



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TESIS:

**“DESARROLLO DE UN SISTEMA DE PROPAGACIÓN *IN VITRO* Y
TRANSFORMACIÓN GENÉTICA EN PLANTAS DE MORINGA
(*Moringa oleifera Lam*)”**

PRESENTA:

L.A.Q.B. JAZMÍN MARISELA MUÑOZ ALEMÁN.

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS

ÁREA: BIOTECNOLOGÍA VEGETAL.

COMITÉ TUTORIAL:

DR. JOSE FRANCISCO MORALES DOMINGUEZ

DR. EUGENIO PÉREZ MOLPHE BALCH.

DR. VICENTE DÍAZ NUÑEZ.

AGUASCALIENTES, AGS. MARZO DE 2015.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

L.A.Q.B. JAZMÍN MARISELA MUÑOZ ALEMÁN
ALUMNO (A) DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN EL
ÁREA DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL.
PRESENTE.

Estimado (a) alumno (a) Muñoz:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **“DESARROLLO DE UN SISTEMA DE PROPAGACIÓN *in vitro* Y TRANSFORMACIÓN GENÉTICA EN PLANTAS DE MORINGA (*Moringa aleifera* Lam.)”**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE
Aguascalientes, Ags., 26 de febrero de 2015
“SE LUMEN PROFERRE”
EL DECANO

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS

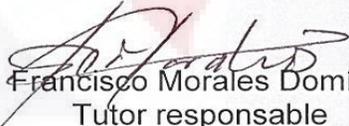
c.c.p.- Archivo
JJRG,mjda

M en C. José de Jesús Ruiz Gallegos
Decano del Centro de Ciencias Básicas
Presente:

Por medio de este conducto, le comunico que la alumna **Jazmín Marisela Muñoz Alemán, con ID: 68912**, egresada de la Maestría en Ciencias en el área de Biotecnología Vegetal, ha concluido satisfactoriamente su trabajo de tesis titulado **DESARROLLO DE UN SISTEMA DE PROPAGACIÓN IN VITRO Y TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE PLANTAS DE MORINGA (*Moringa oleifera* Lam)**, y en base al artículo 175, apartado II del reglamento general de docencia, me permito emitir el voto **APROBATORIO** para que pueda seguir con el proceso administrativo para la impresión de su tesis y que posteriormente defenderá en el examen de titulación correspondiente.

Sin más por el momento agradeciendo su atención a la presente me despido enviándole un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"SE LUMEN PROFERRE"


Dr. Francisco Morales Domínguez
Tutor responsable

Aguascalientes, Ags. A 24 de febrero de 2015

c.c.p Interesado
c.c.p Secretaria de investigación y Posgrado
c.c.p. Jefe del Departamento de Química
c.c.p. Consejero Académico
c.c.p. Minuta Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

MC. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio de la presente, como miembro del Comité Tutorial designado de la estudiante **JAZMÍN MARISELA MUÑOZ ALEMÁN**, con ID 68912, quien realizó la tesis titulada: **DESARROLLO DE UN SISTEMA DE PROPAGACIÓN *IN VITRO* Y TRANSFORMACIÓN GENÉTICA EN PLANTAS DE MORINGA (*Moringa oleifera* Lam)**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a 24 de febrero de 2015.

Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch
Miembro del Comité Tutorial

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Química
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico



"2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón".

Gerencia Estatal en Aguascalientes
Oficio número CNF/GEA/84 /2015
Aguascalientes, Ags., a 24 de Febrero de 2015.

M.C. José de Jesús Ruiz Gallegos
Decano del Centro de Ciencias Básicas
Universidad Autónoma de Aguascalientes
Presente.

Quien suscribe la presente Dr. Vicente Díaz Núñez, Gerente Estatal de la Comisión Nacional Forestal (CONAFOR) en Aguascalientes, Miembro del Sistema Nacional de Investigadores (SNI) y asesor externo de **Jazmín Marisela Muñoz Alemán**, estudiante de Maestría en Ciencias en Biotecnología Vegetal correspondiente al Centro de Ciencias Básicas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, cuyo ID es 68912, manifiesto que he leído, revisado con atención y realizado observaciones pertinentes de forma crítica y propositiva al manuscrito de tesis intitulada **"Desarrollo de un sistema de propagación *in vitro* y transformación genética en plantas de Moringa (*Moringa oleífera* Lam.)"**.

Por lo anterior y una vez revisado el escrito final me complazco en otorgar mi anuencia para que este documento sea considerado para su disertación en el momento requerido, considerando que cuenta con la calidad necesaria para ello.

Agradeciendo su atención a la presente, le envío mis más cordiales saludos

Atentamente

Dr. Vicente Díaz Núñez
Gerente Estatal
CONAFOR Aguascalientes
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores (SNI-CONACyT)

Av. Las Américas #1608, 1º y 2º. Piso, Fracc. Valle Dorado. Aguascalientes, Ags., C.P. 20235
Teléfonos: (449) 971-95-21, 913-19-81 y 978-93-23. Correo electrónico: vicente.diaz@conafor.gob.mx

Página 1 de 1

AGRADECIMIENTOS.

A mis tutores Dr. Francisco Morales, Dr. Eugenio Pérez Molphe y el Dr. Vicente Díaz Nuñez por guiarme en esta búsqueda de conocimiento y fortalecer las bases de este proyecto, además de su constante apoyo y consejos en la realización de esta investigación.

A la gran colaboración con el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica con el Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís por la asesoría en gran parte del desarrollo experimental de la investigación de este proyecto y las atenciones prestadas, además de equipos e insumos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante estos 2 años con número de registro: 475087.

Principalmente a mis Padres; Jaime y Esperanza, ellos forjaron mi educación y me enseñaron a salir adelante a pesar de grandes adversidades y obstáculos, y que no hay límites más que nosotros mismos.

Al gran compañero de mi vida; mi esposo Alejandro, 11 años de tener una gran convivencia y mostrarme el lado dulce de la vida, su gran apoyo incondicional a todo lo que me propongo, además de ser muy objetivo con sus críticas a este proyecto y las aportaciones y sugerencias desde otro punto vista.

A mis compañeros de trabajo durante mi estancia en el laboratorio; Aldo, Viky, Ana Rosa, Juan Pablo y la maestra Cristina Garcidueñas que me ayudaron y asesoraron en muchas de las técnicas realizadas.



DEDICATORIAS.

Principalmente a mis Padres Jaime y Esperanza, quienes han forjado gran parte de mi camino y han estado conmigo en las buenas y en las malas; simplemente muchas gracias. Los amo.

A mi Arquitecto y Maestro preferido; mi esposo Alejandro, porque hemos aprendido mucho uno del otro, por su gran paciencia, comprensión y apoyarme en todo lo que me propongo.

A mis amigos de la carrera Ana Rosa, Juan Pablo, Cristina, Leticia que nuevamente compartimos otros 2 años durante nuestra estancia en la Maestría y los que fueron parte de este proyecto Axel, Ileri, Mónica, Yessica. Seguiremos compartiendo grandes vivencias y espero cruzarnos nuevamente.

ÍNDICE GENERAL.

I.	INTRODUCCIÓN.....	8
I.1	Propiedades Nutracéuticas de <i>M. oleifera</i>	10
I.2	Fitoquímicos de <i>Moringa sp.</i>	12
I.3	Propiedades Farmacológicas de las partes de la planta <i>M. oleifera</i>	14
I.3.1	La biodisponibilidad de la vitamina A / carotenos.....	14
I.3.2	Actividad antioxidante.....	15
I.3.3	Actividad contra el cáncer	16
I.3.4	Actividad Anti-hiperlipidemia y anti-hipercolesterolemia.	17
I.4	Principales usos y aplicaciones de <i>Moringa sp.</i>	18
I.5	Elección de un sistema de micropropagación.....	19
I.6	Transformación genética.	20
II.	OBJETIVOS.....	23
II.1	Generales:.....	23
II.2	Particulares:.....	23
III.	JUSTIFICACION.....	24
IV.	MATERIALES Y METODOS.....	25
IV.1	Material vegetal y establecimiento de cultivos.	25
IV.2	Micropropagación de ápices.....	25
IV.3	Inducción de brotes adventicios. Aislamiento del nudo cotiledonario.....	26
IV.5	Sistema de regeneración.....	26
IV.6	Transformación genética de explantes de Moringa.....	28
IV.6.1	Inducción de raíces transformadas <i>in vitro</i>	28
6.1.2.	Cultivo bacteriano.....	28
6.1.2.	Cocultivo.	28
6.1.3.	Transferencia al medio de selección.	29
IV.6.2	Análisis histoquímico para β -glucoronidasa (GUS)	29
IV.6.3.	Transformación mediada por <i>A. Tumefaciens</i>	30
IV.6.4.	Transformacion por bombardeo con Microproyectiles.	32
IV.6.5.	Análisis de transformantes.....	35
V.	RESULTADOS.....	38
V.1	Establecimiento de cultivos.	38
V.2	Micropropagación de ápices.....	39

V.3	Micropropagación de explantes nodales.....	40
V.4	Inducción de brotes adventicios. Aislamiento del nodo cotiledonario.....	41
V.5	Sistema de regeneración por organogénesis.....	41
V.6	Análisis de los datos.....	43
V.7	Regeneración in vitro de Moringa oleífera.....	46
V.8.	Inducción de raíces transformadas <i>in vitro</i>	47
V.8.1.	Expresión del gen reportero <i>gus</i>	47
V.8.2.	Verificación de la presencia de transgenes en raíces transformadas de moringa con <i>A. rhizogenes</i>	50
V.9.	Transformación mediada por <i>a. tumefaciens</i>	51
V.9.1.	Expresión del gen reportero <i>gus</i>	51
V.9.2.	Verificación de la presencia de transgenes en brotes transformados de moringa con <i>A. tumefaciens</i>	53
V.10.	Transformación por bombardeo con microproyectiles.....	54
V.10.1.	Curva de Tolerancia al Herbicida.....	54
V.10.2.	Desarrollo de brotes de explantes bombardeados.....	56
V.10.3.	Expresión del gen reportero <i>gus</i>	57
V.10.4.	Verificación de la presencia de transgenes en explantes bombardeados de moringa.....	58
VI.	DISCUSIONES.....	60
VII.	CONCLUSIONES.....	67
VIII.	GLOSARIO.....	68
IX.	BIBLIOGRAFIA.....	70
X.	ANEXOS.....	74

INDICE DE TABLAS.

Tabla 1.....**27**
 Cuadro de tratamientos.

Cuadro 1.....**43**
 Análisis de varianzas de la inducción de tejido calloso en explantes de segmentos de hipocotilo de moringa (*Moringa oleifera*) cultivados *in vitro*.

Cuadro 2.....**44**
 Valores promedio del porcentaje de crecimiento de tejido calloso en explantes de moringa (*Moringa oleifera*) cultivadas *in vitro*.

Cuadro 3.....**47**
 Resultados de la inducción de raíces transformadas *in vitro* en explantes de hipocotilo de moringa.

Cuadro 4.....**51**
 Porcentaje de brotes transformados de explantes de hipocotilo de moringa.

Tabla 2.....**54**
 Ensayo de susceptibilidad al Herbicida Finale ® en explantes de hipocotilo de moringa.

Cuadro 5.....**56**
 Porcentajes de explantes bombardeados de moringa con formación de brotes.

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1.....9
 Identificación de *Moringa oleífera*.

Figura 2.....13
 Estructuras fitoquímicas importantes en las especies de Moringa.

Figura 3.....22
 Plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*.

Figura 4.....32
 Representación esquemática del vector pAHC25.

Figura 5.....38
 Establecimientos de cultivos de moringa.

Figura 6.....39
 Micropropagación de ápices.

Figura 7.....40
 Micropropagación de explantes nodales.

Figura 8.....41
 Inducción de brotes adventicios.

Figura 9.....43
 Efecto de la combinación de Ácido α -Naftalenacético (ANA) y Benciladenina (BA) en explantes de secciones de hipocótilo de las plántulas de *Moringa oleífera*.

Figura 10.....45
 Boxplot. Comparación de valores medios en los tratamientos usados para la inducción de tejido caloso en explantes de moringa.

Figura 11.....46
 Regeneración de brotes *in vitro* de moringa.

Figura 12.....48
 Explantes de hipocotilo de moringa con raíces inducidas *in vitro*.

Figura 13.....49
 Expresión transitoria del gen reportero GUS en raíces transformadas con *A. rizogenes* de explantes de hipocotilo de moringa.

Figura 14.....50
 Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de las amplificaciones de PCR de los transgenes *rolB*, *nptII*, *gus* y *virD* a partir de ADN de Raíces Transformadas.

Figura 15.....51
 Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de las re-amplificaciones de PCR de los transgenes *rolB*, *nptII*, *gus*

Figura 16.....52
 Expresión del gen reportero GUS en brotes transformados con *A. tumefaciens* de explantes de hipocotilo de moringa.

Figura 17.....53
 Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de las amplificaciones de PCR de los transgenes *nptII* y *gus* a partir de ADN aislado de Brotes Transformados.

Figura 18.....58
 Ensayo de susceptibilidad al Herbicida Finale en explantes de hipocotilo de moringa en medio MS.

Figura 19.....58
 Análisis histoquímico de *gus* de brotes formados de tallos y callos de moringa bombardeados con microproyectiles.

Figura 20.....60
 Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de las amplificaciones de PCR del transgen *gus* a partir de ADN aislado de explantes bombardeados.

RESUMEN.

Se logró la propagación *in vitro* de *Moringa oleifera* a partir de ápices tomados de plántulas de 3-4 cm de longitud. Éstos se colocaron en medio basal MS, donde se generaron brotes cuyos segmentos nodales fueron repetidamente subcultivados en medio MS suplementado con 4.44 μ M de Benziladenina (BA). Los resultados obtenidos mostraron que cerca del 90% de los explantes apicales cultivados sin la adición de reguladores del crecimiento respondieron satisfactoriamente formando de 4-5 secciones internodales y generando raíces. Por su parte, el 80% de los explantes nodales cultivados en presencia de BA formaron brotes múltiples. Por lo anterior, es posible el establecimiento de cultivos *in vitro* de plantas de moringa, donde cada explante tiene una alta capacidad de formar nuevos brotes, sin la necesidad de añadir reguladores de crecimiento exógenos. Por otro lado, se probó el efecto de tratamientos con citocininas (BA) y auxinas (ANA) en segmentos de hipocotilo. En varias de las combinaciones analizadas se observó la producción de tejido calloso y de brotes adventicios. Con esto último se probó la posibilidad de regenerar esta especie a través de la organogénesis. Finalmente, se evaluaron tres métodos de transformación genética en explantes de moringa: a) *A. rhizogenes*; b) *A. tumefaciens*, y; c) bombardeo. Primeramente nos basamos en protocolos ya establecidos para otras especies de plantas; sin embargo las condiciones para cada sistema de transformación se fueron modificando, conforme se avanzó en la metodología. El objetivo de este trabajo consistió en la evaluación de los sistemas de transformación para probar si *Moringa oleifera* era factible de transformar. Para la transformación mediada por *A. rhizogenes* en explantes de hipocotilo de moringa se utilizó la cepa A4, con el vector binario pESC4; se obtuvieron 81 raíces presuntamente transformadas, con un promedio de 2-4 raíces por explante. La transformación fue confirmada mediante el ensayo histoquímico de β -glucuronidasa; donde el 48% de las raíces presentaron actividad del gen *gus*. Para la transformación mediada por *A. tumefaciens* en explantes de hipocotilo de moringa se utilizó la cepa LBA 4404 portando el plásmido binario pBI121, se obtuvieron 16 brotes presuntamente transformados, donde el 31% mostraron actividad del gen *gus*. La transformación por bombardeo se realizó en tallo, callos y brotes de callos de moringa. Se utilizó el plásmido pAHC25 que contiene un gen reportero (*gus*) y un gen de selección (BAR) que le confiere resistencia al herbicida BASTA, por lo cual se realizó previamente un ensayo de susceptibilidad a este herbicida. Con este método de transformación no se observaron resultados positivos.

ABSTRACT.

The *in vitro* propagation of *Moringa oleifera* from apices taken from seedlings 3-4 cm in length was achieved. These were placed on MS basal medium, where shoots were generated. Nodal segments of these shoots were repeatedly subcultured on MS medium supplemented with 4.44 μ M benzyladenine (BA). The results showed that about 90% of the apical explants cultured without addition of growth regulators responded satisfactorily forming 4-5 internodal sections and generating roots. For its part, 80% of the nodal explants cultured in the presence of BA formed multiple shoots. Therefore, it is possible to establish *in vitro* cultures of moringa plant, where each explant has a high ability to form new shoots, without the need to add exogenous growth regulators. Furthermore, the effect of treatments with cytokinin (BA) and auxin (NAA) in hypocotyl segments was proven. In several combinations tested, production of callus and adventitious shoots were observed. With this the possibility of regenerating the species through organogenesis was proven. Finally, three methods for genetic transformation of moringa explants were evaluated: a) *A. rhizogenes*; b) *A. tumefaciens*, and; c) bombardment. First we rely on protocols established for other plant species; however the conditions for each transformation system were modified, as advanced in the methodology. The objective of this work consists in the evaluation of the transformation systems to test whether *Moringa oleifera* was feasible to transform. For *A. rhizogenes* mediated transformation of moringa hypocotyl explants, A4 strain with the binary vector pESC4 was used; 81 presumably transformed roots were obtained, averaging 2-4 roots per explant. The transformation was confirmed by histochemical assay of β -glucuronidase; where 48% of the roots showed *gus* gene activity. For transformation mediated by *A. tumefaciens* in moringa hypocotyl explants, strain LBA 4404 bearing the binary plasmid pBI121 was used, and 16 presumably transformed shoots were obtained, where 31% exhibited GUS activity. Transformation by bombardment was performed on moringa stem, calluses and shoots. The pAHC25 plasmid containing a reporter gene (GUS) and a selection gene (BAR) that confers resistance to the herbicide BASTA, was used. Where by a susceptibility assay to this herbicide previously performed. With this transformation method no positive results were observed.

I. INTRODUCCIÓN.

Moringa oleifera Lam. es la especie más ampliamente cultivada de la familia Moringaceae, que es nativa de las zonas de sub-Himalaya de la India, Pakistán, Bangladesh y Afganistán. Es un árbol de rápido crecimiento (también conocido como el árbol de rábano, árbol de baquetas, kelor, marango, Moonga, mulangay, nébéday, saijhan, sajna o aceite de árbol de Ben), que por sus características biológicas y su fácil adaptabilidad a diferentes climas ha sido introducido en muchos lugares de los trópicos.

Es un árbol de madera blanda de baja calidad, pero que durante siglos se ha aprovechado para usos medicinales, industriales y tradicionales. Se considera un cultivo importante en la India, Etiopía, Filipinas y Sudán, también ha sido introducido en las islas del Pacífico Occidental, África Oriental y del Sur, Asia tropical, América Latina, el Caribe y Florida. Todas las partes del árbol de moringa son comestibles y hace tiempo que ha sido consumido por los seres humanos (Olson y Fahey, 2011).

Mark E. Olson (2001) clasificó a esta planta según su taxonomía y sistemática, donde afirmó que el taxón más probable es *Cylicomorpha* (*Caricaceae*). Taxonómicamente, define a *M. oleifera* por sus características morfológicas como:

“Una planta con hojas pinnadas grandes, en donde cada hoja está dividida en muchos folíolos dispuestos sobre un armazón llamado raquis (Fig. 1A). Los frutos forman una cápsula larga y leñosa que cuando alcanza la madurez se abre lentamente en 3 valvas que se separan la una de la otra por su longitud, quedando pegadas sólo en la base del fruto (Figs.1B, C). En la mayoría de las especies, las semillas presentan 3 alas longitudinales. La combinación de hojas pinnadas, frutos trivalvados y semillas con 3 alas hace que sea muy fácil reconocer una moringa”.

Para asegurar la identificación, se pueden buscar las glándulas foliares características de esta familia, las cuales se encuentran en ambos lados flanqueando la base o en el ápice del pecíolo y en la mayoría de las articulaciones del raquis (Fig. 1). Características aún menos aparentes incluyen los ductos de goma en la médula de los tallos y elementos de vaso con placas de perforación sin bordes (Olson y Carlquist, 2001).

