

DETERMINACIÓN DE LA FASE DE CRECIMIENTO ÓPTIMA PARA LA TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE CALLOS DE HIPOCOTILOS DE ACHIOTE (*Bixa orellana* L.) CON EL GEN REPORTERO *gusA* VÍA *Agrobacterium tumefaciens*.

Juan Manuel Zaldívar Cruz, Elidé Avilés Berzunza y Gregorio Godoy Hernández*.

Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas

Centro de Investigación Científica de Yucatán,

Calle 43 No. 130. Col. Chuburná de Hidalgo. Apdo. Postal 87, Cordemex 97310, Mérida, Yucatán,

México. *Correo electrónico: ggodoy@cicy.mx

Palabras clave: *Bixa orellana* L., transformación, callos, expresión transitoria de GUS.

Introducción. El achiote (*Bixa orellana* L.) es una planta originaria de América tropical, apreciada por producir en la cubierta de sus semillas el pigmento conocido como bixina (1). Este compuesto es un apocarotenoide empleado en la industria alimentaria como colorante en mantequillas, quesos, helados, yogurt, bebidas, postres, etc. y en productos dedicados al cuidado del cuerpo. La especie crece desde México hasta Brasil y actualmente es cultivada en diversas partes del mundo (2). A nivel mundial, Perú es el principal productor de semillas de achiote (35% del total) y los Estados Unidos el principal consumidor (33%). En 1993 se reportaron un consumo mundial de 10,650 toneladas métricas (3). En nuestro país y principalmente en la Península de Yucatán, las plantaciones de achiote son muy heterogéneas, ya que no existen programas de fitomejoramiento y se carece de plantaciones dedicadas a la producción de semillas con altos contenidos de bixina. Una alternativa para suplir esta carencia sería el uso de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales asociadas con las de la Ingeniería Genética para introducirle nuevas características a esta especie.

El objetivo de este trabajo consiste en determinar la edad óptima en la que los callos de la variedad criolla de achiote son más susceptibles a mayores eventos de transformación con el gen reportero *gusA*, vía *Agrobacterium tumefaciens*.

Metodología. Se utilizó la cepa LBA4404 (tipo octopina), de *A. tumefaciens*. La cepa fue transformada con el plásmido pCAMBIA 2301 utilizando el método congelamiento-descongelamiento. Todos los medios de cultivo empleados tuvieron como base al medio PC (4). El medio de cocultivo fue suplementado con 1 mg/L 6-Bencilaminopurina (BAP) y 1 mg/L Ácido Naftalenacético (ANA) incubándose durante 72h. El medio de selección contenía 2.5 mg/L de kanamicina y 100 mg/L de cefotaxima. Se utilizaron 0.5 g de callos de la variedad criolla de achiote de 120 días de edad, que fueron transformados después de sembrarse a los 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 y 20 días con la cepa, y se incubaron a 25 ± 2 °C bajo luz continua. La tinción

histoquímica de GUS en los callos transformados y sus controles se realizaron a los 3 días de la infección.

Resultados y Discusión.

La evaluación de los callos con la prueba histoquímica de GUS indica que los callos de achiote son más susceptibles a la transformación con el gen reportero *gusA*, vía *Agrobacterium tumefaciens* entre el segundo y quinto día de edad. Mientras que en los demás días se encontraron menos áreas azules o estaban ausentes. Para otras especies como *Populus canadensis* x *P. grandidentata* se han reportado que la edad óptima para transformar callos es a las 4 semanas de edad (fase estacionaria) (5).

Conclusiones. Los callos de *Bixa orellana* son susceptibles de ser transformados vía *Agrobacterium tumefaciens* y la edad óptima para la transformación se da en la fase de crecimiento exponencial (3-5 días de edad).

Agradecimientos.

El trabajo fue financiado con el proyecto de CONACYT (28643B) y la beca de doctorado para Juan Manuel Zaldívar Cruz (No. 66872).

Bibliografía.

1. Aparnathi, K.; Lata, R. and Sharma, R. (1990). Annatto (*Bixa orellana* L.) its cultivation, preparation and usage. *Intern. J. Trop. Agric.* III (1):80-88.
2. Srivastava, A.; Shukla, Y.; Jain, S. and Kumar, S. (1999). Chemistry, pharmacology and uses of *Bixa orellana* – a review. *J. of Medicinal and Aromatic Plant Sciences.* 21:1145-1154.
3. Market Brief on Annatto Seeds. Overview of the World Market (1993) Market Development. International Trade Center UNCTAD/WTO.
4. Phillips, G. and Collins, G. (1979). *In vitro* tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus culture of red clover. *Crop Sci.* 19:59-64.
5. Dai, W., Cheng, Z. and Sargent, W. (2003). Plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of two elite aspen hybrid clones from *in vitro* leaf tissues. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 39:6-11