

## DENOMINACIÓN O TÍTULO DE LA INVENCION

**Método para la Transformación Genética y Regeneración de Plantas Transgénicas de Nopal (*Opuntia sp.*).**

0007

## CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se enmarca dentro del campo de la biotecnología aplicada al mejoramiento de cultivos de importancia económica. Se refiere a los métodos de biología molecular e ingeniería genética utilizados para la generación de plantas transgénicas mediante la introducción de genes exógenos a plantas de interés económico, a objeto de mejorar sus cualidades nutricionales, funcionales, sensoriales, de manejo pre y postcosecha, así como con el objeto de introducir dichos genes para que la planta transgénica produzca proteínas o compuestos químicos de interés alimentario, farmacéutico, industrial, y/o de alguna otra índole. Más particularmente, esta invención se refiere a un método para la transformación genética y la regeneración de plantas de nopal (*Opuntia sp.*).

## RESUMEN

La presente invención describe un sistema de métodos de cultivo de tejidos *in vitro* para la transformación genética, mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, y para la regeneración de plantas de nopal (*Opuntia sp.*). Los factores críticos usados en este sistema son: a) el uso de un medio modificado que contiene medio basal de Murashige-Skoog (MS) suplementado con bencilaminopurina, giberelina A<sub>3</sub>, y un 20% adicional de nitrógeno en el medio MS; b) la selección y utilización de las areolas (meristemas apicales y axilares) como tejido objetivo

(también llamado tejido blanco) tanto para la regeneración de plantas como para la transformación genética, en vista de la naturaleza totipotencial de dicho tejido blanco; c) el procedimiento de co-cultivo que consiste en la inoculación con la cepa pGV2260(pBI121) de *Agrobacterium tumefaciens* directamente en las areolas usando una jeringa hipodérmica; y d) la obtención de plantas transgénicas de nopal (*Opuntia sp.*) mediante selección en medio NOP1 suplementado con kanamicina. El sistema permite una eficiencia de transformación del 26% de los explantes infectados. Este método deberá ser útil para la transformación y regeneración vegetal rutinaria que involucre la introducción de genes exógenos importantes de interés en la planta de nopal (*Opuntia sp.*), en un tiempo mucho menor en comparación con los métodos tradicionales de fitomejoramiento.

#### ANTECEDENTES / ARTE PREVIO

En México, la mayor parte del territorio son zonas áridas y semiáridas que ocupan casi el 60% (1,450,000 km<sup>2</sup>) de la superficie total; presentan características de baja precipitación, temperaturas extremas y suelo con poca cantidad de materia orgánica, por lo que es muy difícil producir cultivos básicos. El cultivo del nopal (*Opuntia sp.*) se considera una buena opción para producir en estas regiones debido a que presenta características morfológicas y fisiológicas que le permiten adaptarse a condiciones de escasa precipitación. La producción de nopal ha permitido que grupos marginados obtengan empleo, se arraiguen en el campo, produzcan alimentos y generen ingresos para sus familias. Por ejemplo, los cactus del género *Opuntia* representan cerca de 100 especies que han sido usadas por cientos de años por el hombre en diferentes formas (como forraje para animales, en la producción de colorantes naturales tales como el rojo grana, para consumo directo en alimentación humana en forma de nopalitos (tallos o cladodios

0009

jóvenes) y de los frutos llamados tunas, y como fuente de compuestos nutracéuticos (Bravo, 1978; Scheinvar, 1999). La importancia económica y social del nopal en México radica, sobre todo, en la gran superficie ocupada por nopaleras, tanto silvestres como cultivadas, en el tipo y número de productores involucrados, en el tipo de regiones donde se cultiva y en la diversidad de los productos generados. Actualmente las nopaleras de especies silvestres ocupan una superficie de 30 millones de hectáreas y las cultivadas solamente 45 mil hectáreas. Sin embargo, algunos de los aspectos por los que el cultivo es problemático son: bajo potencial de producción, y la calidad y el elevado número de semillas que presentan los frutos que se comercializan, entre otros factores (Castellanos y col., 1999; De León y col., 1999; Gutiérrez, 1999).

Se estima que en México existen alrededor de 50-60 mil ha de nopal sembrado para tuna, lo que hace a este país el principal productor a nivel mundial. Se presentan rendimientos de 3-15 ton/ha de fruto fresco. La comercialización de la tuna es limitada por el corto periodo de producción (Junio-Noviembre), carencia de tecnología para manejo postcosecha y maduración rápida del fruto. En la región central de México, la cosecha de la tuna se realiza a partir de Junio en Puebla, y finaliza a principios de Octubre en Zacatecas, concentrándose la producción durante Julio y Agosto, sobre todo en los estados de México e Hidalgo.

Se llama nopal a varias especies del género *Opuntia* de la familia Cactaceae; esta familia es endémica de América. México cuenta con una gran diversidad genética de *Opuntia*, lo que probablemente lo ubica como el centro de origen del género; esto permite contar con una gran cantidad de genotipos silvestres y con diversos grados de domesticación para el aprovechamiento de las huertas familiares y comerciales (Fernández y col., 1999a). Esta diversidad se ha encontrado en atributos reproductivos, hábitos de crecimiento vegetativo y

aspectos cualitativos de relevancia en las regiones productoras de tuna  
(Fernández y col., 1999b, Vázquez Alvarado y col., 1999).

