénicos aumentó de aproximadamente de 10 millones de Ha en 2000 a 50 millones de Ha en 2007 (James, 2007). En el mundo, en el año 2007 se cultivaron aproximadamente 118 millones de Ha de cultivos transgénicos (James, 2007). A la fecha, se han transformado una gran cantidad de especies vegetales con genes heterólogos, las cuales presentan mejores características de resistencia a plagas y enfermedades, aumento de la productividad, tolerancia a estrés biótico y abiótico, características nutricionales mejoradas, uso más eficiente del agua y biofábricas de sustancias farmacéuticas como vacunas, entre otros. El desarrollo de nuevas variedades mejoradas a partir de variedades

preexistentes a las cuales se les introduce uno o pocos genes, es una tecnología que tendrá un impacto en el desarrollo agrícola de los países en vías de desarrollo. Entonces, para estos países es de vital importancia construir capacidad propia para desarrollar este tipo de tecnologías, de manera que se satisfagan las necesidades internas de estas regiones (<http://www.agbios.com/docroot/articles/2000192-A.pdf>). En la actualidad, los países han adoptado controles estrictos dirigidos a garantizar la inocuidad de las plantas transgénicas para la salud humana y el ambiente, antes de ser liberados como productos comerciales. Colombia, por ejemplo, adoptó la Ley global en Biodiversidad por Convenio con las Naciones Unidas así como el protocolo de Cartagena sobre seguridad de la biotecnología. Un reto para la comercialización más generalizada de variedades transgénicas son las limitaciones debidas propiedad intelectual, pues tanto los vectores, los protocolos y las variedades a transformar suelen estar cubiertos por leyes comerciales que protegen las invenciones, pero que afectan la innovación agrícola (<http://www.agbios.com/docroot/articles/2000192-A.pdf>).

El cultivo de clavel es el segundo producto de exportación del sector floricultor colombiano, pues en 2007 cerca del 20% de las ventas internacionales de flores correspondieron a claveles o miniclaveles (<http://asocolflores.org/>). Para mejorar su competitividad, el cultivo de clavel requiere de la generación de variedades innovadoras que sean atractivas para los floristas y consumidores (<http://asocolflores.org/>). Este proyecto fue realizado dentro del marco de un programa de mejoramiento de clavel que se desarrolla en la Universidad

Militar Nueva Granada, con el fin de implementar una herramienta biotecnológica que permita la introducción de genes heterólogos o elementos genéticos transponibles ("gene tagging") con fines de mejoramiento. En el pasado otros autores han desarrollado protocolos para producción de plantas transgénicas de clavel (Zuker *et al.*, 1999, Estopà *et al.*, 2001; Nontaswatsri *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005; Kinouchi *et al.*, 2006) empleando el sistema *Agrobacterium tumefaciens*. Este trabajo generó un procedimiento eficiente para la transformación de la variedad modelo Bagatel en nuestras condiciones, que podrá ser utilizado en el futuro para la transformación de clavel dentro de este programa. El interés de transformar clavel es tal, que en la actualidad se reportan varios intentos de producción de claveles con características comerciales novedosas

como flores con vida en florero más prolongada mediante la inhibición de la síntesis de etileno (Iwazaki *et al.*, 2004), resistencia *Fusarium oxysporum* mediante la expresión de genes osmotina, PR-1 y/o quitinasa, rizogénesis, mayor productividad mediante la introducción del gen *ro1C*, y nuevos patrones de coloración y flores más aromáticas mediante la inhibición de la vía biosintética de las antocianinas (Zuker *et al.*, 1995). Empresas biotecnológicas como Florigene utiliza tecnologías transgénicas para la producción de nuevas variedades de clavel de características comerciales novedosas y atractivas para los consumidores (<http://www.florigene.com/about/whoweare.php>).

En este trabajo se logró la transformación de la variedad modelo Bagatel con el gen *GUS*, empleando un sistema mediado por *Agrobacterium tumefaciens* y empleando como agente