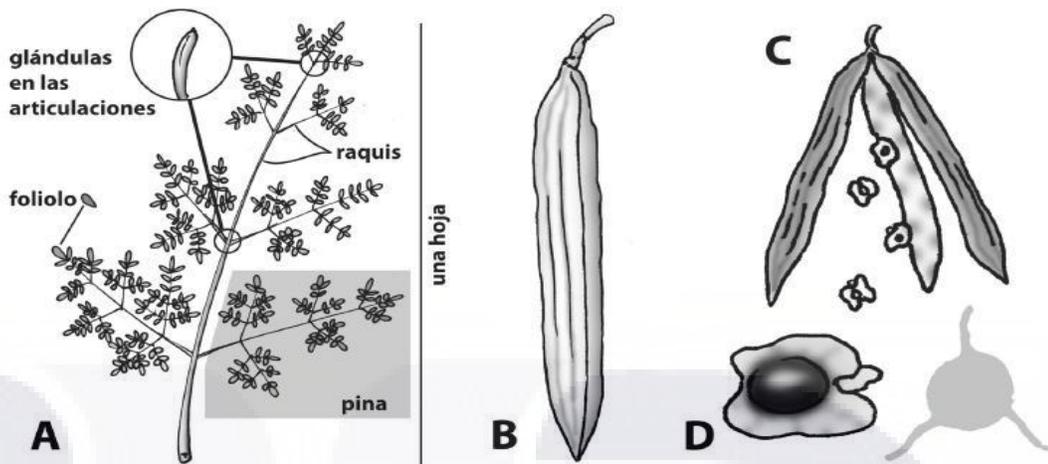


Figura 1. Identificación de *Moringa oleifera*. A) hojas grandes, pinnadas, que pueden alcanzar unos 60 cm de longitud; están divididas en foliolo dispuestos sobre un raquis. En la articulación de cada raquis se encuentran pequeñas glándulas d 1mm de longitud. B-D) frutos y semillas. B) Fruto, una capsula ligera, leñosa y seca, que en la madurez mide de 10 a 30 o hasta 50 cm; C) el fruto se abre en 3 partes o valvas. D) semillas de 1.5-3 cm de diámetro con un centro de color café oscuro y 3 alas de color beige; la silueta muestra la configuración de las 3 alas. La moringa es la única planta en México con hojas pinnadas con glándulas en las articulaciones, frutos con 3 valvas y semillas con 3 alas (Olson y Carlquist, 2001).

Lim (2012) describió a la moringa como un árbol caducifolio (de hoja caduca), muy ramificado a los 10 m., con fruncido, corteza gris que se desprende en escamas de corcho, madera suave y blanca, raíz tuberosa penetrante y una corona delgada. Las hojas son alternas, 2-3 pinnadas de hasta 60 cm de largo, con 4-6 pares de pinnas algo agrupadas hacia el final de la ramita. Pecíolo 4-15 cm de largo, 1-6 mm peciólulos; valvas elípticas u ovoides, 0.5-3 m por 0.3 a 2 cm, delgadas, glabros o puberulentas, de color verde grisáceo. Las inflorescencias son paniculada, axilares, con numerosos blanco cremoso, fragante, flores zigomorfas. El fruto es alargado, pendular, lineal, en forma de daga, 3-anguloso, 9-nervada, dividiéndose en tres válvas. Semillas numerosas, subglobosos, 1-1.4 cm de diámetro, con tres alas delgadas y embebidos en la placenta carnosa blanquecina.

Se le han atribuido muchos usos a *M. oleifera* (Fuglie, 1999). Algunos de ellos consisten en el cultivo en franjas (producción de biomasa), como forraje para animales (hojas y semillas tratadas), producción de biogás (de las hojas), productos de limpieza doméstica (hojas trituradas), colorante azul (madera), esgrima (árboles vivos), fertilizantes (semilla), nutriente foliar (jugo exprimido de las hojas), abono verde (de hojas), goma (de troncos de árboles), la miel y el jugo de la caña de azúcar - clarificador (semillas en

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

polvo), miel (néctar de las flores), uso medicinal (todas las partes de la planta), plantas ornamentales, regulador de la estructura del suelo (incorporación al suelo de las hojas para evitar el ahogamiento de las plántulas ocasionado por falta de aireación e inmovilización de algunos nutrientes) , pulpa (madera), cuerda (corteza), tanino para curtir cuero (corteza y las encías) , purificación del agua (semillas en polvo) y como aceite (extraído de semilla de moringa con un rendimiento del 30-40 % en peso), también conocido como aceite de Ben.

I.1 Propiedades Nutracéuticas de *M. oleifera*.

Los arboles de este género y especie, en los últimos tiempos se han considerado como una fuente sobresaliente de proteína altamente digestible, proveedora de calcio (Ca), Hierro (Fe), vitamina C y carotenoides adecuados para su uso en muchas de las llamadas regiones "en desarrollo" del mundo donde la desnutrición es una de las principales preocupaciones.

En algunas regiones (África) se han usado los árboles de *M. oleifera* para combatir la malnutrición, especialmente entre los niños y las madres lactantes. Las hojas se pueden comer frescas, cocidas o almacenadas en forma de polvo seco durante varios meses sin refrigeración, donde al parecer no disminuye su valor nutricional. Esta especie puede ser una fuente importante de alimento en los trópicos debido a que el árbol está lleno de hojas al final de la temporada seca, cuando otros alimentos suelen ser escasos.

Actualmente la comunidad científica contempla varias líneas de investigación sobre las propiedades nutricionales de la moringa. Por ejemplo a Tee et al. (1997) informaron de la composición de nutrientes de vainas frescas de moringa por cada 100 g de porción comestible como: energía 40 kcal, 84.6 g. de agua, proteínas 5.1 g., grasas 0.3 g., hidratos de carbono 4.1 g., fibra 6.1 g, 0.8 g. de cenizas, calcio 22 mg, fósforo 31 mg, 0.3 mg de Hierro, 3 mg de Sodio, 208 mg de Potasio, 75 mg de carotenos, vitamina A 13 mg, vitamina B1 0.05 mg, vitamina B2 0.12 mg, niacina 0.2 mg y vitamina C 258 mg.

Por otra parte, el Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP), a través del Proyecto “Rendimiento y uso potencial de *Moringa oleifera* en la producción de alimentos de alto valor nutritivo para su utilización en comunidades de alta vulnerabilidad alimentario-nutricional de Guatemala”, estudio el comportamiento agronómico de la planta en diversas condiciones edafoclimáticas, su contenido nutricional y la evaluación biológica de sus nutrientes, sugiriendo su aplicación como suplemento en harina y diversas preparaciones tradicionales de Guatemala (Alfaro y Martínez, 2007). Algunos de los resultados obtenidos muestran que, de un análisis proximal (valores por 100 gr) de las diversas partes de la planta de moringa (hojas, vainas y semillas), se extraen altos aportes nutrimentales, entre ellos; proteínas (20.5%), grasas (27.2%), energía de carbohidratos (207 kcal), minerales y vitaminas, como calcio (6.2 mg), potasio (27.5 mg), hierro (5.4 mg), vitamina C (1.9 mg), y carotenos (343.6 µg como β-caroteno).

La hoja de moringa posee un porcentaje superior al 25% de proteínas, esto es similar a los aportes proteínicos de alimentos como el huevo, o el doble que la leche, cuatro veces la cantidad de vitamina A de las zanahorias, cuatro veces la cantidad de calcio de la leche, siete veces la cantidad de vitamina C de las naranjas, tres veces más potasio que los plátanos, cantidades significativas de hierro, fósforo y otros elementos (AGRODESIERTO, 2006).

A su vez, Saini *et al.* (2012) analizaron la composición nutrimental de las plantas derivadas de cultivo de tejidos de *M. oleifera* por HPLC y espectrofotometría y encontraron que estas plantas eran superiores sobre las plantas control (cultivadas convencionalmente) por su contenido de nutrientes y clorofila, en el que se encontraron 13.2% y 14.7% mayor cantidad de α-tocoferol y carotenoides totales, respectivamente. Estas observaciones coinciden con los resultados obtenidos por Faisal y Anis (2006) y Debnath (2009) quienes descubrieron que las plantas micropropagadas evidencian un mayor contenido de nutrientes en comparación con las plantas cultivadas convencionalmente.

I.2 Fitoquímicos de *Moringa sp.*

Los fitoquímicos son productos químicos producidos por las plantas. Es común referirse únicamente a los productos que pueden tener un impacto en la salud o en el sabor, textura, olor o color de las plantas; sin embargo, estos no son considerados como nutrientes esenciales por el ser humano. Un análisis de los fitoquímicos de algunas especies de moringa podría proveer una oportunidad para examinar una amplia gama de compuestos con diferentes usos y aplicaciones.

De acuerdo a algunos autores, la familia a la que pertenecen las especies del genero *Moringa* es rica en compuestos que contienen el azúcar simple ramnosa, y posee un grupo único de compuestos llamados glucosinolatos y los isotiocianatos (Fahey *et al.* 2001; Bennet *et al.* 2003). Por ejemplo, las preparaciones de moringa contienen componentes específicos que incluyen 4-(4' -O-acetil- α -L-ramnopiranosiloxi) bencil isotiocianato (Fig. 2-1), 4-(α -L-ramnopiranosiloxi) bencil isotiocianato (Fig. 2-2), niamicina (Fig. 3-3), Pterygospermina (Fig. 2-4), isotiocianato de bencilo (Fig. 2-5), y 4-(α -L-ramnopiranosiloxi) bencil glucosinolato (Fig. 2-6) que se ha informado que tienen actividad hipotensora, contra el cáncer y antibacterianos.

Mientras que los compuestos mencionados son relativamente únicos de las Moringáceas, estas también son ricas en un gran número de vitaminas y minerales, así como otros fitoquímicos más comúnmente reconocidos tales como los carotenoides (incluyendo β -caroteno o pro-vitamina A).

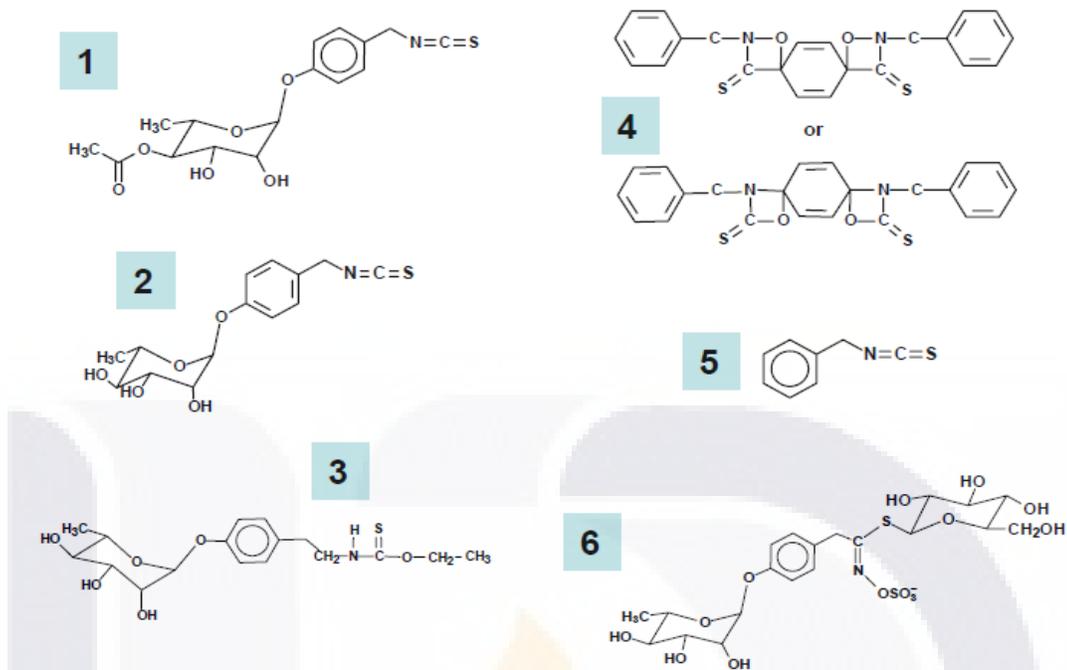


Figura 2. Estructuras fitoquímicas importantes en las especies de moringa. 1) 4-(4'-O-acetil- α -L-ramnopiranosiloxi) bencil isotiocianato; 2) 4-(L-ramnopiranosiloxi) bencil isotiocianato; 3) niamicina (niazimicin en inglés); 4) pterigospermina; 5) bencil isotiocianato; 6) 4-(α -L-ramnopiranosiloxi) bencil glucosinolato (Fahey et al. 2001; Bennet et al. 2003)

Se han encontrado en los extractos de hojas, frutas y semillas de moringa la presencia de ácido gálico, ácido clorogénico, ácido elágico, ácido ferúlico, kaempferol, quercetina y la vainillina (Singh et al. 2009).

Distintas partes de la planta presentan estos fitoquímicos, entre otros:

- Flor: Pterigospermina (Das et al.1957), de 9 octadecan-1-ol, (Z) - (CAS) cis-9-octadecen-1-ol, oleol, satol, Ocenol, sipo, ácido decanoico y dodecanal (Napolean et. al. 2009).
- Frutas: O-[2'-hidroxi-3'-(2"-heptenyloxy)]-propil undecanoato y O-etil-4-[(α -L-ramnosiloxi)-bencil] carbamato de metilo junto con p-hidroxibenzoato de metilo y β -sitosterol (Faizi et al. 1998); glucósidos fenólicos; 4-[(2'-O-acetil- α -L-ramnosiloxi) bencil] isotiocianato, 4 - [(3'-O-acetil- α -L-ramnosiloxi) bencil] isotiocianato, y S-metil-N-{4-[(α -L-ramnosiloxi) bencil]} tiocarbamato, junto con cinco glucósidos fenólicos conocidos (4-8) (Cheenpracha et al. 2010).

- Semillas: 4 (α -L-ramnosiloxi) isotiocianato de bencilo (Eilert et al. 1981); fenilacetnitrilo (Villaseñor et al. 1989a); 4 (α -L-ramnosiloxi) fenilacetnitrilo, 4-hidroxifenilacetnitrilo, y 4-hidroxifenilacetamida (Villaseñor et al. 1989b); O-etil-4-(α -L-ramnosiloxi) carbamato de bencilo, 4 (α -L-ramnosiloxi)-bencil isotiocianato, niamicina, niacirina, β -sitosterol, glicerol-1-(9-octadecanoato), 3-O-(6'-O-oleoil- β -D-glucopiranosil)- β -sitosterol, y β -sitosterol-3-O- β -D-glucopiranosido, (Guevara et al. 1999); 4-(α -L-ramnopiranosiloxi)-benzilglucosinolato (Bennet et al. 2003); β -sitosterol (Mahajan y Mehta, 2011); roridina E, veridiflorol, ácido 9-octadecanoico (Nepolean et al. 2009)

I.3 Propiedades Farmacológicas de las partes de la planta *M. oleifera*.

I.3.1 La biodisponibilidad de la vitamina A / carotenos

Nambiar y Seshadri (2001) trataron ratas con una dieta deficiente de vitamina A por 4 semanas. Al término de las 4 semanas, los autores dividieron las ratas en 4 grupos. Un grupo recibió acetato de vitamina A, el segundo grupo hoja fresca de moringa, el tercer grupo hoja deshidratada y el cuarto grupo sirvió como comparación y siguió con la dieta carente de vitamina A. Después de 4 semanas, encontraron que, el β -caroteno a partir de hojas de moringa fue eficaz en la superación de la deficiencia de vitamina A. Aunque los niveles sanguíneos de vitamina A fueron un poco más bajos en las ratas suplementadas con moringa en comparación con aquellas que recibieron acetato de vitamina A (25.8–28.2 μ g/dL vs. 34.7 μ g/dL), estos resultados sugieren que la administración de moringa parece ser suficiente para contrarrestar los efectos de la falta de vitamina A.

En ratas alimentadas con una dieta deficiente en vitamina A se observó una marcada reducción en la ingesta de alimentos, el peso corporal, acompañada de síntomas clínicos de la deficiencia de vitamina A y un descenso en el suero de vitamina A (29,2 a 19,1 g/dl) y el hígado de vitamina A (3,7 a 2,0 g/dl) al final de las 4 semanas.

Por el contrario en los grupos alimentados con hojas de moringa, se observaron mejoras significativas en los signos clínicos, la ingesta de alimentos y los pesos corporales en los tres grupos alimentados con vitamina A (4000 UI/kg de dieta) en forma

de acetato de vitamina A (grupo A), hojas frescas de moringa (grupo B) o hojas deshidratadas (grupo C) en comparación con el grupo control y al final de las 4 semanas.

También se observó una mejora significativa en los niveles de retinol en el hígado en la reposición de 4 semanas en los tres grupos, en comparación con el grupo deficiente de vitamina A. En términos de los parámetros de crecimiento, el tratamiento con hojas frescas de moringa y deshidratadas fueron mejores que con el tratamiento sintético de la vitamina A. Por tanto, los investigadores llegaron a la conclusión de que en los países en desarrollo como la India, fuentes de vitamina A, tales como hojas de moringa eran valiosas para superar el problema de la deficiencia de vitamina.

I.3.2 Actividad antioxidante.

El proceso de la oxidación no sólo causa la corrosión del hierro sino que procesos parecidos también afectan los alimentos. Los agentes de conservación se agregan a éstos precisamente para que las grasas poliinsaturadas, como son los aceites vegetales, oxiden (arrancien) más lentamente. Los flavonoides son conocidos por sus propiedades antioxidantes y los efectos antiproliferativos que pueden proteger el cuerpo contra diversas enfermedades y trastornos.

En hojas de moringa se identificaron flavonoides y sus respectivas cantidades: quercetina 89,8 mg/100 g de peso fresco, kaempferol 36,3 mg/100 g de peso fresco, isorhamnetina 2,9 mg/100 g de peso fresco dando un contenido total de flavonoides de 129 mg/100 g de peso y de materia seca de 25,5% (Yang et. al 2008).

Por otra parte los estudios realizados por Sreelatha y Padma (2009) sugirieron que los extractos de las hojas, tanto maduras y tiernas de *M. oleifera* exhibieron una potente actividad antioxidante contra los radicales libres, previniendo el daño oxidativo a las biomoléculas más importantes y una protección significativa contra el daño oxidativo.

Sasikala et al. (2010) encontraron que la fracción flavonoide de hojas de *M. oleifera* fue eficaz en la prevención de cataratas en el modelo de selenito mediante la mejora de las actividades de la enzima antioxidante y el contenido de sulfhidrilo. Así

mismo logro reducir la intensidad de la peroxidación de lípidos, y la inhibición de la generación de radicales libres en crías de rata. El contenido de fenoles totales de la fracción flavonoide de hojas de *M.oleifera* se encontró de 4,4 mg de catequina equivalente/ gr. de material vegetal seco. El extracto mostró actividad notable en 2,2-difenil-picrilhidrazil (IC₅₀ 36 g/ml) y en el radical superóxido (IC₅₀ 33,81 g/ml) en ensayos de barrido. La fracción flavonoide evita eficazmente los cambios morfológicos y el daño oxidativo en la lente.

I.3.3 Actividad contra el cáncer

En los seis compuestos bioactivos aislados del extracto etanólico de semillas de *M. oleifera*, se encontró niamicina por tener una potente actividad antitumoral en la promoción de la carcinogénesis de dos etapas en piel de ratón, utilizando 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA) como iniciador y el TPA (12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato) como promotor de tumores (Guevara et al. 1999). A partir de estos resultados, se propuso niamicina para ser un potente agente quimio-preventivo en la carcinogénesis química.

Un grupo de investigadores (Bharali et al. 2003) realizaron un extracto hidroalcohólico del fruto de *M. oleifera* en dosis de 125 mg/kg de peso corporal y 250 mg/kg de peso corporal para 7 y 14 días, respectivamente, y se administró a ratones hembra Swiss albino de 6-8 semanas de edad. Este extracto produjo cambios modulados en la fase I (citocromo b (5) y el citocromo P (450)) y en la fase II en enzimas (glutación-S-transferasa), enzimas antioxidantes, el contenido de glutatión y la peroxidación de lípidos en el hígado de los ratones.

Un aumento significativo de las actividades hepáticas de citocromo b (5), el citocromo P (450), enzimas como la catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, el contenido soluble en ácido sulfhidrilo (-SH) y una disminución significativa en el nivel de malondialdehído hepática se observó en ambos niveles de dosis de tratamiento cuando se compara con los valores de control. Se encontró actividad de la enzima glutatión-S-transferasa, para ser aumentado de manera significativa sólo en el nivel de dosis más alto. El Hidroxianisol butilado (BHA) suministrado a una dosis de 0,75% en la dieta de 7 y

14 días (control positivo) causó un aumento significativo en los niveles hepáticos de enzimas de la fase I y fase II, enzimas antioxidantes, el contenido de glutatión y una disminución en la peroxidación de lípidos.

Estos resultados son indicativos de un posible potencial quimiopreventivo del extracto de *M. oleifera* contra la carcinogénesis química a través de una vía hepática.

I.3.4 Actividad Anti-hiperlipidemia y anti-hipercolesterolemia.

Ghasi et al. (2000) evaluaron los efectos hipocolesteromiantes del extracto crudo de la hoja de *M. oleifera* en ratas Wistar alimentadas con dieta ricas en grasas, manteniendo las ratas en dieta alta en grasa aumentó significativamente los niveles de colesterol total en suero ($P < 0.0005$), el hígado ($P < 0.0005$), y riñón ($P < 0.01$) en comparación con las ratas en una dieta normal. El aumento fue del 28% en el suero, 38% en el hígado, y 24% en el riñón. Cuando la dieta alta en grasas se administra conjuntamente con el extracto crudo de la hoja de *M. oleifera*, se disminuyó el efecto del colesterol creciente de la dieta alta en grasas. También encontraron que la acción de disminución del colesterol del extracto crudo de moringa fue estadísticamente significativo en suero ($P < 0.001$) pero no en hígado y riñón ($P < 0.01$). El porcentaje de disminución en suero fue 14,35% (115 a 103,2 mg/100 ml de suero), el hígado fue 6.40% (9.4 a 8.8 mg/g peso húmedo), los riñones 11,09% (1,09 a 0,97 mg / g de peso húmedo).