0010

No obstante que en México se puede encontrar un gran número de especies de cactus, *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller es una de las más ampliamente conocida  
5 (Pimienta-Barrios y col., 1993). En general, el valor nutritivo de los frutos del nopal se compara favorablemente con el de las manzanas, chabacanos, cerezas y naranjas (Cantwell, 1991). Sin embargo, también en términos nutricionales, el bajo contenido de proteína del nopal y de la tuna es un problema para la gente cuya  
10 dieta se halla basada principalmente en esta planta. Los procesos bioquímicos y la biología molecular que determinan el rendimiento, la resistencia a enfermedades, y las características de calidad de estas plantas apenas empiezan a ser comprendidos. Por otro lado, se sabe que la semilla es fuente de proteínas de valor alimenticio, representa del 5-10% del peso del fruto, y que contiene entre  
15 5-16% de proteína. La tuna tiene, desde el punto de vista nutritivo, una composición similar a la de otras frutas; sin embargo, la presencia de polisacáridos del tipo de los mucílagos marca en ella una gran diferencia y la hace difícil de procesar. Los nopales poseen un alto contenido de agua y presentan fibra dietaria, de gran interés en la dieta contemporánea por su capacidad de  
20 prevenir algunas enfermedades del colon, obesidad y diabetes (Aguilar Zamora, 1999; Cantwell, 1991; Gallardo y col., 1997; Sáenz, 1998; Silos Espino y col., 1999).

Adicionalmente, son varias las especies de *Opuntia* que se usan para producir nopalitos; sin embargo, *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller es la especie cultivada con  
25 mayor importancia comercial. Este es un cultivar sin espinas de mucha utilidad para la producción. La cosecha se realiza durante todo el año aunque la productividad es mayor durante la primavera y se reduce a mediados del otoño y durante el invierno (Pimienta Barrios, 1993).

0011

En cuanto a su reproducción, se reporta que *Opuntia sp.* presenta autofecundación y fecundación cruzada. Además, lleva a cabo clistogamia, modalidad de autogamia en la que ocurre la polinización antes de que se abra la flor. Los sistemas de cruzamiento son el conjunto de las expresiones sexuales de los organismos que repercuten en la composición genética de su descendencia; son también el enlace entre generaciones y el principal determinante de la estructura de las poblaciones.

El mejoramiento de cultivos de interés agrícola por los sistemas tradicionales requiere de largos periodos de tiempo; por ello el desarrollo de procesos de transformación y regeneración vegetal *in vitro* eficientes ha sido de gran ayuda para mejorar rápidamente cultivos importantes en años recientes. La producción de plantas morfológicamente normales que contienen y expresan genes exógenos (también llamados genes externos, foráneos o heterólogos) se ha hecho posible por la utilización de diferentes estrategias, siendo la transferencia natural de genes que realiza *Agrobacterium tumefaciens* una de las más utilizadas (Horsch y col., 1985). Este sistema de transformación de genes se estableció usando plantas de la familia Solanaceae por su fácil manipulación en el cultivo de tejidos; aunque un gran grupo de dicotiledóneas se pueden transformar en forma exitosa (Kaneyoshi y col., 1994). Se han adaptado protocolos a partir de la tecnología existente de transformación de meristemas y regeneración para una rápida propagación (Morel, 1972; Murashige, 1974), y han sido usados con la transferencia de genes mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Caplan y col., 1983; Chilton y col., 1977; Depicker y col., 1983).

Los recientes avances en la transformación de plantas han aumentado la posibilidad de hacer cambios genéticamente planeados y así modificar los procesos, expandiendo la utilización del germoplasma útil para los programas de mejoramiento de plantas (McElroy, 1996). Esta información es crítica para definir

el futuro de las estrategias de mejoramiento en cultivos que tienen limitaciones de adaptación (sequía, salinidad, baja temperatura), de productividad (plagas, enfermedades), y de calidad del fruto (Pimienta-Barrios, 1994). Se sabe bien que el uso del sistema de transformación mediado por *Agrobacterium tumefaciens* puede conducir a la incorporación estable de genes exógenos de interés al genoma de un número de especies vegetales (Weising y col., 1988). Ya se han reportado resultados positivos en varios cultivos económicamente importantes (Ishida y col., 1996; Li y col., 1992, Miguel y Oliveira, 1999). Sin embargo, para el nopal no hay reportes sobre su transformación genética utilizando cualquiera de las estrategias disponibles, incluyendo el sistema de *Agrobacterium tumefaciens*.

En la presente invención, se presenta un sistema de métodos para la transformación genética, regeneración y propagación *in vitro* de tejidos vegetales de nopal (*Opuntia sp.*).

## OBJETIVOS DE LA INVENCION

Teniendo en cuenta que el mejoramiento de cultivos de interés agrícola, por los sistemas naturales de cruzamiento o métodos tradicionales de fitomejoramiento genético, requiere de largos periodos de tiempo, es un objeto de la presente invención el proveer un sistema altamente eficiente de métodos que permitan la transformación genética y la regeneración de plantas de nopal (*Opuntia sp.*) con mejores características agronómicas, alimentarias, funcionales, nutricionales, y/o con composiciones y/o principios fisicoquímicos de alto valor agregado, en un tiempo mucho más corto que el utilizado en los sistemas o métodos anteriores.

Además, dadas las capacidades de la planta de nopal (*Opuntia sp.*) de crecer abundantemente en condiciones agrícolas y climatológicas adversas para otras plantas, es un objeto de la presente invención el aportar un sistema altamente

0012

eficiente de métodos que permitan la generación de plantas transgénicas de nopal que presenten capacidades de producir la planta o partes de la planta con mejores características agronómicas, alimentarias, funcionales, nutricionales, y/o con composiciones y/o principios fisicoquímicos novedosos de alto valor agregado, en condiciones agrícolas y climatológicas que son limitantes o agobiantes para muchas otras plantas.