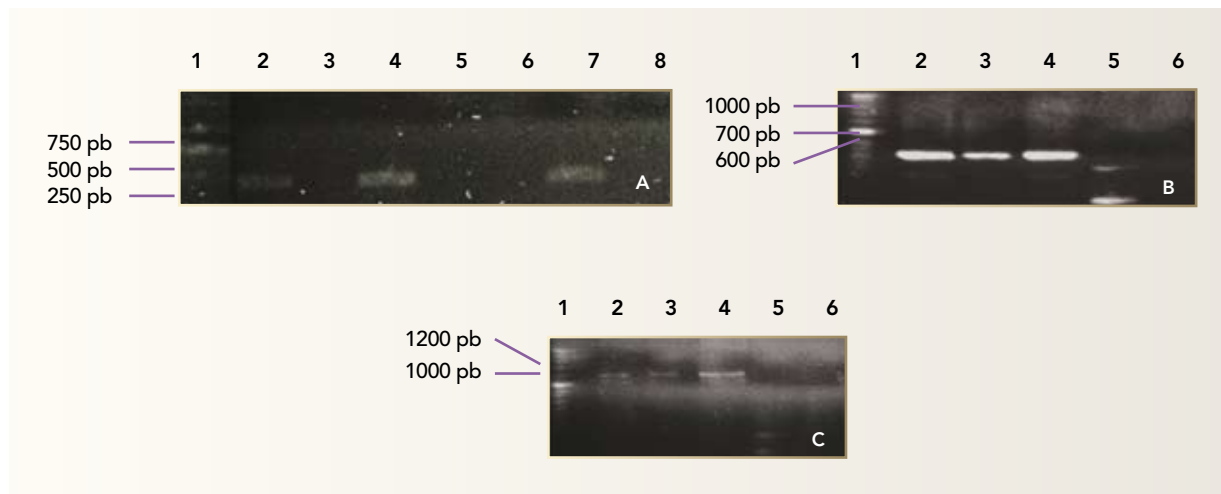


Figura 4. A. PCR con cebadores NPTIIF y NPTIIR. Carril 1, marcador de peso molecular 1Kb DNA ladder Promega; Carril 2, Clon 1 (dilución 1:10); Carril 3, Clon 1 (dilución 1:20); Carril 4, clon 2 (dilución 1:10); Carril 5, clon 2 (dilución 1:20); Carril 6, control ADN no transformado; Carril 7, ADN plásmido pBI121; Carril 8, control agua. B. PCR con cebadores GUSF/GUS R1. Carril 1, marcador molecular Hyper ladder II (Bioline); Carril 2, clon 1 (dilución 1:10); Carril 3, clon 2 (dilución 1:10); Carril 4, ADN plásmido pBI121; Carril 5, control ADN no transformado; Carril 6, control agua. C. PCR con cebadores GUSF/GUS R1. Carril 1, marcador molecular Hyper ladder II (Bioline); Carril 2, clon 1 (dilución 1:10); Carril 3, clon 2 (dilución 1:10); Carril 4, ADN plásmido pBI121; Carril 5, control ADN no transformado; Carril 6, control agua.

de selección kanamicina. En la primera parte de este proyecto se buscaron las condiciones de cultivo *in vitro* para la regeneración de brotes, a partir de explantes de entrenudo y hoja, como reportan Texeira *et al.*, 2002; Nontaswatsri *et al.*, 2004, van Alvorst *et al.* (1992) y Frey y Janick (1991) (Tabla 3). En el medio y las condiciones de incubación evaluadas, no fue posible la obtención de brotes a partir de explantes de hoja. Por otro lado, explantes de entrenudos de plantas de 4 semanas de micropropagadas se cultivaron en medio basal MS 4.4 g l⁻¹ (Murashige y Skoog,

Adicionalmente, se determinó la concentración de kanamicina capaz de inhibir la formación de brotes en explantes no transformados cultivados en medio seleccionante. La concentración de kanamicina escogida para el T1 fue de 75 mg l⁻¹, pero durante el experimento se decidió incrementarlo a 100 mg l⁻¹ después de tres semanas. En el segundo experimento, la concentración inicial de kanamicina fue de 125 mg l⁻¹ pero se incrementó a 150 mg l⁻¹ después de las tres primeras semanas. Otra diferencia entre el primer y segun-

El desarrollo de nuevas variedades mejoradas a partir de variedades preexistentes a las cuales se les introduce uno o pocos genes, es una tecnología que tendrá un impacto en el desarrollo agrícola de los países en vías de desarrollo.

1962), 20 g l⁻¹ de sacarosa, 13 g l⁻¹ de agar a pH de 5.8, suplementado con 0,1mg l⁻¹ de ANA y 1 mg l⁻¹TDZ durante un mes, para inducir regeneración. Este experimento se repitió dos veces con una eficiencia de regeneración del 72% en el primer experimento y en el segundo del 68%. Nuestros resultados indican una eficiencia de regeneración más alta que la reportada por Frey y Janick (1991) del 13%, partiendo de explantes de entrenudo de la variedad White Sim cultivados en medio basal suplementado con 1 mg l⁻¹ TDZ y 0,1mg l⁻¹ ANA. En las variedades Scania y Sandra, que también fueron evaluadas, no hubo regeneración (Frey y Janick, 1991.