No se observó ningún efecto significativo sobre la proteína total en suero; sin embargo, el extracto crudo aumentó la albúmina de suero por 15,22% (46-53 g / l). Este valor también se encontró ser estadísticamente significativo ($P < 0.05$). Se concluyó que las hojas de *M. oleifera* tenían una actividad hipocolesterolemia definida y los resultados apoyan su uso en la medicina herbal como un agente hipocolesterolemia en pacientes obesos en la India.

Otro grupo de investigadores (Duangjai et al. 2010) siguieron evaluando este posible efecto hipocolesterolemia en moringa. Estudiaron los efectos de extractos dietéticos de especies tailandesas y de 12 plantas seleccionadas ampliamente utilizadas como especias e ingredientes en diversos tipos de comida tailandesa, entre ellas *M.*

oleífera, con el fin de establecer un mecanismo de acción hipocolesterolemiante; estos estudios se llevaron a cabo en modelos animales. Encontraron que la potencia de los extractos de *Hibiscus sabdariffa*, *Moringa oleifera* y *Cucurbita moschata* a 100 µg/ml cada una, fue similar a 0.4 µg/ml de pravastatina, (medicamento que se utiliza para disminuir la cantidad de colesterol en el organismo) en la inhibición de la hidroximetilglutaril CoA-reductasa (HMG-CoA reductasa) y, posiblemente, la reducción de la biosíntesis de colesterol.

Este estudio también demostró que varias de las plantas examinadas poseían múltiples sitios de acción que eran posiblemente responsable de su efecto reductor del colesterol en el modelo *in vivo*.

Por otra parte Chumark et al. (2008) observaron en un experimento con conejos alimentados con dietas ricas en grasas (inducción de hipercolesterol), El extracto acuoso de hoja de *M. oleifera* significativamente ($P < 0.05$) prolonga el tiempo de retardo de la formación del dieno conjugado del colesterol e inhibe la formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo* en una manera dependiente de la dosis. En los conejos alimentados (inducción de hipercolesterol) a las 12 semanas de tratamiento con el extracto acuoso redujo significativamente ($P < 0.05$) los niveles de colesterol y la formación de placa aterosclerótica a aproximadamente 50% y 86%, respectivamente a las 12 semanas de tratamiento. El extracto también mostro una buena actividad antioxidante con el IC_{50} de 78.15 y 2.14 µg/ml, en los radicales difenilpicrilhidrazilo (DPPH) y Trolox, respectivamente.

Los resultados indicaron que la planta *Moringa oleifera* posee actividades antioxidante, hipolipidémicos y antiaterosclerótica y puede tener un potencial terapéutico para la prevención de las enfermedades cardiovasculares.

1.4 Principales usos y aplicaciones de *Moringa sp.*

M. oleifera es una especie típica de árboles de usos múltiples con un alto potencial económico. Tiene múltiples usos, además de como una planta medicinal y nutrimental. El árbol se utiliza para la alimentación de abejas, la conservación del suelo, sombra, rompe

vientos, cercas vivas, árbol seto, ornamental y para las fibras. Las hojas y las ramas pueden ser utilizadas como forraje para el ganado, especialmente de cabras, camellos y asnos. La corteza exuda una goma de color blanco a rojizo ('goma Ben" o "moringa goma') con las propiedades de tragacanto, que sirve para el curtido y en la impresión del calicó.

Las maderas blancas y suaves se queman libres de humo y se obtiene un tinte azul. En la India, la pulpa se ha utilizado para hacer el papel adecuado para el papel de periódico, embalaje, impresión y escritura, y con la pasta de grado rayón viscosa para textiles y celofán.

El "aceite de Ben" de las semillas de moringa mantiene su calidad y así puede lubricar maquinaria de precisión como los relojes. También se utiliza para el iluminante, jabón y cosméticos, perfumes y peluquería. El Aceite de Ben ha demostrado ser particularmente eficaz en la fabricación de jabón por producir una espuma estable con alta eficiencia de lavado adecuado para algunos países africanos. Las semillas y torta de semillas, un residuo de la extracción de aceite, también se pueden utilizar para la purificación de agua. Estudios han demostrado que la goma de *Moringa oleifera* podría ser utilizado como un aglutinante y retardante de liberación en la formulación de comprimidos (Panda et. al 2008).

El principal uso de la semilla es para obtener uno de los agentes floculantes/coagulantes naturales más importantes en la purificación del agua, y en la remoción de contaminantes ambientales, industriales y metales pesados, es por esto que su disposición es cada vez menor. Al emplear técnicas de cultivo de tejido dejamos a un lado la problemática que sería recolectar tanta semilla y nos facilitaría el hecho de obtener muchas plantas sin necesidad de tener semillas.

1.5 Elección de un sistema de micropropagación.

Los pocos informes sobre el cultivo de tejidos de *M. oleifera* describe la propagación clonal mediante el uso de explantes nodales tomadas de fuentes no asépticas, ya sea a partir de plántulas jóvenes y plantas maduras (Stephenson y Fahey 2004 ; Marfori 2010). La preservación de las especies de moringa, es de gran

preocupación de la biodiversidad, la etnobotánica, la dieta y las perspectivas farmacológicas.

Un estudio realizado por Saini et al. (2012) contempló el desarrollo de una rápida regeneración *in vitro* de la sección nodal de las plántulas cultivadas asépticamente de *M. oleifera* (Variedad-PKM-1) y la evaluación del desempeño de las plantas de cultivo de tejidos en condiciones de campo. Los autores observaron que la adición de reguladores de crecimiento como la Benciladenina (BA) a 4,44 mM se encontró que era óptima en la producción máxima en una media de 9.0 ± 1.0 de brotes axilares por explante después de 15 días de la inoculación.

Una alta tasa de multiplicación se estableció mediante el cultivo de rutina de sub secciones nodales de las explantadas en cultivos de brotes *in vitro*. El enraizamiento del cultivo *in vitro* individual fue máxima (100%) en el medio que contenía ácido indol-3-acético (AIA) a 2,85 mM junto con el ácido indol-3-butírico (IBA) a 4,92 mM. El 80% de las plantas enraizadas sobrevivieron después de ser trasplantadas en el suelo, a condición de que las plántulas en macetas fueran cubiertas con bolsas de polietileno transparente y se mantuvieron en un invernadero sombreado durante 15 días antes de la exposición a condiciones ambientales. Las hojas frescas cultivadas en el campo de las plantas de cultivo de tejidos fueron analizadas para la luteína, β -caroteno, α -tocoferol, carotenoides totales y el contenido de clorofila.

Los cultivos de tejidos derivados de plantas se encontraron nutricionalmente superiores sobre las plantas de control que contenían 13.2 y 14.7% mayor cantidad de α -tocoferol y los carotenoides totales, respectivamente. El resultado del presente estudio será útil para la rápida propagación clonal de *M. oleifera* y la producción de plantas nutricionalmente superiores.

1.6 Transformación genética.

Algunos de los objetivos potenciales de la biotecnología vegetal son aumentar la resistencia a insectos y patógenos y el poder insertar genes de interés farmacológico. En la actualidad no se han reportado estudios sobre la transformación

genética en plantas de *Moringa*. Un sistema de transformación de rutina requiere cultivos de células competentes para una eficiente regeneración de la planta, así como un método eficaz de administración de genes.

El progreso en la práctica de aplicaciones de la biología molecular de plantas ha sido dependiente en el desarrollo de métodos eficaces y prácticos para introducir ADN extraño en los tejidos vegetales, que posteriormente podría ser regenerado a plantas intactas con relativa facilidad. La introducción de genes extraños en células de plantas se puede lograr de forma rutinaria por cualquiera de transferencia directa de ADN o el uso de vectores biológicos tales como *Agrobacterium*.

Agrobacterium está siendo utilizado como un vector biológico para la transformación de plantas, hongos y animales. Esta capacidad de *Agrobacterium* para lograr la transferencia inter-reino de ADN en su huésped es un mecanismo de patogenicidad natural. Para causar la enfermedad, *Agrobacterium* debe primero entregar el ADN tumorigénico (T-DNA) en el genoma de la planta. Después de la integración, el T-DNA promueve la síntesis de compuestos nutritivos que proporcionan una ventaja selectiva para *Agrobacterium* (Escobar y Dandekar, 2003).

Tres genes están en el T-DNA que codifican para una monooxigenasa triptófano (*iaaM*), una hidrolasa indol-3-acetamida (*AICH*) y un AMP isopentilo transferasa (*ipt*). Estos genes causan desregulaciones hormonales en el tejido infectado, que es responsable de la aparición de tumores. Su eliminación del T-ADN dará lugar a la ausencia de formación de agallas (Powell et al. 2006).

La facilidad con la que se efectúan las transferencias de genes, una mayor predictibilidad e incorporación de un menor número de copias del transgén, que es un factor importante en la preservación del transgén a través de las generaciones subsiguientes, son algunas de las ventajas del método de transformación mediada por *Agrobacterium* más que los demás (Batra y Kumar, 2003).

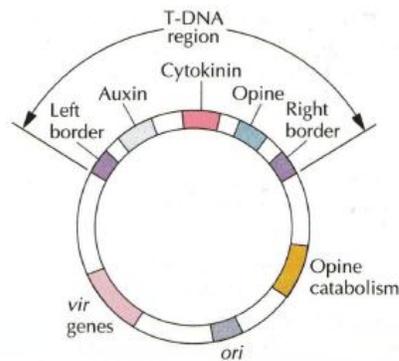


Figura 3. Plásmido Ti. El T-DNA está definido por los bordes derecho e izquierdo e incluye los genes para la biosíntesis de auxinas, citoquinina y opina; estos genes son transcritos y traducidos solo en las células de la planta. Fuera de la región del T-DNA, hay un *cluster* de genes *vir*, un gen que codifica para una enzima(s) del catabolismo de la opina, y un origen de replicación (*ori*) que permite que el plásmido sea mantenido de forma estable en *A. tumefaciens*.

Existe otra familia de plásmidos de *Agrobacterium* que podría servir de vectores de genes para la obtención de plantas sanas, genéticamente modificadas. Provocan una proliferación de las raíces denominada “raíz en cabellera”, en las plantas infectadas por *A. rhizogenes* y se llaman plásmidos Ri (de *root inducing*). Las raíces, como el tejido de la agalla, crecen rápidamente en un cultivo libre de bacterias.

El sistema de gen reportero GUS (β -glucuronidasa) es realmente una herramienta poderosa para la evaluación de la actividad de los genes en plantas transgénicas. La enzima β -glucuronidasa (GUS E.C.3.2.1.31) cataliza la hidrólisis de una amplia variedad de glucuronidos. Estos sustratos consisten en ácidos conjugados de D-glucoronico a través de una vinculación a prácticamente cualquier aglicona (Jefferson, 1989).

Las ventajas de GUS sobre otros sistemas reporteros incluyen la robustez de la enzima, la simplicidad de los ensayos y la variedad de sustratos disponibles. Estos incluyen la sensibilidad histoquímica a los sustratos tales como 5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-glucoronido (X-Gluc), y a numerosos otros sustratos cromogénicos y fluorogénicos para análisis cualitativo (Jefferson, 1989).

II. OBJETIVOS.

II.1 Generales:

- Desarrollar un sistema de propagación *in vitro* en plantas de *Moringa oleifera*.
- Implementar un sistema de Regeneración y transformación genética en plantas de *Moringa oleifera*.

II.2 Particulares:

- Estandarizar un protocolo para la germinación de semillas de moringa y su propagación *in vitro*.
- Estandarizar un protocolo *in vitro* para la regeneración por organogénesis a partir de diferentes explantes de Moringa.
- Evaluación de distintos métodos de transformación genética de moringa utilizando vectores biológicos y bombardeo.
- Verificar las plantas como transformantes mediante ensayos moleculares y por análisis histoquímicos.

III. JUSTIFICACION.

La moringa (*Moringa oleifera*) es una planta de la familia Moringaceae, a la cual se le atribuyen muchas propiedades curativas y nutricionales. Posiblemente, su cultivo podría constituir una alternativa para mejorar el valor nutritivo y la alimentación de grupos de población rural altamente vulnerables y que además, por sus características agronómicas, es uno de los escasos vegetales disponibles durante los periodos secos. Estas ventajas han generado que de manera reciente el cultivo de la *Moringa*, hay un gran auge en muchos países, incluido México.

Está documentado que la regeneración *in vitro* de plantas de *Moringa oleifera* es muy rápida y eficiente, en el estudio de Saini et al. (2012) observaron que las plantas micropropagadas eran más ricas en nutrientes en comparación con las plantas cultivadas convencionalmente, y llegaron a la conclusión que las plantas de moringa derivadas de cultivo de tejidos mostraron una mejorada composición de nutrientes con respecto a las plantas cultivadas convencionalmente, reflejado en una mayor cantidad de luteína, β -caroteno, α -tocoferol y carotenoides totales.

Por lo anterior, este estudio se enfoca en desarrollar un sistema de propagación *in vitro* que permita reproducir de manera masiva las plantas de moringa y posteriormente mediante estrategias de adaptación estas puedan ser usadas con varios fines, medicinales, económicos, de ornato y restauración de ecosistemas deteriorados. La moringa posee características como planta de ornato, por lo que la población que se logre obtener mediante la propagación *in vitro* podría ser usada en parques y jardines debido a sus bajos requerimientos hídricos, entre muchas bondades.

La posibilidad de regenerar plantas completas de moringa a partir de pequeños fragmentos de tejido tomando en cuenta los resultados de Saini et al. (2012), nos proporciona las bases que se requieren para evaluar su capacidad de regeneración y potencializar las condiciones *in vitro* para posteriormente llevar a cabo otras técnicas. La evaluación de distintos métodos de transformación genética en explantes de moringa para establecer posteriormente un protocolo, nos permite dar la iniciativa y proveer un avance en las investigaciones futuras, y ofrecer una alternativa para utilizar esta planta como modelo, ya que posee una amplia diversidad genética (Muluvi et al. 1999) y es considerada como una planta de alto valor farmacéutico.

IV. MATERIALES Y METODOS.

IV.1 Material vegetal y establecimiento de cultivos.

Las semillas sanas de *Moringa oleifera* se obtuvieron del Municipio de Valle de Santiago, Guanajuato. A las semillas se les retiró la testa y se desinfectaron superficialmente en el interior de la campana de flujo laminar, se realizó un lavado con Hyclean plus al 10% (v/v) mas 3 gotas de Tween 20 durante 3 min, posteriormente se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril; en seguida se añadió alcohol al 70% durante 3 min y nuevamente se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril, se desinfectaron por inmersión en hipoclorito de sodio al 15% (v/v) (Cloralex ®) durante 15 min, se decantó el hipoclorito de sodio y nuevamente se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril.

Las semillas se sembraron asépticamente en medio basal MS (Murashige y Skoog 1962) que contenía 30 g/L de sacarosa y solidificado con 5 g/L de Agar Plant TC (PhytoTechnology Laboratories, LLC). El pH se ajustó a 5.7, después de lo cual el medio se dispensó en porciones de 50 ml cada uno en frascos de cultivo de 250 ml (PhytoTechnology Laboratories, LLC) y se esterilizó en autoclave a 121° C durante 20 min. Los cultivos se mantuvieron en la obscuridad a $27 \pm 1^\circ$ C durante 7 días. Después de la germinación, las plántulas se transfirieron bajo un fotoperiodo (12 hrs obscuridad/12 hrs Luz) a 2.000 Lux de intensidad producida de los tubos fluorescentes de luz blancas frías.

IV.2 Micropropagación de ápices.

Se utilizaron plántulas de 3-4 cm de longitud (12-15 días después de la germinación) para la propagación. En el interior de una campana de flujo laminar y en condiciones asépticas, se tomaron las plántulas con la ayuda de unas pinzas y bisturí estériles y se cortaron los ápices, los cuales fueron seleccionados como explantes. Estos explantes apicales se inocularon en medio basal MS (Murashige y Skoog 1962) que contenía 30 g/L de sacarosa y solidificado con 5 g/L de Agar Plant TC (PhytoTechnology Laboratories, LLC). El porcentaje de respuesta, el número de brotes por explante y longitud de brotes se registraron 15 días después de la transferencia al medio MS. Los

micro brotes o nudos obtenidos se subcultivaron repetidamente en medio basal MS suplementado con 4.44 μ M de Benziladenina (BA) de acuerdo con Saini et al. (2012).

IV.3 Inducción de brotes adventicios. Aislamiento del nudo cotiledonario.

A partir de las plántulas germinadas después de haber cortado el ápice, con la ayuda de un bisturí estéril se cortaron los tallos o brotes restantes y raíces, para obtener solo el nudo cotiledonario y poder observar si podía originar nuevos brotes. Esta zona embriogénica se inoculó en medio basal MS (Murashige y Skoog 1962) que contenía 30 g/L de sacarosa y solidificado con 5 g/L de Agar Plant TC (PhytoTechnology Laboratories, LLC). El porcentaje de respuesta, el número de brotes por explante y longitud de brotes se registraron 8-10 días después de la transferencia al medio MS.

IV.5 Sistema de regeneración.

Se diseñó un cuadro de tratamientos con una combinación de auxina Ácido α -Naftalenacético (ANA) y una citocinina N6-Benciladenina (BA) a diferentes concentraciones. Para observar el efecto de estos reguladores de crecimiento en explantes de secciones de hipocotilo de las plántulas de moringa, se realizó por la vía de organogénesis directa la cual es la formación de *novo* de órganos en los explantes cultivados.

Para establecer los cultivos para el sistema de regeneración se preparó medio basal MS con 3 % de sacarosa, se ajustó el pH a 5.7 y solidificado con 5 g/L de Agar Plant TC. Después de fundir el gelificante, se dividió en porciones de 50 ml y se agregó a cada una de ellas los reguladores de crecimiento seleccionados: N6-Benciladenina (BA) de 0-5 mg/L y Acido α -Naftalen acético (ANA) de 0-1 mg/L de acuerdo con el cuadro de tratamientos y se esterilizaron en autoclave a 121° C durante 20 min. Posteriormente cada porción de medio MS con reguladores (Tratamientos) se dispensó en condiciones estériles en 3 cajas Petri.

Al transcurrir 21 días de la siembra de las semillas, las plántulas germinadas consistían de 3-4 cm de longitud de hipocotilo, las cuales se utilizaron para la regeneración. En el interior de una campana de flujo laminar y en condiciones asépticas, se tomaron las plántulas con la ayuda de unas pinzas y bisturí estériles, se cortaron los hipocótilos en segmentos de aproximadamente 1 cm los cuales fueron seleccionados como explantes para el sistema de regeneración. Estos explantes se distribuyeron en cada caja Petri de cada tratamiento, se sellaron las cajas y se incubaron a 27° C, bajo un fotoperiodo (12 hrs oscuridad/12 hrs Luz) a 2.000 Lux de intensidad producida de los tubos fluorescentes de luz blancas frías.

La descripción de la respuesta del explante a cada tratamiento, el porcentaje de explantes que responden formando brotes y numero promedio de brotes por explante en cada tratamiento se registraron a los 11, 21 y 28 días después de la transferencia al medio MS.

Tabla 1. Cuadro de Tratamientos.

	ANA (mg/L)		
BA (mg/L)	0	0.5	1
0	T1 (control)	T2	T3
1	T4	T5	T6
2	T7	T8	T9
3	T10	T11	T12
4	T13	T14	T15
5	T16	T17	T18

Donde T1 representa: Tratamiento 1, T2: Tratamiento 2, y así sucesivamente.

*Cada tratamiento tiene 3 réplicas, cada replica con 6 explantes (n=6)

IV.6 Transformación genética de explantes de Moringa.

IV.6.1 Inducción de raíces transformadas *in vitro*.

6.1.1. Cepa bacteriana y plásmido.

Se utilizó la cepa A4, tipo agropina de *Agrobacterium rhizogenes*. Esta bacteria contiene el plásmido RiA4, en el que se encuentran los genes *rol* que confieren la característica de “raíz pilosa” en los tejidos transformados. Además portando el plásmido vector binario pESC4 (ver Anexo A) que en su región T-ADN, contiene el gen de la neomicina fosfotransferasa (*npt II*) que confiere resistencia a la kanamicina, bajo el control del promotor y terminador del gen de la nopalina sintetasa (*nos*) de *A. tumefaciens*, y el gen de la β -glucuronidasa (*gus*) que actúa como reportero, bajo el control del promotor del gen de la proteína que une la clorofila *a/b* (*cab*) y el terminador del gen de la octapina sintetasa (*ocs*). Cabe mencionar que el promotor *cab* hace que en este plásmido el gen *gus* sea inducible por luz.

6.1.2. Cultivo bacteriano.

La bacteria se inoculó en medio YM líquido (ver Anexo B) suplementado con 50 mg/L de Rifampicina y 50mg/L de Kanamicina y se incubó a 28°C en agitación constante durante 72 hrs. para el crecimiento bacteriano. La concentración se determinó a partir de la absorbancia del cultivo bacteriano a una longitud de onda de 600 nm en un espectrofotómetro de UV-visible.