Los objetos anteriores, así como otros objetos y ventajas de la invención, se logran mediante un sistema de métodos de cultivo de tejidos *in vitro* para llevar a cabo la transformación genética, mediada por la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, y para la regeneración de plantas de nopal (*Opuntia sp.*). Los factores críticos usados en este sistema son: a) el uso de un medio modificado que contiene medio basal de Murashige-Skoog (MS) suplementado con bencilaminopurina, giberelina A<sub>3</sub>, y un 20% adicional de nitrógeno en el medio MS; b) la selección y utilización de las areolas (meristemos apicales y axilares) como tejido objetivo (también llamado tejido blanco) tanto para la regeneración de plantas como para la transformación genética, en vista de la naturaleza totipotencial de dicho tejido; c) la utilización de un procedimiento de co-cultivo que consiste en la inoculación con la cepa pGV2260(pBI121) de *Agrobacterium tumefaciens* directamente en las areolas usando una jeringa hipodérmica; y d) la obtención de plantas transgénicas de nopal (*Opuntia sp.*) mediante selección en medio NOP1 suplementado con kanamicina.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

### Material vegetal

*Opuntia ficus-indica* cv. "Villa Nueva" fue obtenida a partir de recursos de germoplasma de Villa Hidalgo, Zacatecas, México. Se seleccionaron tallos

modificados (cladodios) jóvenes de plantas de 8 años de edad con alto rendimiento de nopalitas y de tuna (80-90 ton/ha) (Flores Valdez, 1995).

0014

### Generación de explantes en cultivo aséptico

5 A objeto de obtener explantes en cultivo aséptico *in vitro* a partir de cladodios de nopal cultivados en campo, se probaron tres tratamientos. En el tratamiento uno, se lavó la superficie de cladodios de 7-10 cm de longitud con detergente comercial y agua corriente, seguido por inmersión en Clorox (solución comercial de hipoclorito de sodio usado comúnmente como blanqueador de ropa) al 10%  
10 (v/v) por 10 min y etanol al 70% (v/v) por 5 min (Escobar y col., 1986). El tratamiento dos consistió en el tratamiento uno excepto que, antes de las inmersiones en Clorox y etanol, los cladodios fueron también sumergidos en una solución de contenía una mezcla de los siguientes fungicidas: Agrimycine (1 mg/L), Benlate (2 mg/L) y Ridomil (2 mg/L). El tratamiento tres consistió en el  
15 tratamiento dos con la adición de sulfato cúprico (300 mg/L) a la solución de fungicidas; luego se enjuagó con etanol al 70% (v/v) por 1 min, Clorox al 1.6% (v/v) por 10 min, y agua destilada estéril. Los cladodios fueron cortados en fragmentos de un centímetro cuadrado, cada fragmento conteniendo una areola.

Los experimentos iniciales para determinar las condiciones óptimas de cultivo  
20 para la inducción de brotes, a partir de explantes conteniendo areolas, no tuvieron éxito debido al alto nivel de contaminación *in vitro* con bacterias y hongos endógenos del nopal. Para resolver este problema, se probó el efecto de varios fungicidas incluyendo Agrimycine, Benlate, Ridomil y sulfato cúprico en cuanto a su capacidad de desinfección superficial para la obtención de material vegetal  
25 aséptico. El sulfato cúprico fue el único tratamiento efectivo; dió como resultado la asepsia total del 10% de los explantes, mientras que los otros fungicidas no produjeron explantes asépticos. Esta observación, sobre el efecto útil del sulfato

cúprico para la inhibición de crecimiento fúngico en cultivo de tejidos, no es una sorpresa ya que dicho compuesto ha sido usado durante mucho tiempo en el tratamiento de enfermedades fúngicas en agricultura.

0015

## 5 Regeneración de plantas

Las areolas consisten de un meristemo apical que dirige los procesos de crecimiento y desarrollo de toda la planta. Por lo tanto, se eligió a dichas estructuras como tejido objetivo debido a su alta totipotencialidad, la cual es un requisito para el cultivo de tejidos y la transformación genética de plantas.

10 Los explantes fueron cultivados para inducción y propagación de callos en medio NOP1: macronutrientes y micronutrientes, hierro, myo-inositol y vitaminas de medio de Murashige-Skoog (Murashige y Skoog, 1962) más nitrato de amonio (190 mg/L), nitrato de potasio (160 mg/L), bencilaminopurina (BAP; 2 mg/L), giberelina A<sub>3</sub> (1 mg/L), ácidos cítrico y ascórbico (150 mg/L cada uno), 2% de sacarosa, pH ajustado a 5.8 y solidificado con agar-agar (7 g/L; Bioxon). Para el  
15 establecimiento de cultivos asépticos, se usaron los lavados con las soluciones fungicidas mencionadas anteriormente. Los explantes fueron cultivados con un fotoperiodo de 16 h con lámparas fluorescentes Sylvania de luz de día blanca y fría (35  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) a 26 °C.

20 A partir de cladodios asépticos establecidos en condiciones de cultivo de tejidos, se disectaron explantes conteniendo areolas y se cultivaron en medio NOP1 para la proliferación de brotes. Se observó el desarrollo de un promedio de 30 brotes por explante después de 45 días de incubación; los brotes fueron subcultivados cada 60 días en medio NOP1 fresco. El número y calidad de brotes  
25 obtenidos con el medio NOP1 fueron similares a los reportados por Escobar y col. (1986), en cuyo trabajo se usó *Opuntia amyclaea* como fuente de material vegetal.