do experimento de transformación fue el periodo de cocultivo, que en el primer caso fue de 3 días y el en segundo de 5 días. El mejor protocolo de transformación fue el primero, pues permitió una eficiencia de regeneración del 26,6%, mientras que en el segundo la eficiencia fue solo del 20,7% (Tabla 5). En comparación, en un trabajo de Zhang *et al.* (2005) en el cual se transformaron las variedades German Red y Gajepy con *A. tumefaciens*, se logró una eficiencia de regeneración del 7,5% y 12,5% respectivamente. En los resultados de Estopá *et al.* (2001), se observó que la eficiencia de regeneración fue del 3% para la

variedad Scania a partir de explantes de hoja, muy inferior a la obtenida en este trabajo.

En nuestras condiciones, se obtuvieron 17 brotes a partir de 64 entrenudos cocultivados, los cuales fueron cortados del explante original y crecidos en medio de enraizamiento con kanamicina. En todos los casos, los brotes regenerados sobrevivieron en medio con kanamicina, lo que indica que el transgen *NPTII* que confiere resistencia a kanamicina estaba expresándose activamente, mientras los entrenudos no transformados cultivados en las mismas condiciones no regeneraron (Tabla 5).

La presencia de los transgenes se verificó por PCR empleando cebadores específicos para los genes *NPTII* y *GUS* (Figura 4A, 4B y 4C). Todos los brotes evaluados fueron positivos para ambos genes, generando bandas del tamaño esperado. Adicionalmente, para determinar si el gen *GUS* se estaba expresando apropiadamente, se realizaron ensayos histoquímicos con X-Gluc. La típica pigmentación azul que se asocia con actividad de la β -galactosidasa fue observada en 15 de 16 brotes evaluados, mientras que de los brotes obtenidos en el segundo ensayo de transformación, 7 de 9 brotes fueron positivos (Figura 2). Es posible que en estos brotes el transgen estuviera presente pero no se expresara, o su nivel de expresión fuera indetectable.

En conclusión, se estableció una metodología que permite la transformación genética de la variedad de clavel Bagatel, mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Se espera que esta metodología sea útil en el futuro para la introducción de genes foráneos como parte del programa de mejoramiento genético que se realiza en la actualidad.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- An G, Ebert PR, Mitra A. Ha SB. 1988. Binary vectors. In Plant Molecular Biology Manual. Kluwer Academy Publishers. A3/1.1 y A3/7.
- 2- Beijersbergen A., Dulk-Ras A., Schilperoor, R, Hooykaas, P. 1992. Conjugative Transfer by the Virulence System of *Agrobacterium tumefaciens*. Science 256: 1324-1327.
- 3- Bevan M. 1984. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. Nucleic Acids Research 12: 8711-8721.
- 4- Brencic A, Winans S. 2005. Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews 69: 155-194.
- 5- De Block M, Botterman J, Vandewiele M, Dockx J, Theoden C, Dossele V, Rao Movva N, Thompson C. Van Montagu M, Leemmans J. 1987. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. EMBO Journal 6: 2513-2518.
- 6- Doyle J, Doyle J. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. American Journal of Botany 75: 1238-1240.
- 7- Escudero J, Neuhaus G, Hohn B. 1995. Intracellular *Agrobacterium* can transfer DNA to the cell nucleus of the host plant. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 92: 230-234.
- 8- Estopà M, Marfà V, Melé E., Messeguer J. 2001. Study of different antibiotic combinations for use in the elimination of *Agrobacterium* with