6.1.2. Cocultivo.

Para llevar a cabo la infección de los explantes se utilizó un frasco con MS líquido con 3% de sacarosa al cual se le añadió 50 μ l de Acetosiringona 100mM y 5 ml del cultivo bacteriano de *A. rhizogenes*. De las plántulas germinadas de Moringa se cortaron 40 explantes de segmentos de tallo (~1cm) y de forma transversal; al tiempo de cortarlos se colocaron en un frasco con MS líquido con 3% de sacarosa y antioxidantes (100 mg/L de

ácido cítrico y 100mg/L de ácido ascórbico, esterilizados por filtración), al tener todos los explantes se transfirieron al frasco de cocultivo y se incubaron por 30 min.

Posteriormente se sacaron los explantes del cocultivo, se secó el exceso de líquido colocándolos sobre una gasa estéril y fueron transferidos a cajas petri con medio solido MS y se incubaron a 28°C en condiciones de obscuridad durante 3 días.

6.1.3. Transferencia al medio de selección.

Se sacaron los explantes del medio de cocultivo y se transfirieron a un frasco con MS líquido adicionado con 500 mg/L de Cefotaxima y se incubaron por 30 min. Posteriormente se trasladaron los explantes al medio solido de selección en cajas petri (MS con 3% de sacarosa, 5 g/L de agar plant, 25 mg/L de kanamicina como agente selectivo y 25 mg/L de Cefotaxima). Se incubaron los cultivos a 25°C en la obscuridad por 20 días. Al día 21 se transfirieron a la luz. Se midieron resultados cuando hubo emergencia de raíces.

Se realizó un análisis histoquímico para detectar la actividad del producto del gen *gus* en las raíces obtenidas.

IV.6.2 Análisis histoquímico para β-glucoronidasa (GUS)

Preparación de la solución de reacción:

	Concentración	Cantidad
Buffer de fosfatos 1M	100mM	100µl
EDTA 0.25M	10mM	40µl
Ferrocianuro de Potasio 5mM K₄[Fe(CN)₆] · 3 H₂O	0.5mM	100µl
Ferricianuro de Potasio 5mM K₃[Fe(CN)₆]	0.5mM	100µl
Triton 10%	0.1%	10µl
X-gluc 40mM	2.0 mM	50µl
Agua destilada		600µl
		Total = 1000 µl

A partir de los explantes que produjeron raíces presuntamente transformadas; se cortaron las raíces obtenidas y se transfirieron a un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml, donde se añadió la solución de reacción hasta cubrir el tejido, se incubó a 37°C por 2 hrs. Una vez que apareció el precipitado azul, las raíces se lavaron 3 veces con etanol al 70% para desteñir y fijar el tejido. Las raíces se observaron en un microscopio estereoscópico para visualizar mejor el producto del gen *gus*.

IV.6.3. Transformación mediada por *A. tumefaciens*.

6.3.1 Cepa y plásmido.

Se utilizó la cepa LBA 4404 portando el plásmido binario pBI121 (ver Anexo C) que incluye, entre los bordes derecho e izquierdo del T-DNA, el gen *nptII* como marcador de selección que confiere resistencia al antibiótico kanamicina y el gen reportero *uidA*, que codifica para la β -glucoronidasa (GUS) bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. La actividad de esta enzima puede ser detectada fácilmente mediante un ensayo histoquímico.

6.3.2. Conservación y proliferación de *A. tumefaciens*.

La bacteria se conservó mediante subcultivos en medio LB sólido adicionado con 25 mg/L de Kanamicina. Para la proliferación de la bacteria para usarla en transformación genética se utilizó YM líquido adicionado con 25 mg/L de kanamicina, se incubó a 28° C en agitación constante en condiciones de obscuridad durante 72 hrs. A partir de esta suspensión bacteriana se realizaron stocks en tubos para microcentrifuga. Cada stock incluye 35 μ l de dimetil sulfoxido (DMSO) como criopreservante y se aforó a 500 μ l con la suspensión bacteriana. Los viales se congelaron a -60°C hasta su uso.

6.3.3. Cultivo bacteriano.

Se descongeló el vial de la bacteria *A. tumefaciens* LBA4404; se tomaron los 500 μ l y se inoculó en 10 ml de medio líquido YM en tubo Falcon suplementado con 25 mg/L de kanamicina y se incubó a 28°C en agitación constante en condiciones de obscuridad durante 24 hrs. Posteriormente se escaló el cultivo, y se vació a un matraz con 50 ml de

medio líquido YM adicionado con 25 mg/L de kanamicina, se incubaron en las condiciones ya descritas, durante 20-22 hrs hasta que llegó a su etapa exponencial.

6.3.4. Explantes.

De las plántulas germinadas de moringa se cortaron 40 explantes de segmentos de tallo (~1cm); y se colocaron en cajas petri con medio MS sólido por 24 hrs.

6.3.5. Cocultivo.

Para llevar a cabo la infección de los explantes se utilizó un frasco con MS líquido con 3% de sacarosa al cual se le añadió 50 µl de Acetosiringona 100mM y 5 ml del cultivo bacteriano.

Todos los explantes se transfirieron al frasco de cocultivo, y se dejó en agitación a 200 rpm y se incubaron 60 min. Se lavaron los explantes para eliminar la suspensión bacteriana; se agregó un volumen similar de agua destilada estéril y se agitó durante 5 min, este procedimiento se repitió 3 veces. Se eliminó el agua y se pasaron los explantes sobre una gasa estéril para secarlos, y se transfirieron a cajas petri con medio sólido MS y se incubaron a 28°C en condiciones de obscuridad durante 48 hrs.

6.3.6. Transferencia al medio de selección.

Después de transcurrir las 48 hrs. se sacaron los explantes del medio de cocultivo, se transfirieron a un frasco con MS líquido adicionado con 500 mg/L de Cefotaxima y se agitaron durante 2 hrs. Posteriormente se transfirieron los explantes al medio sólido de selección en cajas petri (MS con 3% de sacarosa, 5 g/L de agar plant, 25 mg/L de kanamicina como agente selectivo y 3 mg/L de Benziladenina). Se incubaron los cultivos a 28°C hasta que se desarrolló el tejido.

6.3.7. Análisis Histoquímico para detectar la actividad del gen *gus*.

A partir de los brotes formados por los explantes de tallo presuntamente transformados; se cortaron los brotes obtenidos y se transfirieron a un tubo para microcentrifuga y se añadió la solución de reacción (se preparó como en el paso anterior

(6.2)) hasta cubrir el tejido, se incubó a 37°C por 2 hrs. Una vez que apareció el precipitado azul, los brotes se lavaron 3 veces con etanol al 70% para desteñir y fijar el tejido. Los brotes se observaron en un microscopio estereoscópico para visualizar mejor el producto del gen *gus*.

IV.6.4. Transformación por bombardeo con Microprojectiles.

6.4.1. Plásmido.

El plásmido pAHC25 (9.8 Kb) es un vector de expresión dual que consiste en el gen *UidA* (Jefferson, 1987) y el gen de selección BAR (fosfinotricina acetiltransferasa), cada uno impulsado por el promotor de la ubiquitina del maíz *Ubi1*. El gen *UidA* codifica para la enzima β -glucoronidasa (gen reportero GUS) y el gen de selección BAR codifica la enzima PAT la cual inactiva al ingrediente activo del herbicida BASTA.

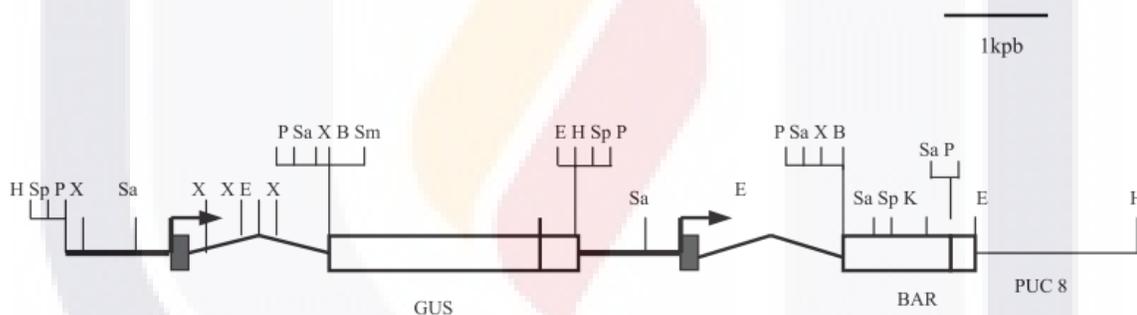


Figura 4. Representación esquemática del vector pAHC25. (Melchiorre et al. 2002).

6.4.2. Ensayo de susceptibilidad al Herbicida.

Se utilizó el herbicida Finale ® con ingrediente activo Glufosinato de Amonio (ver Anexo D), el herbicida comúnmente conocido como BASTA contiene este mismo ingrediente activo y ambos de Bayer CropScience.

Se tomaron explantes de hipocotilo de moringa (~1cm) probando las dosis mínimas reportadas para la selección de plantas mono y dicotiledóneas transgénicas utilizando este agente de selección. Los explantes fueron transferidos a cajas con medio MS adicionado con 0, 0.5, 1, 1.5 y 2 mg/L del herbicida. Se incubaron a 27°C bajo un fotoperiodo. La respuesta de los tejidos se evaluó semanalmente.

6.4.3. Preparación de las macropartículas de oro.

Se pesaron 50 mg de partículas de oro de 0.6 μ (Bio-rad) en un tubo para microcentrífuga de 1.5 ml. Se agregó 1 ml de etanol grado reactivo al 100% y se mezclaron utilizando un vortex durante 3 min, se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 min, se descartó el sobrenadante y se añadió 1ml de etanol al 70% y se mezcló en vortex durante 2 min. Se incubó a temperatura ambiente por 15 min, agitando cada 5 min, se centrifugo por 3 min a 13,000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se agregó 1 ml de agua estéril y se mezcló con la ayuda de un vortex durante 1 min hasta que las partículas estuvieron resuspendidas completamente. Se dejaron a temperatura ambiente durante 1 min para permitir que las partículas se precipitaran. Se centrifugó durante 2 min a 13,000 rpm y se descartó el sobrenadante. Estos lavados se repitieron 5 veces, finalmente se agregaron 850 μ l de glicerol al 50%. La suspensión de partículas de oro preparadas se almacenaron a -20°C hasta el momento de usarlas.

6.4.4. Cobertura de partículas de oro con el ADN de interés.

La suspensión de oro previamente preparadas se mezclan utilizando un vortex hasta estar completamente resuspendidas, se tomaron 50 μ l de estas partículas y en estricto orden se agregaron: 10 μ l de ADN plasmidico (pAHC25) de concentración 1 μ g/ μ l, 50 μ l de CaCl₂ 2.5M recién preparado, 20 μ l de espermidina 0.1M después de añadir cada solución se agito con vortex durante 5 segundos, posteriormente se mezcló con vortex durante 20 min a 4°C, se agregaron 200 μ l de etanol absoluto a temperatura ambiente y mezclo en vortex durante 5 segundos, la mezcla fue centrifugada durante 30 segundos a 13,000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se repitieron los lavados con etanol al menos 5 veces hasta que las partículas de oro eran fácilmente resuspendidas. Al final, las partículas de oro se resuspendieron en un tubo para microcentrifuga de 1.5 ml con 35 μ l de etanol al 100% y se dejaron en hielo hasta su uso. Este material se utilizó para 6 bombardeos.

6.4.5. Explantes de moringa para el bombardeo.

De las plántulas germinadas de moringa se cortaron 60 explantes de segmentos de tallo (~1cm); y se colocaron en cajas Petri con medio MS sólido por 24 hrs. Se seleccionaron callos de moringa, que se formaron a partir de segmentos de tallo, éstos se dejaron incubando durante 10 días en cajas Petri con medio MS sólido.

6.4.6. Bombardeo de explantes de moringa (Pistola Bio-Rad).

Los discos de ruptura, las mallas de retención y los macroacarreadores se esterilizaron sumergiéndolos en etanol al 70% y se dejaron secar a temperatura ambiente en condiciones estériles. Se usaron discos de ruptura de 900, 1100 y 1350 psi y se probaron distintas distancias con cada uno de los discos de ruptura (6, 10 y 12 cm), por lo cual la presión del manómetro de salida se ajustó según el disco, considerando que la presión de salida debe ser mayor a la resistencia del disco de ruptura. Se encendió la bomba de vacío y la cámara de vacío para realizar los disparos. Se colocaron 6 µl de la suspensión de micropartículas de ADN en los macroacarreadores previamente esterilizados, se colocó la caja Petri con medio MS y explantes a diferentes distancias (6 cm, 10 cm y 12 cm) y se cerró la cámara de vacío. Se generó vacío hasta que el indicador marco 15 mmHg (milímetros de mercurio), se mantuvo el vacío y se realizó el disparo de las micropartículas con el ADN. Los explantes bombardeados se transfirieron a medio de regeneración (medio MS adicionado con 3mg/L de Benciladenina) y se incubaron durante 48 hrs a 27°C en la obscuridad. Después de este periodo, los explantes se pasaron a un nuevo medio de regeneración adicionado del agente selectivo (2 mg/L de Herbicida) y 250 mg/L de Cefotaxima (durante los primeros 15 días) para eliminar cualquier contaminación, se incubaron a 27°C bajo un fotoperiodo.

Los explantes se cambiaron a medio nuevo cada dos semanas. Se seleccionaron los explantes resistentes a la selección.

IV.6.5. Análisis de transformantes.

6.5.1. Verificación de la presencia y expresión de transgenes en raíces transformadas con *A. rhizogenes*, brotes transformados con *A. tumefaciens* y explantes bombardeados con microproyectiles.

Las raíces transformadas y brotes transformados que presentaron actividad del gen *gus* fueron analizados por PCR para comprobar la presencia del transgén, al igual los explantes bombardeados resistentes al agente de selección (gen BAR).

6.5.1.1. Extracción de ADN genómico.

El ADN genómico se aisló de los tejidos presuntamente transformados obtenido por los 3 métodos de transformación utilizando el siguiente protocolo: se congeló el tejido vegetal en nitrógeno líquido y se pulverizó con ayuda de un mortero, se coloca el tejido pulverizado en un tubo para microcentrífuga de 1.5ml e inmediatamente sin dejar descongelar se añadió 800 µl de buffer de lisis (Tris-HCl 0.1M, NaCl 1.4 M, EDTA 0.02M y 2% CTAB) más 2.4 µl de β-mercaptoetanol. Se mezcló por inversión y se incubaron a 65°C durante 15 min. Se mezcló esporádicamente. Después de la incubación el tubo se colocó en hielo durante 5 min y se adiciono 0.5 ml de fenol-cloroformo (1:1), se mezcló hasta emulsificar. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min y se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo, se añadió 1µl de RNAsa, se mezcló por inversión e incubo a 37°C durante 20 min. Se agregó 0.5ml de fenol-cloroformo, se emulsificó y centrifugo a 12,000 rpm durante 5 min. Se recuperó la fase acuosa en un tubo limpio y se adiciono 0.5ml de cloroformo-alcohol isoamilico (24:1), se emulsificó y se centrifugó a 12,000 rpm/5min. Se recuperó la fase acuosa en tubo limpio y se añadió un volumen igual de isopropanol frio. Se mezcló por inversión durante 1 min e incubo a -20°C durante 10 min. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y se agregó a la pastilla 0.2ml de etanol al 70% mezclando por inversión. Se centrifugó nuevamente, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla a 50°C en la estufa. Se resuspendió con agua destilada estéril, de 30 a 50 µl dependiendo de la pastilla.

6.5.1.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

La mezcla total de amplificación se realizó en volúmenes de 20µl compuestos por: 10µl de la mezcla de reacción de PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific), 5 µl de Agua libre de nucleasas (Thermo Scientific), 3 µl de ADN del tejido vegetal, y 1 µl de cada uno de los iniciadores u oligos.

Para la amplificación de los transgenes se usaron los siguientes iniciadores:

Primer *nptII* con un fragmento esperado de 517 pb:

NPTII-1 5' TATTCGGCTATGACTGGGCA 3'

NPTII-2 5' GCCAACGCTATGTCCTGAT 3'

Primer *rolB* con un fragmento esperado de 780 pb:

rolB-1 5' ATGGATCCCAAATTGCTATTCCTTCCACGA 3'

rolB-2 5' TTAGGCTTCTTTCTTCAGGTTTACGCAGC 3'

Primer *gus* con un fragmento esperado de 1200 pb:

GUS-1 5' GGTGGGAAAGCGCGTTACAAG 3'

GUS-2 5' GTTTACGCGTTGCTTCCGCCA 3'

Primer *virD1* con un fragmento esperado de 450 pb:

virD1-1 5' ATGTCGCAAGGACGTAAGCGGA 3'

virD1-2 5' GGAGTCTTTCAGCATGGAGCAA 3'

- En el caso de las raíces transformadas se verifica la presencia de los transgenes *rolB*, *nptII*, *gus* y *virD* para detectar la presencia residual de *A. rhizogenes*.
- En los brotes transformados con *A. tumefaciens* se verifica la presencia de los transgenes *nptII* y *gus*.
- En los explantes bombardeados con microproyectiles se verifica la presencia del transgén *gus*, ya que para el gen BAR no se consiguieron los oligos.

Las condiciones de la reacción fueron las siguientes:

Ciclos (No.)	Desnaturalización	Alineación	Polimerización
1 ciclo	4 min a 94°C	1 min a 55°C	3 min a 72°C
30 ciclos	1 min a 94°C	1 min a 55°C	3 min a 72°C
1 ciclo			7 min a 72°C

Los productos de la amplificación se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio al 0.5%. La visualización se realizó bajo luz ultravioleta con la ayuda de un sistema de análisis de imágenes (Eagle eye).

V. RESULTADOS.

V.1 Establecimiento de cultivos.

A partir del fruto del árbol de moringa el cual se abre en 3 partes se obtuvieron las semillas (Fig. 5A), estas semillas presentan una testa muy dura o gruesa que no permite la germinación en cultivos *in vitro*, por lo tanto para acelerar la germinación se les removió la testa (Fig. 5B). La protusión se observó a los 5 días después de la inoculación (Fig. 5C) y las plántulas germinadas eran etioladas debido a la ausencia de luz, presentaban características muy peculiares como: color blanco y con tallos largos y delgados (Fig. 5D), después de la germinación estas plántulas se pasaron a luz bajo un fotoperiodo, a los 2 días las plántulas presentaron un cambio de color, con tallos y hojas verdes (Fig. 5E, 5F). La elongación de las plántulas germinadas alcanzó una longitud de 3-4 cm a 11 días después de la inoculación. El porcentaje de germinación fue del 82-85% por cada lote de 100 semillas.

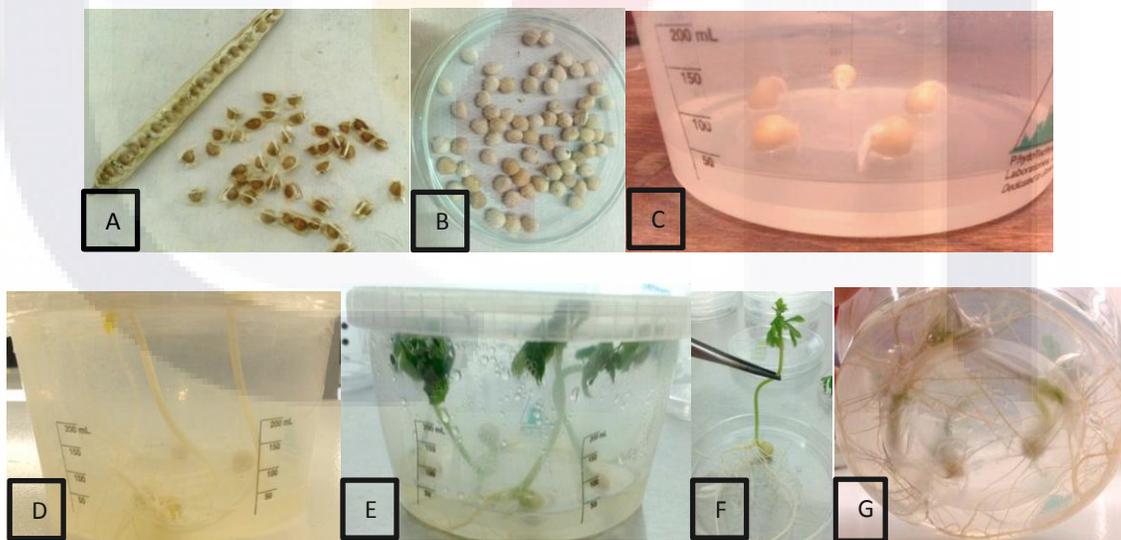


Figura 5. Establecimiento de cultivos de *M. oleifera*. A. Fruto de 3 valvas y semillas de *Moringa oleifera*. B. Semillas de moringa sin testa. C. Semillas inoculadas en medio MS, presencia de radículas a los 5 días después de la inoculación. D. Elongación de las plántulas germinadas a los 11 días después de la inoculación en condiciones de obscuridad. E y F. Plántulas germinadas transferidas a luz bajo un fotoperiodo. G. Sistema radical de las plántulas germinadas.