La alta eficiencia de nuestro protocolo de proliferación de brotes se debe al

hecho de que un cladodio de 7-10 cm puede ser disectado para obtener hasta 25 explantes, cada uno conteniendo una areola que responde eficientemente a la formación de brotes. Este proceso morfogénico es un prerrequisito para los experimentos de transformación genética de la planta, mediada por el sistema de *Agrobacterium tumefaciens* u otras técnicas alternativas de transformación genética. Después de tres semanas de incubación bajo iluminación, los brotes diferenciados de *Opuntia ficus-indica* fueron enraizados en medio basal MS conteniendo BAP (2 mg/L). Más tarde, se establecieron plantas completas en suelo para su posterior crecimiento y desarrollo.

0016

### Medios selectivos

Los ensayos de tolerancia se llevaron a cabo usando tres diferentes antibióticos aminoglicósidos: kanamicina, geneticina (G418) y paromomicina a 25, 50 y 100 mg/L, respectivamente. Se cultivaron 70 brotes en cada medio por tratamiento durante 45 días de incubación, hasta que el crecimiento y el desarrollo de los brotes fueron totalmente inhibidos. Se obtuvieron datos a los 15, 30 y 45 días.

Se llevaron a cabo ensayos de tolerancia usando kanamicina, geneticina (G418) o paromomicina a 25, 50 y 100 mg/L cada una. El agente selectivo más eficiente fue la kanamicina a 100 mg/L, ya que detuvo el crecimiento y el desarrollo en el 100% de los explantes tratados, en comparación con el 88.6% usando G-418 y el 42% con paromomicina, después de 45 días de incubación. Todos los brotes afectados por los antibióticos mostraron clorosis en su base, después de lo cual ocurrió necrosis y finalmente la muerte del explante completo. Estos resultados concuerdan con reportes previos sobre transformación genética, en los cuales se considera a la kanamicina como el mejor agente selectivo para especies de dicotiledóneas.

### Cepa bacteriana

El plásmido pBI121 (Jefferson, 1987) fue introducido en *Agrobacterium tumefaciens* cepa C58C1Rif (pGV2260) (Deblaere y col., 1985) por electroporación. Este plásmido contiene el gen de la neomicina fosfotransferasa (gen *npt II*) como marcador de selección, bajo el control de un promotor de nopalina sintasa (*nos*), así como el gen de la  $\beta$ -glucuronidasa (gen *uidA*, también llamado GUS) como gen reportero, controlado por el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. *Agrobacterium tumefaciens* fue cultivado durante una noche a 28 °C en medio Luria-Bertani (LB) líquido (Gibco-BRL, Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) suplementado con rifampicina (50 mg/L), carbenicilina (50 mg/L) y kanamicina (50 mg/L), hasta alcanzar una densidad óptica de 1.1 a 600 nm.

### Protocolo de transformación genética de plantas y generación de plantas transgénicas

Los explantes de un centímetro cuadrado fueron infectados específicamente en las areolas (Figura 1A). Las células de *Agrobacterium tumefaciens* fueron cosechadas a partir de cultivos frescos de 3 días de incubación en cajas de Petri. El proceso consiste en la inoculación usando una aguja de 29G x 13 mm en una jeringa hipodérmica estéril, inyectando aproximadamente 10  $\mu$ L de células de *Agrobacterium tumefaciens* suspendidas en agua destilada estéril (aproximadamente  $5 \times 10^3$  células) en cada punto de inyección. Los explantes infectados fueron co-cultivados por 3 días en medio NOP1 e incubados bajo iluminación con un fotoperiodo de 16 h con lámparas fluorescentes Sylvania de luz de día blanca y fría ( $35 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) a 26 °C. Después del co-cultivo, los explantes infectados fueron enjuagados tres veces con agua estéril conteniendo Cefotaxime (Claforan; 500 mg/L), y luego colocados en medio NOP1

0017

suplementado con carbenicilina (500 mg/L) para inhibir el crecimiento de *Agrobacterium* y kanamicina (200 mg/L) para seleccionar las transformantes. Los explantes fueron incubados bajo presión de selección por tres meses. Se disectaron brotes resistentes a kanamicina a partir del explante original y se transfirieron a medio fresco NOP1 para su propagación y crecimiento (Figura 1B).

0018

Los explantes de *Opuntia ficus-indica* co-cultivados con *Agrobacterium tumefaciens* fueron subcultivados en medio NOP1 suplementado con kanamicina (100 mg/L). Todos los explantes no infectados murieron después de un mes de incubación en el medio selectivo. Los tejidos de *Opuntia ficus-indica* resistentes a kanamicina comenzaron a desarrollarse a partir de las áreas infectadas (areolas) en forma de pequeñas yemas después de cinco semanas de incubación. Estas estructuras resistentes fueron disectadas del explante original para su posterior desarrollo en medio selectivo con kanamicina durante tres semanas adicionales (Figura 1B). La eficiencia de transformación genética fue del 26.3% del total de los explantes co-cultivados. En otras palabras, de 216 explantes infectados, se obtuvieron 57 plantas transgénicas. Las plantas resistentes a kanamicina fueron calificadas y subcultivadas individualmente para su posterior análisis bioquímico y molecular. La resistencia a la kanamicina de estas plantas representó la primera evidencia de transformación genética estable.

### Ensayo enzimático de $\beta$ -glucuronidasa (GUS)

Se determinó la actividad de GUS en brotes regenerados resistentes a kanamicina, mediante el ensayo histoquímico descrito por Jefferson (1987).

La expresión de GUS fue probada en todos los brotes resistentes a kanamicina. La actividad de GUS fue observada en solamente 21 de las 57 plantas resistentes a kanamicina. La expresión ocurrió principalmente alrededor de tejido vascular y en unos cuantos casos en las areolas (Figura 1C). Los explantes de nopal tipo

silvestre (no infectados) no expresaron actividad de GUS (Figura 1D). La ausencia de expresión de actividad de GUS en el resto de las plantas resistentes a kanamicina puede ser explicada en términos de silenciamiento de la expresión genética, la cual ha sido demostrada en otras especies (Lambé y col., 1995). La metilación del DNA también ha sido asociada con la pérdida gradual de expresión de GUS.