- kanamycin selection in carnation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 65: 211–220.
- 9- Fillati JJ, Kiser J, Rose R, Comai L. 1987. Efficient transfer of a glyphosate tolerance gene into tomato using a binary *Agrobacterium tumefaciens* vector. *Bio/Technology* 5: 726-730.
- 10- Frey L, Janick J. 1991. Organogenesis in carnation. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 116: 1108-1112.
- 11- Gelvin S. 2003. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67: 16-37.
- 12- Hoekema A, Hirsch PR, Hooykas PJ, Schilperoot, R.A. 1983. A binary plant vector strategy based on separation of vir and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303: 179-180.
- 13- Hoekema A, Roelvink P, Hooykaas P, Schilperoot R. 1984. Delivery of T-DNA from the *Agrobacterium tumefaciens* chromosome into plant cells. *The EMBO Journal* 3: 2485 -2490.
- 14- Iwazaki Y, Kosugi Y, Waki K, Yoshioka T, Satoh S. 2004. Generation and ethylene production of transgenic carnations harboring ACC synthase cDNA in sense or antisense orientation. *Journal of Applied Horticulture* 6:67-71.
- 15- James C. 2007. Resumen ejecutivo No .37 ISAAA International service for the acquisition of the agribiotech applications: Situación mundial de la comercialización de cultivos biotecnológicos/transgénicos en 2007. <http://www.agbios.com/docroot/articles/2000192-A.pdf>.
- 16- Jefferson R. 1989. The *GUS* reporter gene system. *Nature* 342: 837-838
- 17- Jefferson R, Kavanagh T, Bevan M. 1987. *GUS* fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal* 6: 3901 -3907.
- 18- Jen G, Chilton M. 1986. Activity of T-DNA borders in plant cell transformation by mini-T plasmids. *Journal of Bacteriology* 166: 491-499.
- 19- Jeyaramraja P, Meenakshi S. 2005. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of embryogenic tissues of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). *Plant Molecular Biology Reporter* 23: 299a–299i.
- 20- Kinouchi T, Endo R, Yamashita A, Satoh S. 2006. Transformation of carnation with genes related to ethylene production and perception: towards generation of potted carnations with a longer display time. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 86:27–35.
- 21- Kikuchi R, Sage-Ono K, Kamada H, Ono M. 2005. Efficient transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* with a ternary plasmid in *Pharbitis nil*. *Plant Biotechnology* 22: 295–302.
- 22- Krasnyanski S, Sandhu J, Domier L, Buetow D, Korban S. 2001. Effect of an enhanced CAMV 35S promoter and a fruit-specific promoter on UDA gene expression in transgenic tomato plants. *Society for In Vitro Biology* 37: 427-433.
- 23- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiología plantarum* 15: 473-497.
- 24- Nontaswatsri C, Fukai S, Goi M. 2004. Revised cocultivation conditions produce effective *Agrobacterium*-

- mediated genetic transformation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Plant Science* 166: 59-68.
- 25- Sankhla D, Davis T, Sankhla N, Upadhyaya A. 1995. *In vitro* regeneration of the heat-tolerant 'german red' carnation through organogenesis and somatic embryogenesis. *Gartenbauwissenschaft* 60: 228-233.
- 26- Shen W, Escudero J, Schlappi M, Ramos C, Hohn B, Koukolikova-Nicola Z. 1993. T-DNA transfer to maize cells: histochemical investigation of β glucuronidase activity in maize tissues. *Proceedings of the National Academy USA* 90:1488-1492.
- 27- Sheng J, Citovsky V. 1996. *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel. *The plant cell* 8:1699-1710.
- 28- Teixeira Da Silva J, Fukal S. 2002. Increasing transient and subsequent stable transgene expression in chrysanthemum following optimization of particle bombardment and agroinfection parameters. *Plant Biotechnology*, 19: 229-240.
- 29- Taskin K, Ercan A, Turgut K. 1999. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of sesame (*Sesamum indicum* L.). *Journal of Botany* 23: 291-295.
- 30- Tzfira T, Rhee Y, Chen M, Kunik T, Citovsky V. 2000. Nucleic acid transport in plant-microbe interactions: the molecules that walk through the walls. *Annual Reviews Microbiology* 54: 199-209.
- 31- Tzfira T, Citovsky V. 2006. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 17:147-154.
- 32- Van Altvorst A, Bruinsma T, Koehorst H, Dons J. 1992. Regeneration of carnation (*Dianthus caryophyllus*) using leaf explants. *Acta Horticulturae* 307: 109-116.
- 33- Venkatachalam P, Geetha N, Khandelwal A, Shaila M, Lakshmi G. 2000. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and regeneration of transgenic plants from cotyledon explants of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) via somatic embryogenesis. *Current Science* 78: 1130-1136.
- 34- Vergunst A, Jansen L, Hooykaas P. 1998. Site-specific integration of *Agrobacterium* T-DNA in *Arabidopsis thaliana* mediated by Cre recombinase. *Nucleic Acids Research* 26: 2729-2734.
- 35- Zhang S, Zhu L, Li X, Ahlman A, Welander M. 2005. Infection by *Agrobacterium tumefaciens* increased the resistance of leaf explants to selective agents in carnation (*Dianthus caryophyllus* L. and *D. chinensis*). *Plant Science* 168: 137-144.
- 36- Zuker A, Chang P, Ahroni A, Cheah K, Woodson W, Bressan R, Wated A, Hasegawa P, Vainstein A. 1995. Transformation of carnation by microprojectile bombardment. *Scientia horticulturae* 64: 177-185.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al profesor Juan José Filgueira, Anggie Hernández, Karen López, Andrea Segura por su colaboración durante el desarrollo de este proyecto. También a la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad Militar Nueva Granada por la financiación del proyecto CIAS 2004-001.