V.2 Micropropagación de ápices.

Para la propagación se utilizaron plántulas germinadas de 3-4 cm de longitud (12-15 días después de la germinación) (Fig. 6A). Los explantes apicales se inocularon en frascos de cultivo de 250 ml que contenían medio basal MS (Fig. 6C). La elongación de los ápices se observó periódicamente, a lo largo de 21 días, el 90% de los explantes respondieron satisfactoriamente, formando 4-5 secciones internodales y formación de raíces (Fig. 6E, 6F y 6G).



Figura 6. Micropropagación de ápices. A. Plántulas germinadas de 3-4 cm de longitud (12-15 días después de la germinación). B. Explantes apicales. C. Ápices sembrados en medio basal MS. D, E, F y G. Elongación de ápices que presentan 4-5 secciones internodales, 21 días después de la inoculación.

V.3 Micropropagación de explantes nodales

Micro brotes o nudos obtenidos de los ápices elongados y propagados fueron repetidamente subcultivados en medio basal MS suplementado con 4.44 μM de Benziladenina (BA) (Fig. 7B), con este tratamiento se observó un mayor número de brotes axilares por explante nodal.

La formación de brotes se observó periódicamente a lo largo de 21 días (Fig. 7C, 7D), donde el 80% de los explantes cultivados respondieron satisfactoriamente formando de 2-3 brotes por explantes, el 20% restante se debió a que los explantes presentaron necrosis o no hubo una estimulación que parte de la citoquinina (BA). La elongación de las plántulas obtenidas alcanzo una longitud de 4-5 cm.

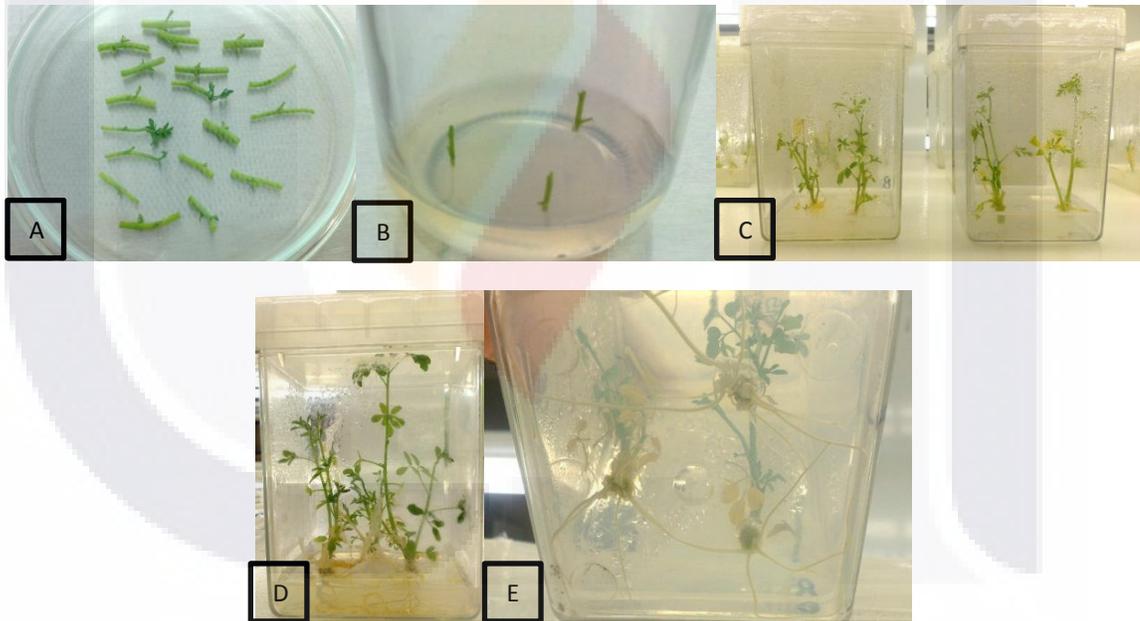


Figura 7. Micropropagación de explantes nodales. A. Explantes nodales. B. Explantes nodales inoculados en medio basal MS suplementado con 4.44 μM de BA. C y D. Formación de nuevos brotes y elongación 19-21 días después de la inoculación. E. Formación de raíces.

V.4 Inducción de brotes adventicios. Aislamiento del nodo cotiledonario.

Después de mantener por 21 días los cultivos *in vitro*, los nudos cotiledonarios aislados respondieron satisfactoriamente formando 2 brotes por explante, se observó que una vez que germinaba la semilla de moringa, al cortar el ápice, tallo, brotes y raíces que había originado en la primer plántula, se podría dejar solo una zona a la que le llamamos “nodo cotiledonario” (Fig. 8A), estos nodos al ser sembrados nuevamente en medio basal MS formaron nuevos brotes, los cuales se elongaron a los 12 días después de la inoculación (Fig. 8B, 8C).

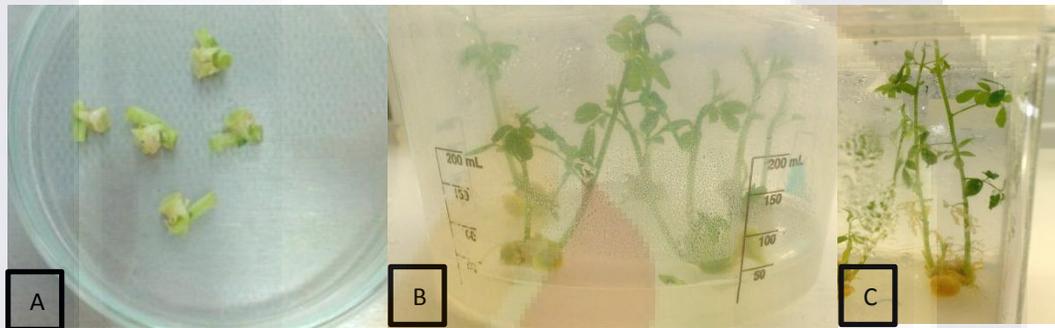


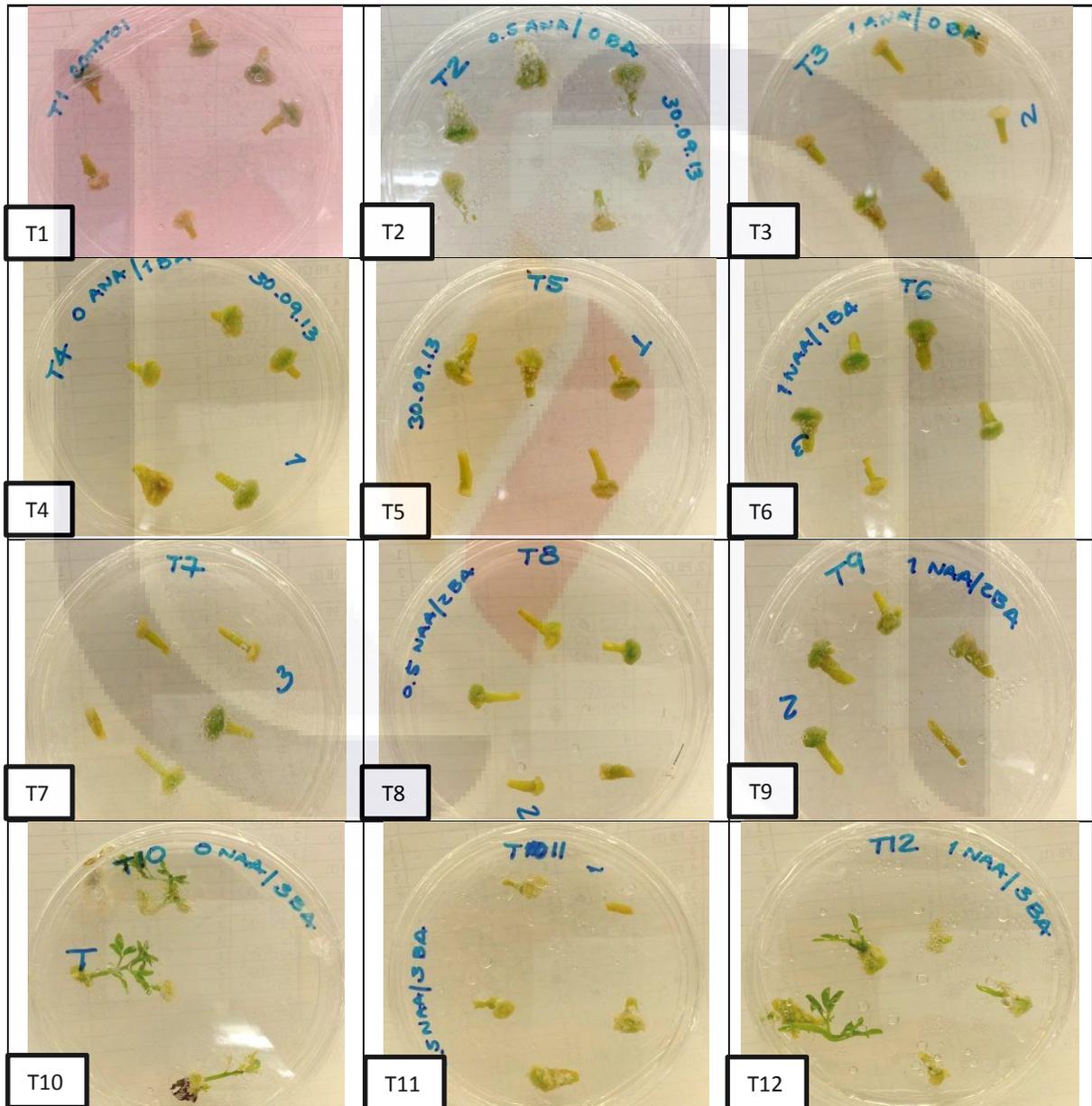
Figura 8. Inducción de brotes adventicios. A. Nudos cotiledonarios aislados. B y C. Formación de nuevos brotes, 2-3 brotes por explante y elongación de los mismos 12 días después de la inoculación a medio basal MS.

V.5 Sistema de regeneración por organogénesis.

Después de 28 días de mantener los cultivos *in vitro*, los explantes de segmentos de hipocotilo de moringa respondieron en la formación de tejido calloso y muy pocos explantes en la formación de *novo* de brotes, se vio reflejado que el efecto de la combinación de una auxina como ácido α -Naftalen acético (ANA) y una citoquinina; la beciladenina (BA) a diferentes concentraciones en su mayoría los explantes respondieron satisfactoriamente.

A los 11 días de inoculación de los explantes de segmentos de hipocotilo en el medio MS suplementado con la combinación de fitohormonas, se observó la formación de brotes en el 38.8% de los explantes con el tratamiento T10 (0 mg/L ANA; 3mg/L BA), el 61.2 % de los explantes restantes formaron tejido calloso, el 11.1% en los explantes con

el tratamiento T11 (0.5 mg/L ANA; 3mg/L BA) respondieron a la formación de brotes, así como el 27.7% en los explantes con el tratamiento T12 (1 mg/L ANA; 3mg/L BA). En el tratamiento control (T1; MS sin reguladores) se observó la formación de tejido calloso al igual que en los demás tratamientos (T2-T18) y solo en los tratamientos T10, T11 y T12 hubo formación de brotes. En la figura 9 se puede visualizar el efecto de la combinación de estos reguladores de crecimiento (ANA/BA).



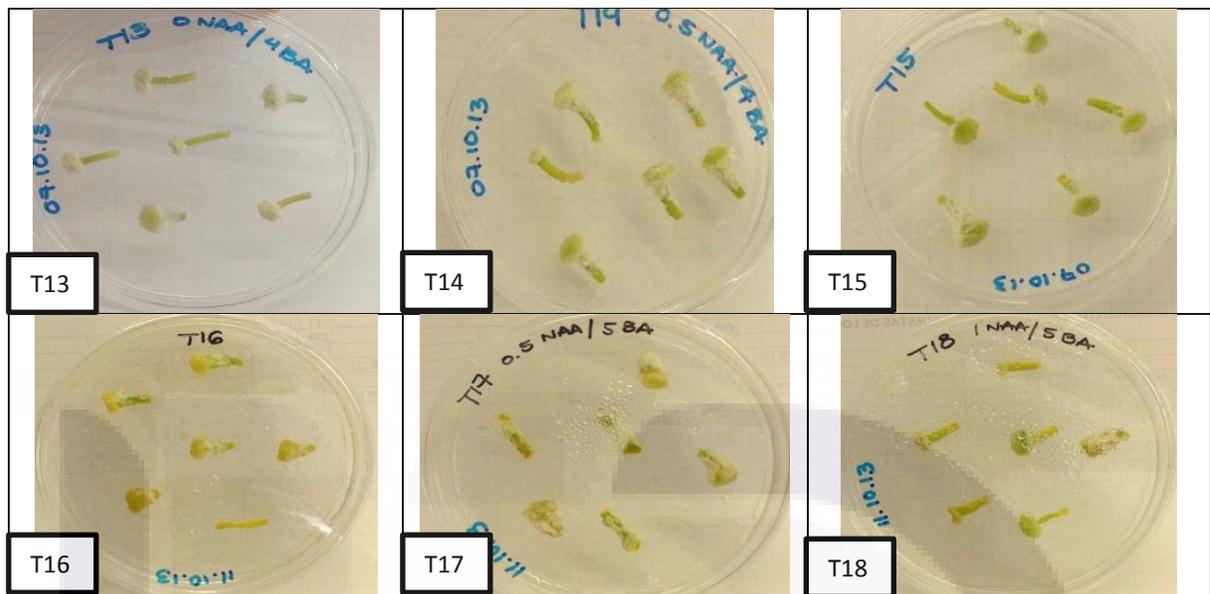


Figura 9. Efecto de la combinación de ácido α -Naftalen acético (ANA) y Benciladenina (BA) en explantes de secciones de hipocotilo de las plántulas de *Moringa oleifera*.

V.6 Análisis de los datos.

Para evaluar la eficiencia de la combinación de Ácido α -Naftalen Acético (ANA) y la beciladenina (BA) a diferentes concentraciones en la inducción de tejido caloso y brotes en explantes de segmentos de hipocotilo de Moringa se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) contemplando 18 tratamientos; cada tratamiento con tres repeticiones, para esto se utilizó STATISTICAL versión 4 como software estadístico. Cuando se detectaron diferencias entre tratamientos se usó la prueba de Fisher LSD ($\alpha \leq 0.05$). Aunque se realizaron mediciones a 11, 18 y 28 días, solamente se analizaron los datos de la primera medición, pues no existió diferencia entre ellas. Los resultados obtenidos muestran que existieron diferencias altamente significativas ($p \leq 0.05$) entre tratamientos (ver Cuadro 1).

Cuadro 1. Análisis de varianzas de la inducción de tejido caloso en explantes de segmentos de hipocotilo de moringa (*Moringa oleifera*) cultivados *in vitro*.

Effect	Univariate Tests of Significance for TC 11 Días (Análisis_Jazmín Muñoz) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Ftest	P_level
Tratamientos	16321.5	17	960.1	2.6276	0.007295
Error	13154.1	36	365.4		

Los resultados obtenidos con el tratamiento control (T1), fueron similares que los expresados en los tratamientos T15 (1 mg/L ANA; 4mg/L BA), T14 (0.5 mg/L ANA; 4mg/L BA) y T18 (1 mg/L ANA; 5mg/L BA), aunque diferentes del resto de los tratamientos ($p \leq 0.05$), cuando se emplearon concentraciones de estos reguladores. El porcentaje de inducción de tejido calloso en explantes inoculados con ANA y BA en concentraciones de 0.5 y 0 mg/L respectivamente; estadísticamente es igual al manifestado con los tratamientos T3, T4, T13, T17, T5 y T6 ($p \geq 0.05$).

El porcentaje de tejido calloso generado en los explantes inoculados con 1 y 2 mg/L de ANA y BA respectivamente es semejante al formado con los tratamientos 7, 8, 10, 11 y 16, aunque diferentes del resto de los tratamientos.

En este sentido, los tratamientos que mejor contribuyeron a la formación de tejido calloso fueron el T14, T15 y T18, mientras que el tratamiento T9, generó tejido calloso en menos del 50 % de los explantes cultivados. (Ver Cuadro 2).

Cuadro 2. Valores promedio del porcentaje de crecimiento de tejido calloso en explantes de moringa (*Moringa oleifera*) cultivados in vitro.

Tratamientos	Concentraciones		Valor promedio del desarrollo de tejido calloso ± Ee
	ANA (mg/L)	BA (mg/L)	
T1	0	0	100.0000±0 a
T2	0.5	0	88.8667±11.13 b
T3	1	0	88.8667±11.13 a b
T4	0	1	83.3333±16.66 a b c
T5	0.5	1	83.3000±0 a b c
T6	1	1	83.3000±0 a b c
T7	0	2	55.5333±5.53 c d
T8	0.5	2	66.6333±9.61 b c d
T9	1	2	49.9333±16.66 d
T10	0	3	55.5333±14.70 c d
T11	0.5	3	49.9667±9.61 d
T12	1	3	66.6333±9.61 b c d
T13	0	4	83.3333±16.66 a b c
T14	0.5	4	100.0000±0 a
T15	1	4	100.0000±0 a
T16	0	5	61.0667±24.23 b c d
T17	0.5	5	83.3000±0 a b c
T18	1	5	100.0000±0 a

Valores medios seguidos de letra distinta indican diferencias estadísticas de acuerdo a la prueba de Fisher LSD ($P_{level} \leq 0.05$)

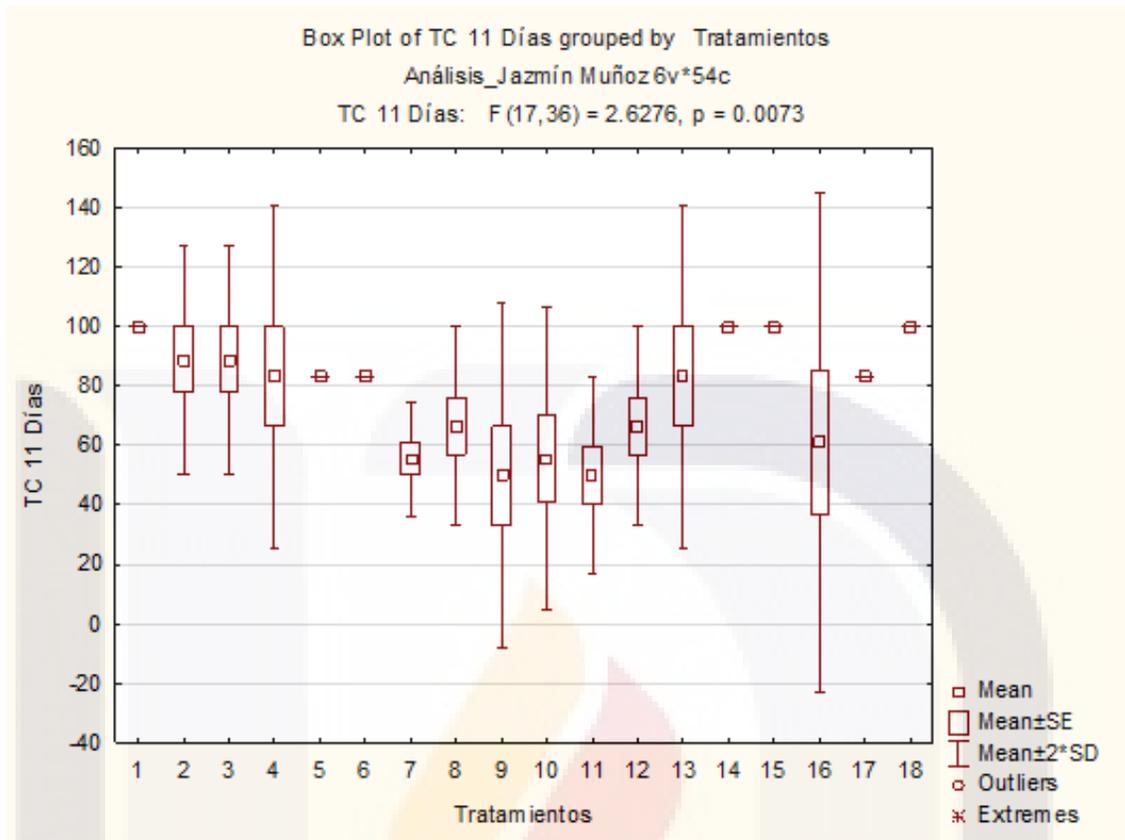


Figura 10. Comparación de valores medios en los tratamientos usados para la inducción de tejido calloso en explantes de *Moringa oleífera*.

V.7 Regeneración in vitro de *Moringa oleífera*.

Los brotes formados de los explantes de segmento de hipocotilo con los tratamientos T10 (0mg/L ANA; 3mg/L BA) y T12 (1mg/L ANA; 3mg/L BA) se transfirieron a frascos de medio de cultivo de 234 ml con medio MS suplementado con la combinación de ANA y BA, corresponden a los mismos tratamientos (T10 y T12). Los brotes respondieron satisfactoriamente a la transferencia, formando nuevos brotes y creciendo sanamente (Fig. 11D y 11H).