0019

Para probar la posibilidad de presencia de plantas quiméricas debidas a la compleja organización del brote apical mismo, se tomaron explantes a partir de brotes resistentes a kanamicina pero sin actividad de GUS y se subcultivaron en medio selectivo fresco cada dos semanas. Todos ellos respondieron positivamente en cuanto a crecimiento y desarrollo bajo selección, y fue posible obtener 15-20 brotes a partir de cada explante después de dos meses de cultivo bajo iluminación (Figura 1E). La expresión del gen reportero GUS aportó evidencia confirmatoria de transformación genética estable mediada por el sistema de *Agrobacterium tumefaciens* en *Opuntia ficus-indica*. Las plantas transgénicas fueron establecidas con éxito en condiciones de suelo como se muestra en la Figura 1F.

#### **Aislamiento de DNA de *Opuntia***

El DNA genómico fue aislado a partir de cladodios jóvenes usando una modificación del protocolo descrito por Shure y col. (1983). Este método modificado consiste en coleccionar aproximadamente 250 mg de tejido transgénico o no transgénico en tubos Eppendorf de 2 mL, y moler en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino usando un pistilo de vidrio unido a un homogenizador (CAFRAMO, Stirrer type RZR). Los tejidos pulverizados fueron resuspendidos con 500 µL de amortiguador de extracción (urea 7.0 M, NaCl 0.35 M, Tris-HCl 0.05 M, pH 8.0, EDTA 0.02 M, sarcosina al 1%) durante por lo menos 45 min. El

homogenado de tejido fue extraído con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1, v/v/v). La fase acuosa fue separada por centrifugación. Para asegurar los mínimos niveles de proteína y polisacáridos, el DNA se purificó adicionalmente añadiendo medio volumen de acetato de amonio 7.5 M, pH 8.0, y luego incubando a temperatura ambiente durante 60 min, después de lo cual se centrifugó a 18,000 xg durante 15 min; la fase acuosa fue entonces precipitada usando un volumen igual de alcohol isopropílico. El DNA precipitado fue lavado una vez con etanol al 70% (v/v) y resuspendido en amortiguador TE (Tris-HCl 0.01 M, EDTA 0.01 M, pH 8.0).

0020

#### **Análisis por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

El análisis por PCR se llevó a cabo de acuerdo a Williams y col. (1990). Cada muestra (150 ng de cada uno de los siete DNAs genómicos de *Opuntia ficus-indica* putativamente transgénicos) fue incubada en una mezcla conteniendo los cuatro 2-desoxirribonucleósido trifosfatos (dNTPs; 0.4 mM cada uno), cloruro de magnesio 2.5 mM, los dos oligonucleótidos iniciadores adecuados (0.4 mM cada uno), 1 unidad de Taq DNA polimerasa (Gibco-BRL, Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) y agua desionizada estéril para un volumen total de 25 µL. Los oligonucleótidos iniciadores usados para la amplificación del gen *nptII* fueron 5'-TATTCGGCTATGACTGGGCA-3' and 5'-GCCAACGCTATGTCCTGATA-3', con un producto de amplificación esperado de aproximadamente 650 pb.

Debido a la pequeña cantidad de tejido vegetal necesario para el análisis por PCR, se analizaron siete clonas transformadas que mostraban los mismos niveles de resistencia a kanamicina así como de expresión de GUS. El análisis de PCR dió como resultado el fragmento esperado de 650 pb de la región interna del gen *npt II* (Figura 2, Carriles 1-7). No se observó amplificación al usar el DNA de las plantas no transformadas (Figura 2, Carril 8). Este análisis representó una tercera

línea de evidencia en favor de la transformación genética llevada a cabo en nopal (*Opuntia sp.*).

### Análisis de transferencia e hibridación tipo Southern

0021

5 Los DNAs vegetales totales (50 µg medidos por A<sub>260/280</sub>) obtenidos a partir de plantas tipo silvestre y putativamente transformadas fueron digeridos durante la noche a 37 °C, usando 10 unidades de PstI por microgramo de DNA; luego fueron separados en geles de agarosa al 0.7% y transferidos a una membrana de Nylon (Hybond N+, Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ; Sambrook y col., 10 1989). Cada filtro fue prehibridado a 65 °C en un amortiguador conteniendo dodecilsulfato de sodio (SDS) al 7%, fosfato de sodio 0.5 M y albúmina bovina sérica al 1%, durante 4 h, e hibridado con la sonda toda la noche a 65 °C en el mismo amortiguador. Se utilizaron dos sondas marcadas con <sup>32</sup>P mediante reacciones de inicio al azar ("random priming") a partir del plásmido pBI121: un 15 fragmento PstI-PstI de 1.5 kb del gen *nptII*, o un fragmento BamHI-EcoRI de 2.0 kb del gen GUS (Feinberg y Vogelstein, 1983). Se lavaron los filtros en SSC 2x (Sambrook y col., 1989) con 0.1% de SDS a temperatura ambiente por 5 min; luego se lavaron con SSC 1x con 0.1% de SDS a 65 °C por 15 min, y un lavado final de SSC 0.5x con 0.1% de SDS a 65 °C for 5 min. Los filtros fueron 20 visualizados por autorradiografía usando película de rayos X (Cronex, Dupont).