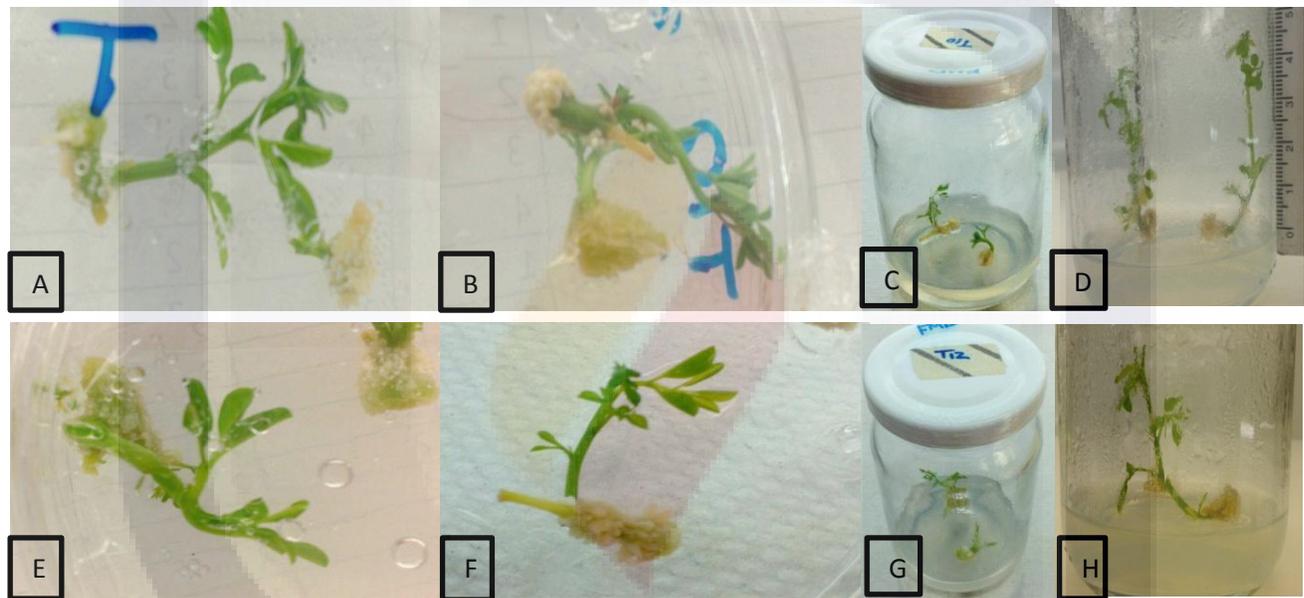


Figura 11. Regeneración de brotes in vitro de moringa. **A y B.** Formación de novo de brotes adventicios en explantes de secciones de hipocotilo en medio MS suplementado con 3 mg/L de BA (Tratamiento 10). **C.** Transferencia de brotes a frascos de 234 ml a los 15 días después de la inoculación (T10). **D.** Elongación de brotes alcanzando una longitud de 4.5 cm. **E y F.** Formación de novo de brotes adventicios en explantes de secciones de hipocotilo en medio MS suplementado con 1 mg/L de ANA y 3 mg/L de BA (Tratamiento 12). **G.** Transferencia de brotes a frascos de 234 ml a los 15 días después de la inoculación (T12). **H.** Elongación de brotes del tratamiento T12.

V.8. Inducción de raíces transformadas *in vitro*.

V.8.1. Expresión del gen reportero *gus*.

El desarrollo de las raíces se pudo apreciar desde los 15 días posteriores al cocultivo de los explantes con la bacteria, observándose la aparición de puntas de raíces en los extremos de los explantes; a los 8 días de haberlos transferido a la luz se observó un número variable de raíces en algunos explantes (Figura 12). Después de 30 días de mantener los explantes en cultivo se realizó un análisis histoquímico para detectar la actividad del producto del gen *gus* en las raíces obtenidas. A las 2 hrs de incubación con la solución de reacción se observó que habían tornado a color azul en algunas zonas de las raíces principalmente en sus extremos, y en otras raíces en su totalidad, como se puede observar en la Figura 13.

De los 73 explantes cocultivados con la bacteria, se repartieron de 10-12 explantes por caja Petri, de los cuales hay una gran variabilidad en los porcentajes de los explantes que produjeron raíces sin embargo aun siendo muy pequeño el porcentaje de explantes (16.6%) o muy alto (80%) la mayoría de las raíces presentaron actividad del gen *gus* (48.1%) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Resultados de la inducción de raíces presuntamente transformadas *in vitro* en explantes de hipocotilo de moringa.

No. De replica	Total de explantes	% de explantes que produjeron raíces.	Promedio de raíces por explante.
1	12	16.6%	2
2	10	50%	2
3	10	0%	0
4	11	27.2%	4
5	10	40%	2
6	10	80%	5
7	10	30%	4

No. De raíces presuntamente transformadas.	% de raíces con actividad GUS.
81	48.1%

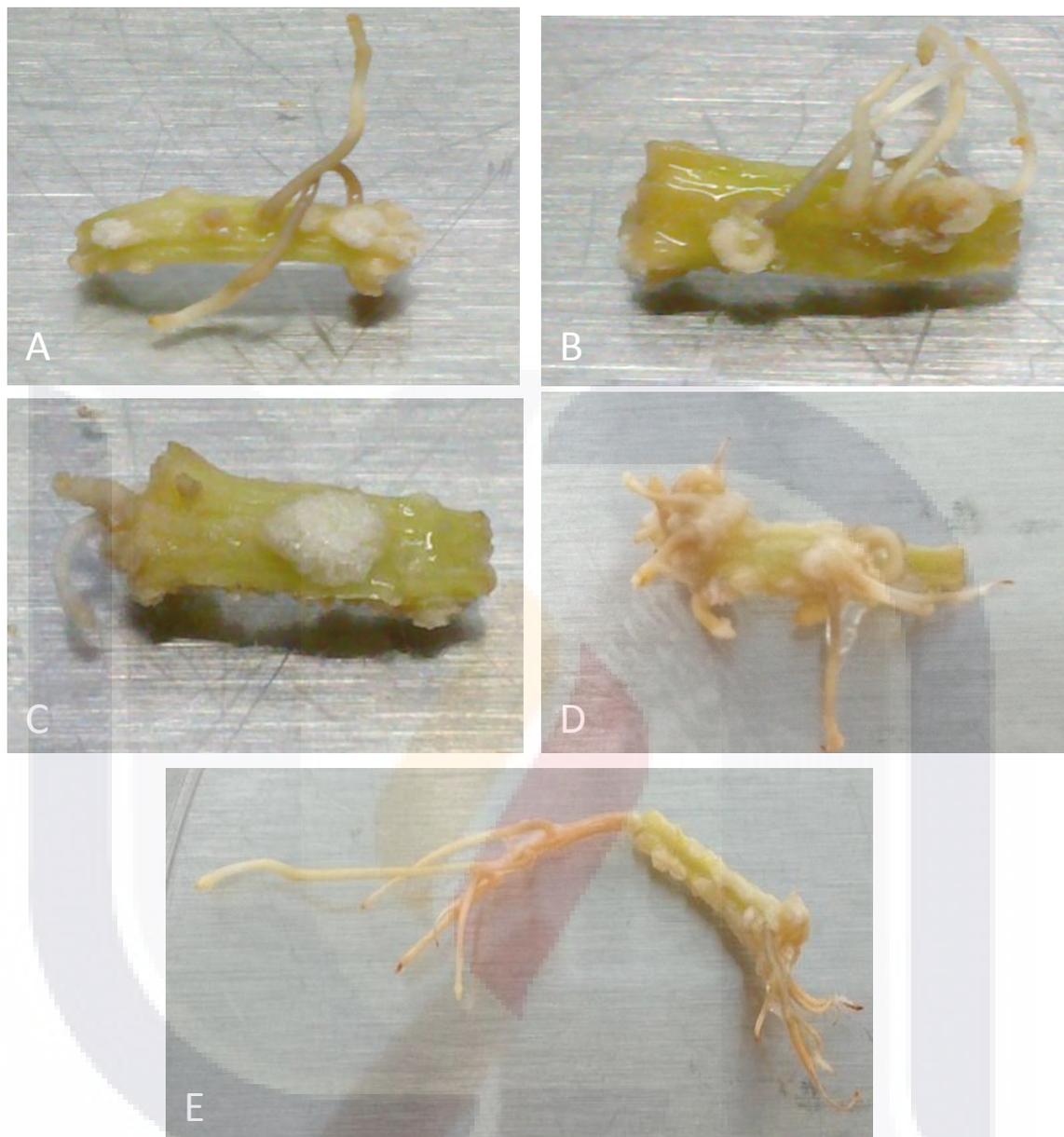


Figura 12. Explantes de hipocotilo de moringa con raíces inducidas *in vitro*. A, B y D) Presencia de raíces a los 28 días después de la infección con *A. rhizogenes*, obsérvese las raíces salientes de la parte transversal del explante y del extremo (C y E).



Figura 13. Expresión del gen reportero GUS en raíces transformadas con *A. rhizogenes* de explantes de hipocotilo de moringa. A-F) Raíces formadas de explantes de hipocotilo de Moringa mostrando la actividad del gen gus (β -glucoronidasa) en las zonas teñidas de color azul detectada por el ensayo histoquímico X-gluc.

V.8.2. Verificación de la presencia de transgenes en raíces transformadas de moringa con *A. rhizogenes*.

V.8.2.1. Amplificación de segmentos de ADN específicos mediante PCR.

Se utilizó el tejido vegetal transformado para la extracción de ADN y posteriormente se realizaron varias pruebas de amplificación para los genes transferidos (*gus*, *nptII*, *rolB*). Cabe mencionar que en las primeras pruebas no se logró amplificar ninguno de los segmentos de ADN relacionados con los genes mencionados. Posteriormente se realizaron re-amplificaciones de los productos de PCR iniciales, donde se logró amplificar algunos de ellos. Sin embargo también se amplificó el segmento de ADN correspondiente al gen *virD*, el cual de acuerdo a la literatura, no se transfiere a las células transformadas ya que solo lo porta la bacteria *A. rhizogenes* (Figura 14).

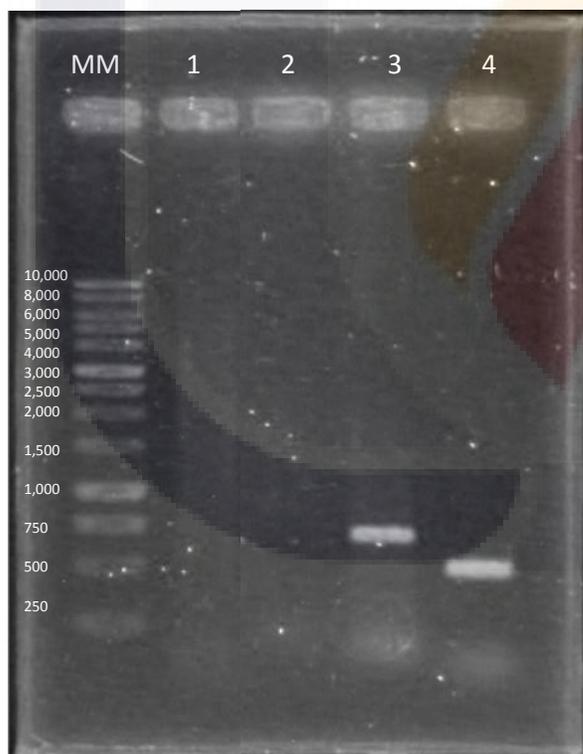


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de las amplificaciones de PCR de los transgenes *rolB*, *nptII*, *gus* y *virD* a partir de ADN de Raíces Transformadas. Carril 1: *rolB* (780 pb) Carril 2: *nptII* (517 pb), Carril 3: *gus* (1200 pb), Carril 4: *virD* (450 pb).

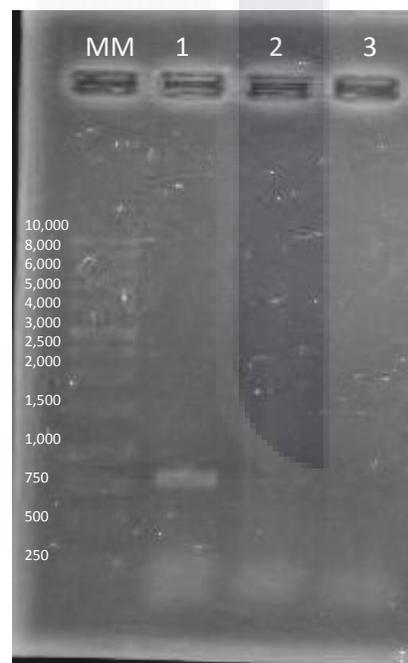


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de las re-amplificaciones de PCR de los transgenes *rolB*, *nptII*, *gus* Carril 1: *rolB* (780 pb) Carril 2: *nptII* (517 pb), Carril 3: *gus* (1200 pb).

En la figura 14 se aprecia sólo 2 bandas, una correspondiente al gen *gus* y la otra al gen *virD*. Al realizar la amplificación del gen *gus* se aprecia una banda de ~700 pb la cual se esperaba un fragmento de 1200 pb, esto altera nuestra demostración de una transformación efectiva ya que en el análisis histoquímico si muestra actividad este gen. La amplificación del gen *virD* muestra que la bacteria aún está presente en los tejidos; por lo tanto la amplificación de este segmento puede ser a partir de la bacteria y no de los tejidos. En la figura 15 se aprecia solo una banda correspondiente al gen *rolB*, el responsable de la estimulación para la formación de raíz e involucrado en la morfología y patrón de crecimiento de las raíces, por lo tanto este hallazgo nos da la pauta de verificar que las raíces obtenidas de explantes de moringa si se obtuvieron por la introducción de una pequeña parte del plásmido Ri al genoma de la planta.

V.9. Transformación mediada por *a. tumefaciens*.

V.9.1. Expresión del gen reportero *gus*.

La formación de brotes se observó a los 16 días después del cocultivo con la bacteria, donde solo algunos explantes presentaban el desarrollo de estos brotes. Se realizaron varias desinfecciones con antibiótico (Cefotaxima 500mg/L) cada semana durante los 25 días que duraron los explantes en cultivo, ya que presentaban contaminación por parte de la bacteria. A los 25 días del cocultivo, se apreciaban los brotes más desarrollados, los cuales fueron removidos de los explantes para su análisis histoquímico de *gus*. Se dejaron incubando 24 hrs con la solución de reacción y se observó que pocos brotes habían tornado a color azul en algunas zonas, como se puede observar en la Figura 16.

Cuadro 4. Porcentaje de brotes transformados de explantes de hipocotilo de moringa.

No. De brotes presuntamente transformadas.	% de brotes con actividad GUS.
16	31.2%

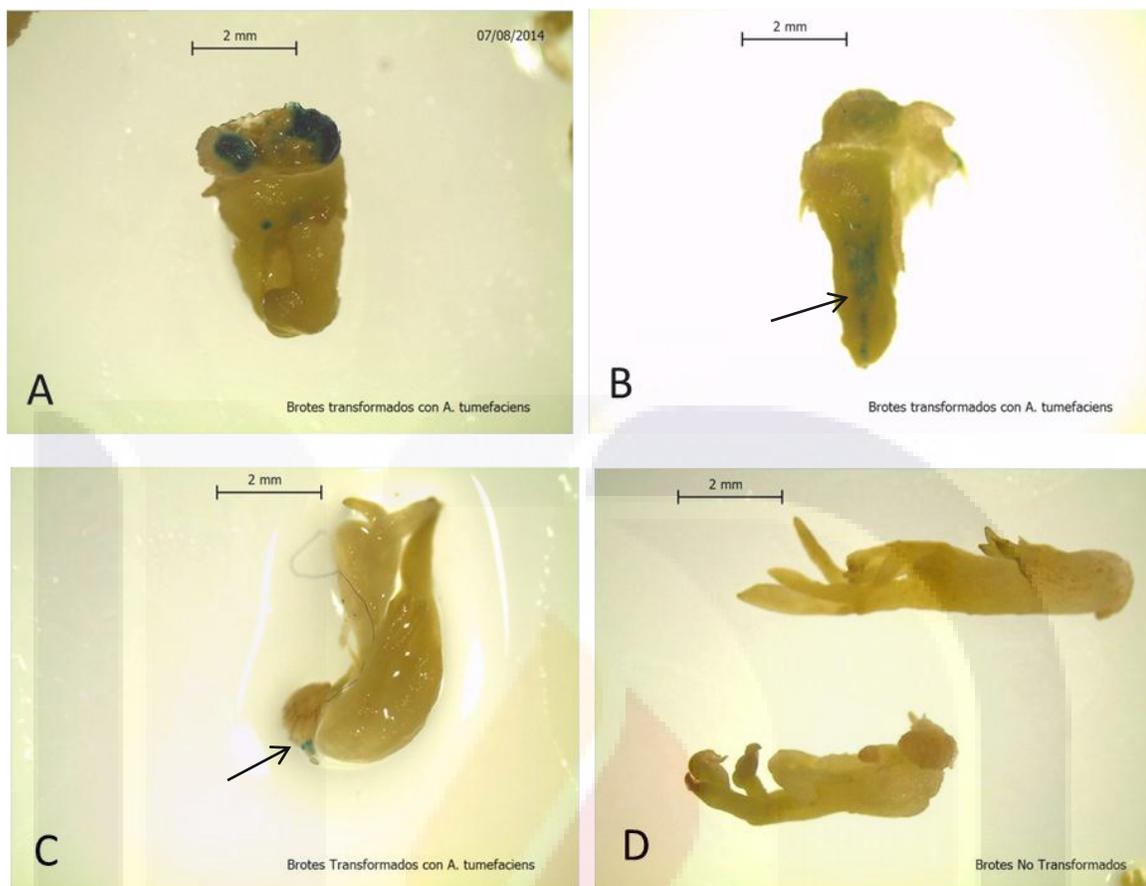


Figura 16. Expresión del gen reportero GUS en brotes transformados con *A. tumefaciens* de explantes de hipocotilo de moringa. A-C) Brotos formados de explantes de hipocotilo de Moringa mostrando la actividad del gen gus (β -glucoronidasa) en las zonas teñidas de color azul detectada por el ensayo histoquímico X-gluc (Fotos tomadas de un microscopio estereoscópico) D) Brotos No transformados, no muestran actividad del gen gus.

V.9.2. Verificación de la presencia de transgenes en brotes transformados de moringa con *A. tumefaciens*.

V.8.2.1. Amplificación de segmentos de ADN específicos mediante PCR.

Se utilizaron los brotes transformados para la extracción de ADN, obteniéndose poco ADN por lo tanto, para las pruebas posteriores no se pudieron realizar con mucha certeza; en las primeras pruebas de amplificación no se logró visualizar en el gel los segmentos de ADN de los genes *gus* y *nptII*. Posteriormente se realizaron re-amplificaciones de los productos de PCR iniciales, pero aun así no se logró amplificar ninguno de ellos.



Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de las amplificaciones de PCR de los transgenes *nptII* y *gus* a partir de ADN aislado de Brotes Transformados. Carril 1: *nptII* (517 pb), Carril 2: *gus* (1200 pb).

V.10. Transformación por bombardeo con microproyectiles.

V.10.1. Curva de Tolerancia al Herbicida.

Para establecer un sistema de transformación es necesario contar con un sistema de selección adecuado que nos permita asegurar la recuperación de las plantas transgénicas, por tal motivo se realizó el ensayo de la susceptibilidad a este herbicida en explantes de hipocotilo de moringa probando las dosis mínimas reportadas para la selección de plantas mono y dicotiledóneas transgénicas utilizando este agente de selección. La tabla 3 muestra los resultados observados durante 20 días de incubación.

Tabla 2. Ensayo de susceptibilidad al Herbicida Finale® en explantes de hipocotilo de moringa.

Tratamiento	Concentración del Herbicida en medio MS	Total de explantes	No. De brotes por explante.	Respuesta de los explantes.
1	0	21	1	Formación de nuevos brotes, 13 explantes con brote, muy elongados.
2	0.5 mg/L	21	1	Formación de nuevos brotes, 6 explantes con brote, con algunos explantes amarillos.
3	1 mg/L	21	1	Formación de nuevos brotes, 5 explantes con brote, brotes muy cortos.
4	1.5 mg/L	21	0	Poca formación de brotes, casi nula, explantes amarillos.
5	2 mg/L	21	0	No hay formación de brotes, decoloración de los explantes.

*Cada tratamiento con 3 réplicas, cada replica con 7 explantes.