Como una confirmación adicional de que los brotes de nopal obtenidos (resistentes a kanamicina y con actividad de GUS) eran en realidad transgénicos, se analizaron nueve clonas GUS- y PCR-positivas y una clona de tejido vegetal no transgénico mediante análisis de transferencia e hibridación tipo Southern. Al usar 25 un fragmento del gen *npt II* como sonda, todas las clonas propagadas putativamente transgénicas mostraron la señal de hibridación esperada de 1.5 kb, y se observaron por lo menos cuatro diferentes patrones de integración del gen

*npt II*, mientras que la clona no transformada no mostró hibridación (Figura 3, carriles 1-9). Después de lavados extensivos, la misma membrana fue hibridada con un fragmento de 2.0 kb del gen GUS; las señales de hibridación esperadas fueron encontradas en las correspondientes plantas transgénicas (Figura 4, carriles 1-9). Los diferentes patrones de integración fueron observados tanto con la sonda de GUS como con la del gen *npt II*. La observación de diferentes patrones de integración se puede explicar en términos de integración genética estable en cromosomas diferentes y/o en términos del número de copias que se integraron al genoma de la planta. Los resultados del análisis de transferencia e hibridación tipo Southern aportaron la evidencia confirmatoria más importante de la transformación genética estable del nopal *Opuntia sp.*

### Conclusiones

En este reporte describimos protocolos reproducibles para la transformación, para la regeneración vegetal *in vitro* y para la propagación de nopal (*Opuntia sp.*) transgénico. Se aplicó exitosamente el sistema de *Agrobacterium tumefaciens* para la transformación genética estable del nopal (*Opuntia sp.*). La eficiencia de transferencia de genes desde las células de *Agrobacterium* hacia las células vegetales fue alta de acuerdo al número relativamente alto de plantas resistentes a kanamicina obtenidas, a la actividad de  $\beta$ -glucuronidasa, y a los análisis de PCR y de transferencia e hibridación tipo Southern. Estos resultados muestran claramente que en explantes cultivados de *Opuntia*, la areola puede ser transformada fácil y rápidamente por *Agrobacterium tumefaciens*. Estas observaciones concuerdan con las reportadas por Ulian y col. (1988), Grimsley y col. (1988), Dale y col. (1989), Hussey y col. (1989), y Seabra y Pais (1998), en cuyos trabajos se reportó que en brotes de petunia, trigo, maíz, chícharo y castaña europea en cultivo, el tejido más joven (el meristemo apical) fue el mejor

tejido seleccionado como objetivo para la transformación genética por *Agrobacterium*. Por lo tanto, concluimos que es posible integrar genes de interés en especies de *Opuntia*. Este representa el primer reporte de transformación genética estable del nopal (*Opuntia sp.*).

0023

5

### Referencias

- Aguilar Zamora, A.A. 1999. Generación, validación y transferencia de tecnología del componente riego y fertilización para adelantar la floración del nopal tunero en el Estado de Hidalgo. En: Memoria VIII Congreso Nacional y VI Internacional sobre el Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal, pp. 48-49. Aguirre Rivera, J.R. y Reyes Agüero, J.A. (Eds.). 6-10 de Septiembre de 1999, Instituto de Investigación de Zonas Desérticas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Editorial Universitaria Potosina, San Luis Potosí, S.L.P. ISBN 968-7674-64-4.
- 10
- Bravo, H.H. 1978. Las Cactáceas de México. Segunda Edición. p. 735. UNAM. México.
- 15
- Cantwell, M. 1991. Quality postharvest physiology of nopalitos and tunas. Proceedings of the Second Annual Texas Prickly Pears Council Meetings. Texas A&M University, Kingsville, Texas.
- 20
- Caplan, A., Herrera-Estrella, L., e Inze, D. J. 1983. Introduction of genetic material into plant cells. Science 222: 815-821.
- Castellanos , C.P.; López, Ch.I.E.; De Luna, E.J.M. y Flores, V.C.A. 1999. Costos de producción y comercialización de tuna (*Opuntia spp.*) en la región de San Martín de la Pirámides. En: Memoria VIII Congreso Nacional y VI
- 25
- Internacional sobre el Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal, pp. 54-55. Aguirre Rivera, J.R. y Reyes Agüero, J.A. (Eds.). 6-10 de Septiembre de 1999, Instituto de Investigación de Zonas Desérticas, Universidad

Autónoma de San Luis Potosí. Editorial Universitaria Potosina, San Luis Potosí, S.L.P. ISBN 968-7674-64-4.

0024

5 Chilton, M.D., Drummond, M.H. y Merlo, D.J. 1977. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: The molecular basis of crown gall tumorigenesis. Cell 11: 262-271.

Dale, J.P., Marks, S.M., Brown, M.M., Woolston, J.C., Gunn, V.H., Mullineaux, M.P., Lewis, M.D., Kemp, M.J., Chen, D.F., Gilmour, M.D. y Flavell, B.R. 1989. Agroinfection of wheat: Inoculation of *in vitro* grown seedlings and embryos. Plant Science 63: 237-245.

10 Deblaere, R., Bytebier, B., de Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., Van Montagu, M. y Leemans, J. 1985. Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. Nucleic Acids Research 13: 4777-4788.

15 De León, R.J.M.; De Luna, E.J.M. y Flores, V.C.A. 1999. Costos de producción y comercialización de tuna (*Opuntia* spp.) en el altiplano potosino-zacatecano. En: Memoria VIII Congreso Nacional y VI Internacional sobre el Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal, pp. 56-57. Aguirre Rivera, J.R. y Reyes Agüero, J.A. (Eds.). 6-10 de Septiembre de 1999, Instituto de Investigación de Zonas Desérticas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Editorial Universitaria Potosina, San Luis Potosí, S.L.P. ISBN 968-7674-64-4.