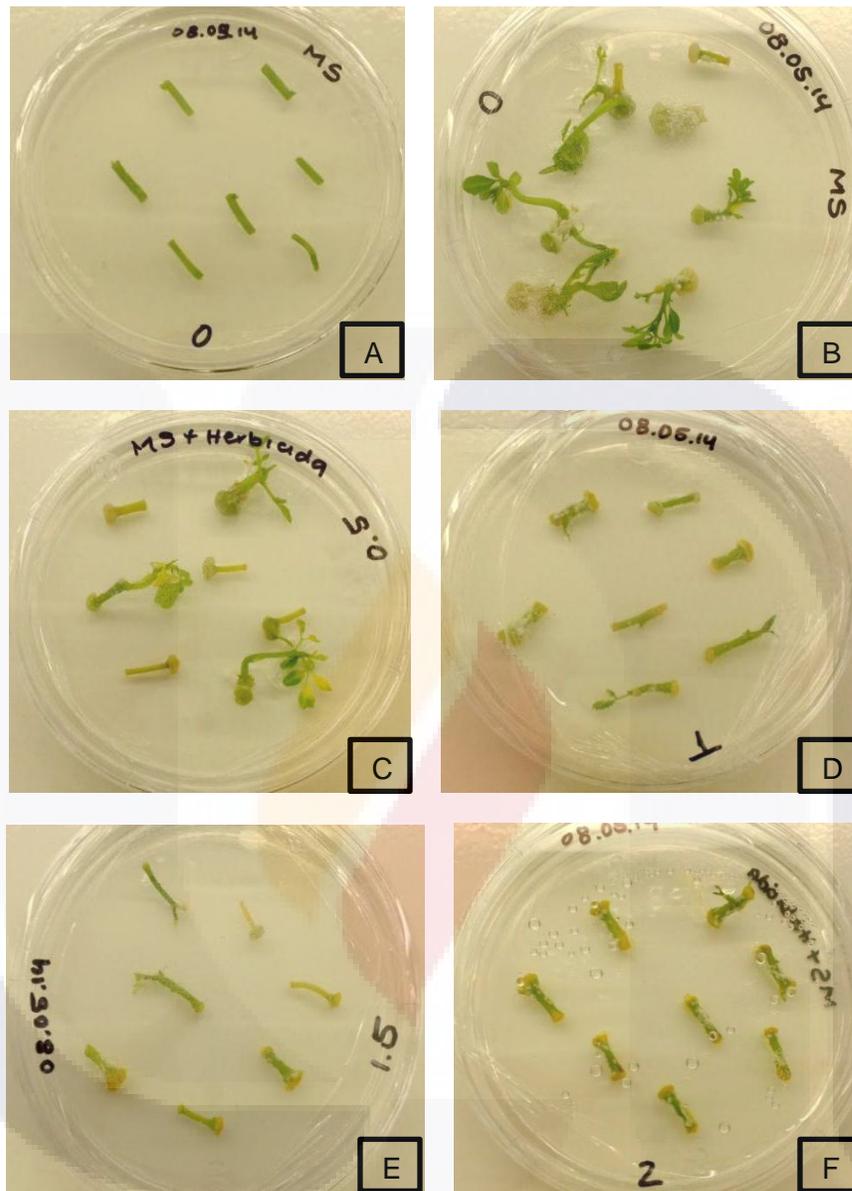


Figura 18. Ensayo de susceptibilidad al Herbicida Finale en explantes de hipocotilo de moringa en medio MS. A) Explantes de hipocotilo en medio MS antes de ser expuestos al herbicida. B) Explantes control de hipocotilo en medio MS. C-D) Explantes de hipocotilo en medio MS adicionado con 0.5 y 1 mg/L de herbicida respectivamente, con formación de nuevos brotes a 21 después de la inoculación, con 1 mg/L de herbicida los brotes generados son más cortos y hay decoloración en los explantes. E-F) Explantes de hipocotilo en medio MS adicionado con 1.5 y 2 mg/L de herbicida respectivamente, no hay formación de brotes, hay cambio de color inducido por el herbicida.

V.10.2. Desarrollo de brotes de explantes bombardeados.

El desarrollo del tejido se observó periódicamente cada semana durante 35 días, a los 8 días de haber sido transferidos los explantes a medio de regeneración adicionado del agente selectivo (Herbicida 2mg/L) y cefotaxima como antibiótico (primeros 15 días), se observó contaminación en algunos explantes los cuales fueron descartados del resto; cabe mencionar que la contaminación se fue eliminando al paso de las semanas ya que se transfirieron a medio nuevo. A pesar de que en este método de transformación físico hay un alto porcentaje de contaminación ya que no todos los consumibles se pueden esterilizar por calor, muy pocos sobreviven a la transformación, por lo cual hay un porcentaje minino de transformantes; en el caso de que los haya.

En nuestras pruebas de bombardeo se lograron rescatar a la mayoría de los explantes sin contaminación. A los 13 días de cultivo se observó la aparición de pequeños brotes principalmente en los tallos bombardeados, siendo más predominantes en los bombardeados a 12cm de distancia y con un disco de ruptura de 1350 psi. En los callos bombardeados se apreciaban menos explantes con brotes en comparación con los tallos. Los brotes de callos bombardeados no hubo formación de nuevos brotes (ver Cuadro 5).

Cuadro 5. Porcentajes de explantes bombardeados de moringa con formación de brotes.

Explante	Condiciones de bombardeo.		
	Distancia (cm) /disco de ruptura (psi)	% de explantes con brotes	No. De brotes por explante.
Tallos	6/900	42.8%	1
	10/900	9.09%	2
	10/1100	41.6%	1
	12/1100	35.7%	2
	12/1350	50%	1
Callos	6/900	11.1%	1
	10/900	0	0
	10/1100	11.1%	1
	12/1100	25%	1
	10/1350	0	0
Brotes de callos	10/900	0	0
	10/1100	0	0

*Cada condición de bombardeo tiene 3 réplicas, cada replica con 10 explantes.

V.10.3. Expresión del gen reportero *gus*.

Los brotes se fueron desarrollando y a los 35 días de cultivo se removieron de los explantes para su análisis histoquímico de *gus*. Los explantes que no se obtuvieron brotes se tomaron parte del mismo explante para su análisis. Los brotes se incubaron a 37°C con la solución de reacción durante 2 hrs y no se observaba ningún cambio de color, por lo cual se dejó incubando 24 hrs. Al término de este tiempo se eliminó la solución de reacción y se lavaron con etanol al 70% para eliminar las clorofilas, cabe destacar que no se observó ningún cambio de color, ni zonas teñidas de azul, no se mostró actividad del gen *gus*, dando una prueba negativa de *gus*; por lo cual se observaron al estereoscopio (Figura 19) y también se verifico por PCR.





Figura 19. Análisis histoquímico de gus de brotes formados de tallos y callos de moringa bombardeados con microproyectiles. A-D) Brotes obtenidos de tallos bombardeados, se observa el tejido vegetal sin tinción, no hay actividad del gen gus. E y F) Brotes de callos bombardeados, se observa el tejido vegetal sin tinción, no hay actividad del gen gus. G y H) Callos bombardeados, se observa el tejido vegetal sin tinción, no hay actividad del gen gus.

V.10.4. Verificación de la presencia de transgenes en explantes bombardeados de moringa.

V.10.4.1. Amplificación de segmentos de ADN específicos mediante PCR.

Se utilizó el tejido vegetal bombardeado para la extracción de ADN y posteriormente se realizaron varias pruebas de amplificación de los genes transferidos, pero solo para el gen *gus* ya que del gen BAR (gen de selección) no se consiguieron los oligos. Cabe mencionar que en las primeras pruebas no se logró amplificar ninguno de los segmentos de ADN relacionados con los genes mencionados (Figura 20).

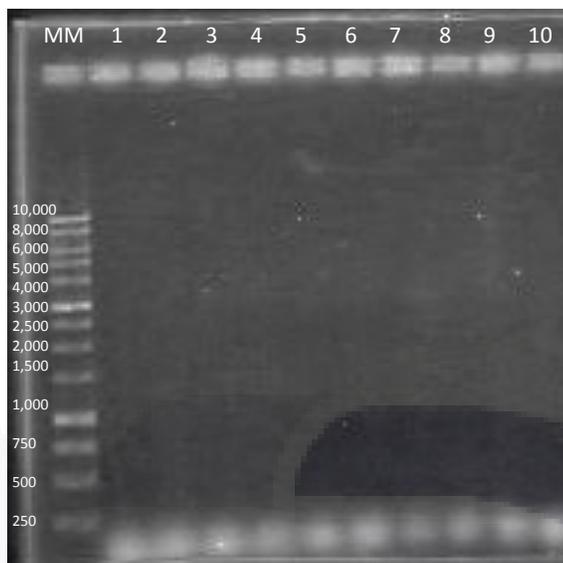


Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de las amplificaciones de PCR del transgen *gus* a partir de ADN aislado de explantes bombardeados. MM: marcador molecular, Carril 1: Tallos 6/900, Carril 2: Tallos 10/900, carril 3: tallos 10/1100, carril 4: 12/1350, carril 5: callos 6/900, carril 6: callos 10/900, carril 7: callos 12/1100, carril 8: callos 10/1350, carril 9: Brotes de callos 10/900, carril 10: brotes de callos 10/1100.

En la figura 20 se puede observar que no hubo amplificación del gen *gus* con los oligos correspondientes. Este estudio se realizó con la finalidad de verificar si a pesar de no expresarse el gen *gus* en el análisis histoquímico pudiera estar presente el gen en el tejido vegetal bombardeado.

VI. DISCUSIONES.

Para llevar a cabo una metodología *in vitro*, se requiere de un sistema de desinfección eficaz que evite la contaminación, por lo tanto se probaron varias técnicas de desinfección modificando las concentraciones y cantidades de los agentes desinfectantes. Se partió de un protocolo ya establecido para otros tipos de material vegetal, sin embargo las semillas de *Moringa oleífera* con la testa removida, e incrementando el tiempo de exposición del etanol al 70% y el cloralex al 15% favoreció a una disminución en la contaminación, y produjo un 80% de germinación a los 8-10 días después de la inoculación (Figura 5).

La utilización del medio basal MS para llevar a cabo la micropropagación de *Moringa*, es una de las formulaciones más empleadas y eficaces en la producción de brotes, lo cual ya ha sido comprobado anteriormente por Stephenson y Fahey (2004) donde probaron seis formulaciones de sales basales con y sin la adición de carbón activado, dando como resultado la mejor formulación para la generación de brotes a partir de meristemos axilares de *M. oleífera*; el medio basal MS y MS al 50% con producción de 9 y 12 brotes en total, respectivamente.

Así mismo, Stephenson y Fahey (2004) también evaluaron distintos reguladores de crecimiento vegetal solos o combinados tales como: Ancimidol, Acido Naftalenacético, Acido giberelico, 6-Bencilaminopurina, Acido Indol-acético, Cinetina, Sulfato de adenina, y Tidiazuron, en un intento por estimular la multiplicación clonal de brotes, desarrollo de los brotes y el establecimiento de la raíz, después de 3 semanas observaron que no había señales de formación de brotes adicionales y el vigor del brote cultivado había declinado rápidamente pero no en el medio control (libre de reguladores), los cuales se mantuvieron verdes, sanos y produjeron una raíz primaria. Teniendo este antecedente, en nuestro trabajo partimos de este hallazgo, en la micropropagación de *Moringa* no se adicionaron reguladores de crecimiento.

La micropropagación de explantes nodales resulto ser muy efectiva, el 80% de los nodos cultivados respondieron con la formación de 2-3 brotes por explante y formación de raíz (Figura 7); así mismo el 90% de los explantes apicales respondieron satisfactoriamente, formando 4-5 secciones internodales y formación de raíces (Figura 6).

Otro método de propagación que se utilizó en este estudio fue el siguiente: a partir de plántulas germinadas, se removió el nodo cotiledonario para probar si el nodo aislado tenía la capacidad de generar nuevos brotes. A los 12 días después de la inoculación y solo en presencia del medio MS, se generaron nuevos brotes; de 2-3 brotes por nodo cotiledonario, estos brotes se elongaron siendo verdes y con nuevas hojas y secciones internodales (Figura 8). Posteriormente se siguió removiendo estos brotes y la mayoría de los nodos seguían generando nuevos brotes. Estos resultados demuestran que no solo a partir de semilla se puede obtener una plántula; el nodo cotiledonario también tiene una alta capacidad de generar una plántula. La generación de nuevos brotes provocada por la escisión repetida de brotes, lo realizaron por primera vez Steinitz, et al. (2009) en tres especies de *Moringa*, observaron que la escisión de brotes adicionales algunas veces estimulaba la aparición de una nueva ola de brotes, sin embargo la producción de brotes gradualmente declinaba con el repetido cultivo hasta que finalmente cesó, de 6-8 semanas desde la primera decapitación. En nuestro caso, se observó una mayor cantidad de brotes con cada poda.

En la regeneración de *Moringa* por organogénesis directa, utilizando la combinación de ANA y BA, se observó que los explantes de hipocotilo respondieron en la formación de tejido calloso en la mayoría de los tratamientos (T2 al T18 excepto el T10, T11, T12), incluyendo el tratamiento control (MS sin reguladores) al término de 28 días de cultivo (Figura 9). La adición de ANA y BA condujo a la formación de callos friables en el extremo del explante que estaban en contacto directo con el medio. Las diferentes concentraciones de reguladores se manifestaron en la formación de callo; a menor concentración de BA (1, 2 y 3 mg/L) favoreció la producción de callo en la totalidad del explante, siendo menos efectivas las concentraciones de 4 y 5 mg/L de BA. La adición de ANA no fue muy eficaz, ya que en ausencia o presencia de esta fitohormona la inducción de tejido calloso en explantes de hipocotilo de moringa se produce con suma rapidez y facilidad, lo cual fue confirmado con el tratamiento control.

La utilización de estas 2 fitohormonas para la regeneración, nos basamos en un estudio realizado por Saini et al. (2012) donde evaluaron el efecto de ANA, BA y Triacantanol en la inducción de múltiples brotes en explantes nodales de *Moringa oleífera*, encontraron que 4.44 μ M de BA era la concentración óptima, con una producción del 90% de respuesta y un promedio de 9 ± 1 de brotes axilares por explante. Adicionando ANA, el porcentaje de respuesta disminuía a 60%. A partir de la concentración óptima, se tomó como la concentración media en nuestro experimento, y se probaron concentraciones de 0-5 mg/L de BA y de 0-1 mg/L de ANA, y observamos que el efecto de BA es mayor, que añadiendo ANA; un resultado muy similar al obtenido por Saini et al. (2012).

La inducción de brotes se observó a una concentración de 3 mg/L de BA, donde el 38.8% de los explantes formaron brotes (Figura 9). La eficiencia de BA para la organogénesis ha sido respaldada por informes similares en otras plantas (Khan et al. 2011, Yapo et al. 2011). Con el fin de obtener la organogénesis *in vitro* de *Moringa sp.*, se han utilizado explantes nodales (Stephenson y Fahey 2004), explantes de tallo de plántulas *in vitro* y plantas cultivadas en el campo, respectivamente.

En la transformación genética de *M. oleífera* se probaron 3 métodos de transformación, de los cuales se utilizaron vectores biológicos (*A. rhizogenes* y *A. tumefaciens*) y un método físico (bombardeo de microproyectiles). En la transformación mediada por *A. rhizogenes*; en la inducción de raíces transformadas *in vitro* se realizaron 3 transformaciones utilizando explantes de hipocotilo y se obtuvo un promedio de los resultados obtenidos. Cabe destacar que en las 3 transformaciones la mayoría de los explantes infectados produjeron raíces en un 50% (Cuadro 3). Las características de estas raíces en *Moringa* presentaron un aspecto blanquecino, alargadas, además de proliferar de manera desorganizada; mostrando características fenotípicas de la raíz pilosa (Nemoto et al. 2009). Cerca del 50% de las raíces presuntamente transformadas, mostraron actividad del gen reportero *gus* (Figura 13). Esta expresión nos permitió visualizar de forma cualitativa a las raíces transformadas y nos dio la pauta de verificar nuestro método de transformación.

El análisis molecular para la presencia de los transgenes, mostró la amplificación del gen *rolB* el cual tiene un papel fundamental en la inducción del síndrome de raíz pilosa (Figura 15) (Nemoto et al. 2009). Sin embargo no se pudo observar la amplificación del gen de selección *nptII*, esto pudo haber sido a dos factores; uno que posiblemente estaban contaminados nuestros oligonucleótidos ya que anteriormente no dieron amplificación y dos debido al poco material de ADN que se contaba fue difícil realizar otra amplificación. No obstante, suponemos que hubo transformación ya que hubo expresión del gen *gus* y que los explantes expuestos en medio de selección con kanamicina sobrevivieron en comparación con el control.

Los brotes desarrollados en los explantes transformados mediante *Agrobacterium tumefaciens*, presentaron características muy peculiares; eran muy cortos, de aspecto verdoso y con algunas hojas demasiado pequeñas que solo se podían visualizar con el estereoscopio. El 31% de los brotes presuntamente transformados, mostraron actividad del gen reportero *gus*; apareciendo puntos azules aislados en los brotes (Figura 16). La amplificación de los transgenes de brotes transformados, tampoco fue exitosa, se extrajo muy poco ADN del tejido vegetal por lo cual se realizaron re-amplificaciones de los productos de PCR iniciales, pero no se logró amplificar ninguno de los transgenes (*nptII* y *gus*) (Figura 17).

Se pueden deducir varios aspectos con respecto a la eficiencia de este método de transformación en Moringa; a) que la planta es muy dócil de transformar utilizando vectores biológicos como lo es *Agrobacterium*, b) el desarrollo del tejido es prácticamente rápido una vez infectado, c) se pueden utilizar varios explantes, como lo es el hipocotilo, hoja y tejido calloso. A lo mejor el porcentaje de brotes transformados es muy bajo, y se podría considerar un método poco eficiente; sin embargo hay que recordar que influyen diversos factores para determinar la eficacia de un sistema de transformación.

Entre ellos podemos mencionar el genotipo de la planta, tipo de explante, medio de cultivo, concentración de acetosiringona, la cepa de *Agrobacterium* y vectores, la densidad celular bacteriana y las condiciones de inoculación y cocultivo, para que se pueda dar la transferencia de T-ADN (Amoah et al. 2001).

Los niveles óptimos de cada uno de estos elementos son necesarios que sean determinados para cada sistema de transformación. Los efectos de estos factores en la entrega y expresión transitoria del gen *uidA* al tejido vegetal deben ser evaluados para determinar la eficacia de un sistema de transformación.

Actualmente no hay reportes sobre la transformación genética de *Moringa sp.*, de ningún sistema de transformación, es por esto que se propuso aplicar métodos de transformación utilizando vectores biológicos como lo es *Agrobacterium* que es ampliamente utilizado en la transferencia de genes en plantas. Nuestros resultados demostraron que la planta de Moringa es muy factible de transformar, aun utilizando protocolos ya establecidos por otras especies de plantas, como lo fue el protocolo de transformación con *A. rhizogenes*, el cual sus condiciones están optimizadas para cactáceas. Sin embargo, se observó un alto porcentaje en producción de raíces por explante, al igual que la mayoría de estas raíces presentaron actividad del gen reportero *gus*. Se conoce que la inducción de raíces transformadas es con la finalidad de obtener metabolitos secundarios de los cuales se obtengan múltiples beneficios; al realizarlo en moringa se incrementa la posibilidad de obtener estos beneficios ya que esta planta es reconocida por sus propiedades farmacológicas. No obstante, la eficiencia de cualquier método siempre se basa en mejorar las condiciones del mismo para cada especie de planta.

En la transformación genética por bombardeo con microproyectiles o biolística se utilizaron 3 tipos de explante; tallos, callos y brotes de callos. De los cuales, los tallos fueron el mejor explante por tener mayor desarrollo de brotes (50%), también se probaron diferentes condiciones de bombardeo; resultando más eficaz, los disparos a 12cm de distancia y con un disco de ruptura de 1350 psi en explantes de tallo, mientras que en callos el más eficaz fue con disparos a 12 cm de distancia y con un disco de ruptura a 1100 psi, obteniendo un 25 % de los explantes con brotes (Cuadro 5). Cabe mencionar que las condiciones de bombardeo se eligieron al azar; sin tener un antecedente previo, ya que esta planta de moringa no había sido probada con este sistema de transformación. Sin embargo se tomaron en cuenta otras condiciones ya establecidas para las plantas del orden de las *Brassicales* (Liu et al. 2001); son la familia más cercanamente emparentada con las *Moringáceas*.

En general no se observó una tendencia sobre si era mejor a menor o mayor distancia, o a menor o mayor disco de ruptura. A menor distancia, el disparo era muy cerca y los explantes se salían del medio y esos explantes ya no se podían recuperar, porque podría haber contaminación. A mayor distancia, el disparo era mejor, los explantes permanecían en su medio y resultaban menos dañados. El disco de ruptura es el que determina la presión a la cual sale el disparo, a menor presión posiblemente las partículas de oro no logran llegar a la célula vegetal; y a mayor presión probablemente las partículas van muy aceleradas y logran penetrar a la célula vegetal, esto sería algo hipotético; sin embargo nuestros resultados demuestran que vario mucho los porcentajes con respecto a las condiciones de bombardeo.

Se han utilizado diferentes vectores para este método, pero una de las construcciones más ampliamente usadas en biolística es el vector pAHC25 por tener un gen de selección (BAR) muy eficaz en la estrategia de recuperación de transformantes y un gen reportero (*gus*) para visualizar la expresión del gen, además de poseer el promotor de la ubiquitina *Ubi1* que es más activo que el promotor CaMV 35S (Christensen y Quail, 1996). Es por esto que se decidió trabajar con él, además de que este plásmido ha sido utilizado particularmente en transformaciones de plantas monocotiledóneas, como lo son los cereales que originalmente eran considerados fuera del rango de hospederos por *A. tumefaciens* (Melchiorre et al. 2002).

El análisis histoquímico de *gus* reveló que los explantes de moringa bombardeados no fueron transformados, ya que no hubo actividad o expresión del gen *gus*. Existen varias posibilidades por las cuales probablemente no se logró la transformación; en primer lugar el plásmido pAHC25 es un vector dirigido al núcleo, al entrar a la célula vegetal se encuentra con una región homologa del cloroplasto y las enzimas se encargan de integrar este plásmido, no al genoma de la planta, por lo tanto al crecer la planta o regenerarse no hay transferencia de genes.

Otra cuestión que es necesario evaluar es el alcance de la penetración de las partículas en las células vegetales que puede ser controlada variando la intensidad del estallido, alterando la distancia que las partículas han de atravesar para alcanzar la célula o utilizando partículas de diferentes tamaños.

No obstante, algunos tejidos oponen una resistencia natural a la penetración de las partículas, dada por cutículas endurecidas, paredes celulares lignificadas o superficies vellosas. Sin embargo, los principales limitantes del método continúan siendo la baja relación entre el total de células sometidas al bombardeo y el número de células que logran incorporar de manera permanente la información genética transferida. (Cita).



VII. CONCLUSIONES.

La propagación de *Moringa oleifera* reveló que ambos explantes; ápices y nodos tienen una alta capacidad de generar nuevos brotes así como su sistema radical y originar una planta completa. La manifestación de esta capacidad se logró sin la estimulación exógena de reguladores de crecimiento.

La transformación genética mediante los 3 métodos propuestos (*A. tumefaciens*, *A. rhizogenes* y bombardeo) en explantes de Moringa; se observó que la planta se adapta rápidamente a las condiciones del sistema de transformación, la capacidad del explante principalmente de hipocotilo presenta gran tolerancia a la manipulación y a la supervivencia después de la transformación, al contrario de las hojas. De los 3 métodos, la transformación mediada por *A. rhizogenes* resultó ser el sistema más eficaz hasta el momento, obteniendo un 48% de raíces transformadas, de un total de 81 raíces, mientras que con la transformación mediante *A. tumefaciens* el número de brotes obtenidos fue de 31% de brotes con expresión del gen *gus*. Para el sistema por bombardeo se necesita realizar más ensayos con diferentes explantes o con un vector diferente.

Nuestro estudio demostró lo factible que es trabajar con esta planta de Moringa, en propagación, regeneración y transformación; aunque en cada uno de los procedimientos hubo limitantes y diversos factores que hay que seguir evaluando en próximas investigaciones.

VIII. GLOSARIO.

Auxinas: son un grupo de compuestos derivados del triptofano, sintetizados por lo general en los ápices, y que están implicados en varios eventos relacionados con el crecimiento y diferenciación celular. Participan en la regulación de algunos procesos que ocurren en los tejidos vegetales como el crecimiento celular, la acidificación de la pared celular, el inicio de la división celular, la formación de tejidos no diferenciados (tejido calloso), la diferenciación del tejido vascular y la formación de órganos (raíces).

Citocininas: son derivados de la adenina y son sintetizadas en tejidos vegetales jóvenes y raíces. Son muy útiles en cultivos *in vitro* ya que estimulan la división celular y rompen la latencia de las yemas axilares haciéndolas brotar. Junto con las auxinas, las citocininas regulan la división celular.

Explante: es cualquier órgano, tejido o segmento de tejido vegetal que va a ser utilizado para iniciar el cultivo. Puede ser una semilla, un embrión aislado, un segmento de hoja, de tallo, de cotiledón, de raíz o de órganos reproductores entre otros. Cualquier segmento de tejido vegetal que contenga células vivas puede ser utilizado como explante.

Fitoquímicos: Sustancias que se encuentran en los alimentos de origen vegetal, biológicamente activas, no son nutrientes esenciales para la vida, pero tienen efectos positivos en la salud.

Glabro: (del latín glaber; calvo) No presenta pelos, tricomas o estructuras similares en su superficie externa.

Hipocotilo: es el primer órgano de expansión de la plántula, y se desarrolla hasta formar su tallo.

Inflorescencia: Disposición de las flores sobre las ramas o la extremidad del tallo, su límite está determinada por una hoja normal.

Medio de cultivo: Preparación artificial que contiene todos los elementos necesarios para mantener vivo al tejido vegetal, más aquellos elementos que lo llevarán a responder de la manera esperada al cultivo *in vitro*.

Micropropagación: el conjunto de técnicas y métodos de cultivo de tejidos utilizados para multiplicar plantas asexualmente en forma rápida, eficiente y en grandes cantidades.

Organogénesis: es una vía de regeneración de plantas *in vitro*, parte de tejidos no meristemáticos y se requiere un proceso de dediferenciación y rediferenciación de los tejidos. Es la formación de novo de órganos en los explantes cultivados, los órganos que se pueden formar son las raíces o brotes adventicios.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): es una técnica de biología molecular desarrollada en 1986 por Kary Mullis, esta técnica sirve para amplificar un fragmento de ADN; el objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN en particular, su utilidad es que tras la amplificación resulta mucho más fácil identificar con una muy alta probabilidad, virus, bacterias, plantas, etc.

Reguladores de crecimiento vegetal (RCV): también conocidos como hormonas vegetales o fitohormonas. Son compuestos orgánicos sintetizados por la propia planta, que en muy pequeñas cantidades alteran el crecimiento o los patrones de desarrollo de los tejidos vegetales. También se conocen compuestos sintéticos que tienen actividad similar a los RCV.

Tejido calloso: Masa amorfa de células vegetales poco diferenciadas y de rápida proliferación.

Transgen: es un gen que se moviliza o se transfiere entre dos organismos distintos o líneas de una manera que no sea la reproducción sexual. Las causas naturales de dichas transferencias, se denominan transferencia lateral u horizontal, incluyen transportar los genes por medio de virus o bacteria que pueden transferir el ADN entre distintas especies.

IX. BIBLIOGRAFIA.

Agrodesierto. 2006. Moringa (*Moringa oleifera*). Programas Agroforestales. Consulta en internet. <http://www.agrodesierto.com/>

Alfaro V. y N. Martínez W. 2007. Informe proyecto Rendimiento y uso potencial de *Moringa oleifera* Lam en la producción de alimentos de alto valor nutritivo para su utilización en comunidades de alta vulnerabilidad alimentario-nutricional de Guatemala. Proyecto FODECYT No. 26-2006.

Amoah B.K., Wu H., Sparks C. y Jones H.D. 2001. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transient expression of *uidA* in wheat inflorescence tissue. *Journal of Experimental Botany*. 52 (358): 1135-1142 pp.

Batra, S. y Kumar S. 2003. *Agrobacterium*-mediated transient *GUS* gene expression in buffel grass (*Cenchrus ciliaris* L.) *J. Appl. Genet.* 44(4): 449-458

Bennett, R.N., Mellon F.A., Foidl N., Pratt J.H., DuPont M.S., Perkins L. y Kroon P.A. 2003. Profiling glucosinolates and phenolics in vegetative and reproductive tissues of the multi-purpose trees *Moringa oleifera* L. (Horseradish tree) and *Moringa stenopetala* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 3546-3553.

Bharali, R., Tabassum J., Azad M.R. 2003. Chemomodulatory effect of *Moringa oleifera*, Lam, on hepatic carcinogen metabolising enzymes, antioxidant parameters and skin papilloma genesis in mice. *Asian Pac J Cancer Prev* 4(2):131–139

Cheenpracha, S., Park E.J., Yoshida W.Y., Barit C., Wall M., Pezzuto J.M., Chang L.C. 2010. Potential anti-inflammatory phenolic glycosides from the medicinal plant *Moringa oleifera* fruits. *Bioorg Med Chem* 18(17):6598–6602

Christensen A.H., Quial P.H. 1996. Ubiquitin promoter-vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Research* 5:213-218.

Chumark, P., Khunawat P., Sanvarinda Y., Phornchirasilp S., Morales N.P., Phivthong-Ngam L., Ratanachamnong P., Srisawat S., Pongrapeeporn K.U. 2008. The in vitro and ex vivo antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam. leaves. *J Ethnopharmacol* 116(3):439–446

Das, B.R., Kurup P.A., Narasimha Rao P.L. 1957. Antibiotic principle from *Moringa pterygosperma* Part VII. Anti-bacterial activity and chemical structure of compounds related to pterygospermin. *Indian J Med Res* 45:191–196

Debnath, S.C. 2009. Characteristics of strawberry plants propagated by in vitro bioreactor culture and ex vitro propagation method. *Eng Life Sci* 9:239–246

Departamento de Agricultura de EE.UU., Servicio de Investigación Agrícola. 2010. USDA Base de Datos Nacional de Nutrientes para Referencia Estándar, Versión 23.

Duangjai, A., Ingkaninan K., Limpeanchob N. 2010. Potential mechanisms of hypocholesterolaemic effect of Thai spices/dietary extracts. *Nat. Prod. Res.* 8:1-12

Eilert, U., Wolters B., Nahrstedt A. 1981. The antibiotic principle of seeds of *Moringa oleifera* and *Moringa stenopetala*. *Planta Med* 42(5):55–61

Fahey, J. W. 2005. *Moringa oleifera*: A Review of the Medical Evidence for Its Nutritional, Therapeutic, and Prophylactic Properties. Part 1. *Trees for Life Journal* 1:5

Fahey, J.W., Zalcmann A.T., y Talalay P. 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56(1): 5-51. [corrigendum: *Phytochemistry* 59: 237].

Faisal, M. y Anis M. 2006. Thidiazuron induced high frequency axillary shoot multiplication in *Psoralea corylifolia*. *Biol Plantarum* 50:437–440

Fuglie, L.J. 1999. *The Miracle Tree: Moringa oleifera: Natural Nutrition for the Tropics*. Church World Service, Dakar. 68 pp.; revised in 2001 and published as *The Miracle Tree: The Multiple Attributes of Moringa*, 172 pp.

Ghasi, S., Nwobodo E., Ofili J.O. 2000. Hypocholesterolemic effects of crude extract of leaf of *Moringa oleifera* Lam in high-fat diet fed wistar rats. *J Ethnopharmacol* 69 (1):21-25

Gopalan, G., Rama Sastri B.V., Balasubramanian S.C. 2002. Nutritive value of indian foods. National Institute of Nutrition. Indian Council of Medical Research, Hyderabad

Guevara, A.P., Vargas C., Sakurai H., Fujiwara Y., Hashimoto K., Maoka T., Kozuka M., Ito Y., Tokuda H., Nishino H. 1999. An antitumor promoter from *Moringa oleifera* Lam. *Mutat Res* 440(2):181–188

Jefferson, R.A. 1989. The Gus reporter gene system. *Nature*. 342:837-838

Khan H., Siddique I., Anis M., Khan P. 2011. In vitro organogenesis from internode derived callus cultures of *Capsicum annum* L. *J Plant Biochem Biotechnol* 20:84–89

Lim, T.K. 2012. *Moringa oleifera*: Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants. 3:453-455

Liu, C.W., Lin C.C., Chen J.J.W. y Tseng M.J. 2001. Stable chloroplast transformation in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.) by particle bombardment. *Plant Cell Rep* 26: 1733-1744.

Mahajan, S.G. y Mehta A.A. 2011. Suppression of ovalbumin- induced Th2-driven airway inflammation by β -sitosterol in a guinea pig model of asthma. *Eur J Pharmacol* 650(1):458–464

Melchiorre, M. N., Lascano, H. R. y Trippi V.S. 2002. Transgenic wheat plants resistant to herbicide BASTA obtained by microprojectile bombardment. *Biocell* 26(2): 217-223.

Muluvi G.M., Sprent J.I., Soranzo N., Provan J., Odee D., Folkard G., McNicol J.W., Powell W. 1999. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) analysis of genetic variation in *Moringa oleifera* Lam. *Mol Ecol* 8:463–470.

Nambiar, V. S. y S. Seshadri. 2001. Bioavailability trials of b-carotene from fresh and dehydrated drumstick leaves (*Moringa oleifera*) in a rat model. *Plant Foods for Human Nutrition* 56:83-95.

Nemoto K., Hara M., Suzuki M., Seki H., Oka A., Muranaka T. y Mano Y. 2009. Function of the *aux* and *rol* genes of the Ri plasmid in plant cell division in vitro. *Plant Signaling & Behavior* 4:12, 1145-1147.

Nepolean, P., Anitha J., Renitta R.E. 2009. Isolation, analysis and identification of phytochemicals of antimicrobial activity of *Moringa oleifera* Lam. *Curr Biotica* 3(1):33–38

Oduro I, Ellis W.O., Owusu D. 2008. Nutritional potential of two leafy vegetables: *Moringa oleifera* and *Ipomoea batatas* leaves. *Sci Res Essay* 3(2):57–60

Olson, M. E. y S. Carlquist. 2001. Stem and root anatomical correlations with life form diversity, ecology, and systematics in *Moringa* (Moringaceae). *Botanical Journal of the Linnaean Society* 135:315-348.

Panda, D.S., Choudhury N.S., Yedukondalu M., Si S., Gupta R. 2008. Evaluation of gum of *Moringa oleifera* as a binder and release retardant in tablet formulation. *Indian J Pharm Sci* 70(5):614–618

Powell, W. A., Maynard C., Boyle B., and Séguin A. 2006. Fungal and Bacterial Resistance in Transgenic Tree. In: *Tree Transgenesis* 235-252 pp.

Saini R. K., Shetty, N. P., Giridhar P. y Ravishankar G. A. 2012. Rapid in vitro regeneration method for *Moringa oleifera* and performance evaluation of field grown nutritionally enriched tissue cultured plants. *Biotech* 2:187–192.

Sasikala, V., Rooban B.N., Priya S.G., Sahasranamam V., Abraham A. 2010. *Moringa oleifera* prevents selenite induced cataractogenesis in rat pups. *J Ocul Pharmacol Ther* 26(5):441–447

Singh B.N., Singh B.R., Singh R.L., Prakash D., Dhakarey R., Upadhyay G., Singh H.B. 2009. Oxidative DNA damage protective activity, antioxidant and anti-quorum sensing potentials of *Moringa oleifera*. *Food Chem Toxicol* 47(6):1109–1116

Sreelatha, S. y Padma P.R. 2009. Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* leaves in two stages of maturity. *Plant Foods Hum Nutr* 64(4):303–311

Stephenson, K. K. y J. W. Fahey. 2004. Development of tissue culture methods for the rescue and propagation of endangered *Moringa* spp. germplasm. *Economic Botany* 58:s116-s124.

Steinitz, B., Tabib Y., Gaba V., Gefen T., Vaknin Y. 2009. Vegetative micro-cloning to sustain biodiversity of threatened *Moringa* species. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 45:65–71

Tee, E.S., Noor M.I., Azudin M.N., Idris K. 1997. Nutrient composition of Malaysian foods, 4th edn. Institute for Medical Research. Kuala Lumpur. 299 pp.

Villaseñor, I.M., Finch P., Lim-Sylianco C.Y., Dayrit F. 1989a. Structure of a mutagen from roasted seeds of *Moringa oleifera*. *Carcinogenesis* 10:1085–1087

Villaseñor, I.M., Lim-Sylianco C.Y., Dayrit F. 1989b. Mutagens from roasted seeds of *Moringa oleifera*. *Mutat Res.* 224 (2) :209-212

Yang R.Y., Lin S., Kuo G. 2008 Content and distribution of flavonoids among 91 edible plant species. *Asia Pac J Clin Nutr* 17(S1):275–279

Yapo E., Kouakou T., Kone M., Kouadio J., Kouame P., Merillon J.M.2011. Regeneration of pineapple (*Ananas comosus* L.) plant through somatic embryogenesis. *J Plant Biochem Biotechnol* 20:196–204

X. ANEXOS.

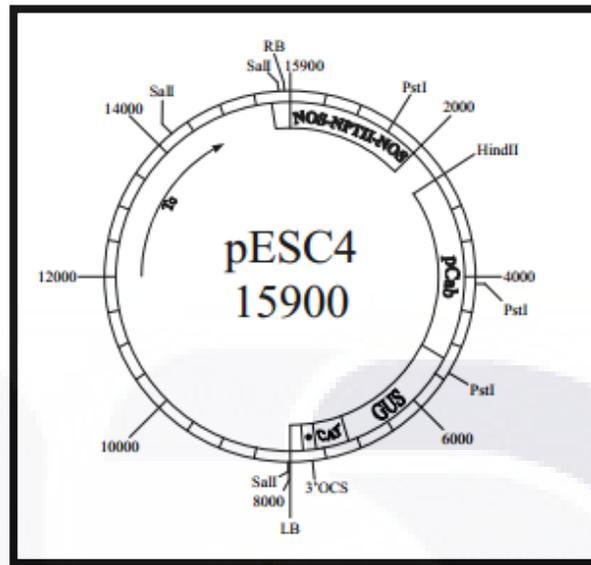
Anexo A. Representación esquemática del plásmido ESC4 que contiene los genes: *nptII* que codifica para la resistencia a la kanamicina y el gen *gus* que codifica para la enzima β -glucoronidasa.

Anexo B. Contenido del medio de cultivo para bacterias YM.

Anexo C. Representación esquemática del vector pBI121.

Anexo D. Ficha técnica del Herbicida Finale.

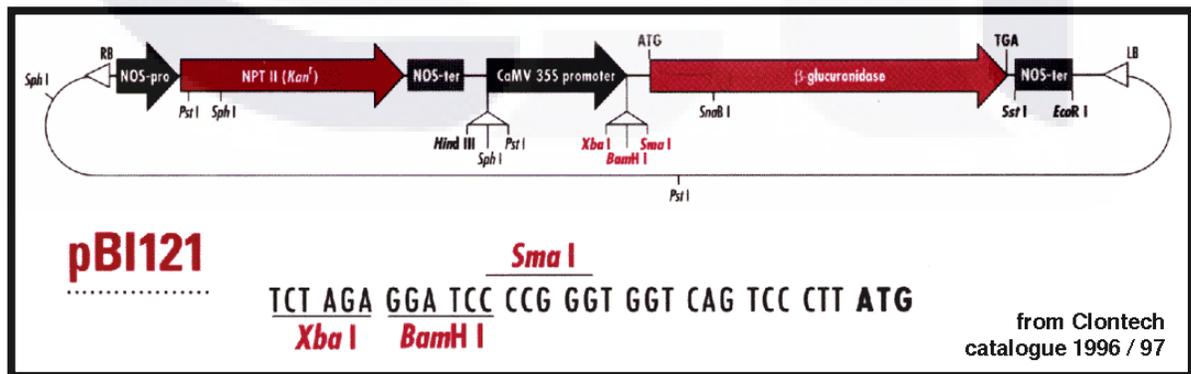




Anexo A. Representación esquemática del plásmido ESC4 que contiene los genes: *nptII* que codifica para la resistencia a la kanamicina y el gen *gus* que codifica para la enzima β-glucuronidasa.

- Manitol.....10gr./L
- MgSO₄.....0.2gr./L
- K₂HPO₄.....0.5gr./L
- Extracto de levadura.....0.4gr./L
- NaCl.....0.1gr./L

Anexo B. Contenido del medio de cultivo para bacterias YM.



Anexo C. Representación esquemática del vector pBI121.

Finale®

DATOS GENERALES DEL PRODUCTO

Nombre común / ingrediente activo:
GLUFOSINATO DE AMONIO

Clase química:
SAL DE AMONIO

Formulación y concentración:
SOLUCIÓN ACUOSA; 13.5 % (150 g i.a./L)

Categoría toxicológica:
Ligeramente tóxico (IV) / Banda Verde

No. de Registro:
RSCO-HEDE-0231-304-013-014

Modo de acción:
Es un producto que actúa sobre partes verdes, inhibiendo la síntesis de glutamino sintetasa (enzima esencial en el metabolismo del Nitrógeno), lo que conlleva a la acumulación e intoxicación por altos niveles de amonio y además afecta el metabolismo de proteínas al no poder sintetizarse el aminoácido glutamina.

Sistemicidad:

Sistémico	Contacto	Translaminar
X	X	

Características biológicas:
HERBICIDA.
De amplio espectro.
Excelente control de correhuelas.
Periodo de control mayor que desecantes comunes.
No tiene acción sobre el suelo y no tiene actividad residual.

USOS

Cultivo	Problema		Dosis/ha	Intervalo de Seguridad	Tolerancia EPA (ppm)	Observaciones
	Nombre común	Nombre científico				
Banano	Cadillo	Xanthium spinosus	1.0 – 3.0 L		0.3	
	Fior blanca	Parthenium hysterophorus				
	Z. cola de zorra	Leptochloa uninervia				
Maiz	Z. pinto	Echinochloa colonum	1.0 – 2.0 L	70	0.2	Aplicación dirigida a las malezas
	Acahual o flor amarilla	Melampodium perfoliatum				
	Vergonzosa	Mimosa pudica				
	Frijolillo	Casia tora				
	Z. de año	Panicum fasciculatum				
	Quelle	Amaranthus hybridus				
	Malva o escobilla	Malvastrum coromandelianum				
Manto o bejuco morado	Ipomoea purpurea					

Anexo D. Ficha técnica del Herbicida Finale.