20 Depicker, A., Van Montagu, M. y Schell, J. 1983. Plant cell transformation by *Agrobacterium* plasmids In: Genetic Engineering of Plants: An Agricultural Perspective. pp. 143-176. Kosuge, T., Meredith, C. and Hollaender, A. (Eds). Plenum Press, New York.

25 Escobar, A., Villalobos, V.M. y Villegas, M. 1986. *Opuntia* micropropagation by axillary proliferation. Plant Cell and Organ Culture 7: 269-277.

0025

Feinberg, A.P. y Vogelstein, B. 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry* 132: 6-13.

5  
Fernández, M.R.; Luna, J.; Gutiérrez, F.; Sáenz, L.A.; Méndez, S.J.; Mondragón, C. y Zegbe, J. 1999a. Evaluación de germoplasma de nopal tunero en el centro de México. En: Memoria del VIII Congreso Nacional y VI Internacional sobre el Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal, pp. 2-3. Aguirre Rivera, J.R. y Reyes Agüero, J.A. (Eds.). 6-10 de Septiembre de 1999, Instituto de Investigación de Zonas Desérticas, Universidad  
10 Autónoma de San Luis Potosí. Editorial Universitaria Potosina, San Luis Potosí, S.L.P. ISBN 968-7674-64-4.

Fernández, M.R.; Luna, J.; Gutiérrez, F.; Sáenz, L.A.; Méndez, S. J.; Mondragón, C. y Zegbe, J. 1999b. Estudio de cultivares de nopal tunero por componentes principales. En: Memoria VIII Congreso Nacional y VI  
15 Internacional sobre el Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal, pp. 4-5. Aguirre Rivera, J.R. y Reyes Agüero, J.A. (Eds.). 6-10 de Septiembre de 1999, Instituto de Investigación de Zonas Desérticas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Editorial Universitaria Potosina, San Luis Potosí, S.L.P. ISBN 968-7674-64-4.

20 Flores Valdez, C.A. 1995. Nopalitos, processing and marketing. In: *Agroecology, Cultivation and Uses of Cactus Pear*, pp. 92-119. Barbera, G., Inglese, P., Pimienta-Barrios, E., and Arias Jiménez, E.J. (Eds.) International Technical Cooperation Network on Cactus Pear, FAO.

25 Gallardo, Y.; Zambrano, M. L. y Hernández, A. D. 1997. Determinación de las propiedades fisicoquímicas del nopal verdura. En: *Memorias VII Congreso Nacional y V Internacional sobre conocimiento y aprovechamiento del nopal*. Monterrey, México. pp.277-278.

0026

Grimsley, H.N., Ramos, C., Hein, T. y Hohn, B. 1988. Meristematic tissues of maize plants are most susceptible to agroinfection with maize streak virus. *Biotechnology* 6: 185-189.

5 Gutiérrez, A.F. 1999. Evaluación y comparación de 24 variantes de tuna blanca (*Opuntia* spp.) en Aguascalientes. En: Memoria VIII Congreso Nacional y VI Internacional sobre el Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal, pp. 6-7. Aguirre Rivera, J.R. y Reyes Agüero, J.A. (Eds.). 6-10 de Septiembre de 1999, Instituto de Investigación de Zonas Desérticas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Editorial Universitaria Potosina, San Luis Potosí, S.L.P. ISBN 968-7674-64-4.

10 Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffmann, N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G. y Fraley, R.T. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227: 1229-1231.

Hussey, G., Johnson D.R. y Warren, S. 1989. Transformation of meristematic cells in the shoot apex of cultured pea shoots by *Agrobacterium tumefaciens* and *A. Rhizogenes*. *Protoplasma* 148: 101-105.

15 Ishida, Y., Saito H., Ohta S., Hiei Y., Komari T. y Kumashiro T. 1996. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnology* 14: 745-750.

20 Jefferson, R.A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter* 5: 387-405.

Kaneyoshi, J., Kobayashi S., Nakamura Y., Shigemoto Y. y Doi Y. 1994. A simple and efficient gene transfer system of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* Raf). *Plant Cell Reports* 13: 541-545.

25 Lambé, P., Dinant, M. y Matagne, R.F. 1995. Differential long-term expression and methylation of the hygromycin phosphotransferase (hph) and  $\beta$ -

glucuronidase (GUS) genes in transgenic pearl millet (*Pennisetum glaucum*)  
callus. Plant Science 108: 51-62.

0027

Li, X.Q., Liu C.N., Ritchie S.W, Peng J.Y., Gelvin, S.B. y Hodges, T.K. 1992.  
Factors influencing *Agrobacterium* mediated transient expression of *gusA* in  
5 rice. Plant Molecular Biology 20: 1037-1048.

McElroy, D. 1996. The industrialization of plant transformation. Nature  
Biotechnology 14: 715-716.

Miguel, M.C. y Oliveira, M.M. 1999. Transgenic almond (*Prunus dulcis* Mill.) plants  
10 obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation of leaf explants. Plant  
Cell Reports 18: 387-393.

Morel, G. 1972. Morphogenesis of stem apical meristem cultivated *in vitro*:  
Application to clonal propagation. Phytomorphology 22: 265-277.

Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay  
15 with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. Annual Review of  
Plant Physiology 25: 135-166.

Pimienta Barrios, E. 1993. Vegetable cactus (*Opuntia*). En: Pulses and  
Vegetables, pp. 177-191. William, J.T. (Ed). Chapman and Hall. London.

20 Pimienta-Barrios, E. 1994. Prickly pear (*Opuntia spp.*): A valuable fruit crop for the  
semi-arid lands of Mexico. Journal of Arid Environments 28:1-11.

Pimienta-Barrios, E., Barbera G. e Inglese P. 1993. Cactus pear (*Opuntia spp.*,  
Cactaceae). International network: An effort for productivity and  
environmental conservation for arid and semiarid lands. Cactus and  
25 Succulent Journal (U.S.) 65: 225-229.

Sáenz, C. 1998. Nopal and cactus pear processing alternatives. Proceeding  
International Symposium "Cactus pear and nopalitos processing and uses".  
Santiago, Chile pp.33-40.

0028

Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY.

Scheinvar, L. 1999. Biosistemática de los xoconostles mexicanos y su potencial económico. En: *Memoria VIII Congreso Nacional y VI Internacional sobre el Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal*, pp. 255-274. Aguirre Rivera, J.R. y Reyes Agüero, J.A. (Eds.). 6-10 de Septiembre de 1999, Instituto de Investigación de Zonas Desérticas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Editorial Universitaria Potosina, San Luis Potosí, S.L.P. ISBN 968-7674-64-4.

Seabra, C.R. y Pais, S.M. 1998. Genetic transformation of European chestnut. *Plant Cell Reports* 17: 177-182.

Shure, M., Wessler, S. y Federoff, N. 1983. Molecular identification and isolation of the *waxy* locus in maize. *Cell* 35: 225-233.

Silos Espino, H.; Rodríguez Salazar, E.; Rascón Cruz, Q.; Osuna Castro, J. y Paredes López, O. 1999. Proteínas de reserva de importancia alimentaria del nopal. En: *Memoria VIII Congreso Nacional y VI Internacional sobre el Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal*, pp. 36-37. Aguirre Rivera, J.R. y Reyes Agüero, J.A. (Eds.). 6-10 de Septiembre de 1999, Instituto de Investigación de Zonas Desérticas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Editorial Universitaria Potosina, San Luis Potosí, S.L.P. ISBN 968-7674-64-4.

Ulian, C.E., Smith, H.R., Gould, H.J. y McKnight, D. 1988. Transformation of plants via the shoot apex. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 24(9): 951-954.

Vázquez Alvarado, R.E.; Salinas García, G.; Gallegos Vázquez, C. y Valdéz Cepeda, R. 1999. Recolección y conservación *ex situ* de la diversidad genética del nopal en el noreste de México. En: *Memoria VIII Congreso*

Nacional y VI Internacional sobre el Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal, pp. 19-20. Aguirre Rivera, J.R. y Reyes Agüero, J.A. (Eds.). 6-10 de Septiembre de 1999, Instituto de Investigación de Zonas Desérticas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Editorial Universitaria Potosina, San Luis Potosí, S.L.P. ISBN 968-7674-64-4.

0029

5

Weising, K., Schell, J. y Kahl, G. 1988. Foreign genes in plants: Transfer, structure, expression and applications. Annual Review of Genetics 22: 421-477.

10

Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, L.A. y Tingey S.V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18: 497-504.

## LEYENDAS DE LAS FIGURAS

5 **Figura 1.** Protocolo de transformación genética y regeneración de plantas transgénicas de nopal (*Opuntia sp.*) mediadas por el sistema de *Agrobacterium tumefaciens*. A) Infección de meristemos apicales (areolas) usando una aguja de jeringa con 10  $\mu$ l de suspensión de células de *Agrobacterium tumefaciens*. B) Brotes resistentes a kanamicina después de dos meses de incubación bajo selección. C) Expresión de  $\beta$ -glucuronidasa en explantes resistentes a kanamicina. D) Explantes tipo silvestre que muestran ausencia de expresión de  $\beta$ -glucuronidasa. E) Propagación de brotes en medio que contiene kanamicina. F) Plantas transgénicas de nopal establecidas en suelo en condiciones de invernadero.

10 **Figura 2.** Análisis por PCR de siete plantas resistentes a kanamicina (carriles 1-7) y tejido tipo silvestre (no infectado; carril 8).

15 **Figura 3.** Análisis de transferencia e hibridación tipo Southern usando un fragmento del gen *npt II* como sonda.

20 **Figura 4.** Análisis de transferencia e hibridación tipo Southern usando un fragmento del gen GUS como sonda.

0030

## REIVINDICACIONES

1. Un método para transformar una planta de nopal (*Opuntia sp.*) utilizando *Agrobacterium* que comprende los pasos de:

a) poner en contacto explantes del nopal con *Agrobacterium*;

b) cultivar en medio NOP1 conteniendo carbenicilina a concentraciones capaces de inhibir el crecimiento de *Agrobacterium*, y kanamicina como agente para seleccionar los explantes que expresan el gen de selección; y

c) regenerar las plantas que expresan al transgen.

2. El método de la reivindicación 1 en donde el cultivo de los explantes *in vitro* se lleva a cabo en medio modificado conteniendo medio basal de Murashige-Skoog (MS) suplementado con bencilaminopurina, giberelina A<sub>3</sub> y 20% adicional de nitrógeno en el medio MS.

3. El método de la reivindicación 1 en donde las plantas transformadas se regeneran en medio NOP1 suplementado con kanamicina.

4. El método de la reivindicación 1 en donde la cepa de *Agrobacterium* se introduce al explante mediante jeringa hipodérmica.

5. El método de la reivindicación 1 en donde los explantes se seleccionan de areolas o tejidos meristemáticos de los tallos o cladodios del nopal.

6. El método de la reivindicación 1 en donde la planta de nopal es *Opuntia sp.*

7. El método de la reivindicación 6 en donde la planta de nopal es *Opuntia ficus-indica*.

0031

---

8. El método de la reivindicación 1 en donde la especie de *Agrobacterium* es *Agrobacterium tumefaciens*.

0032

5 9. El método de la reivindicación 1 en donde las plantas de nopal se transforman genéticamente de manera estable.

10. El método de la reivindicación 1 en donde el transgen se expresa en generaciones subsecuentes.