

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERIA



**TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE *BRASSICA OLERACEA* VAR. *CAPITATA*
CON EL GEN β -GLUCURONIDASA (GUS)**

Por:

BRYAN ADEMIR RIVERA HERNÁNDEZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título profesional de

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA

Transformación genética de *Brassica oleracea* var. *capitata* con el gen de la
 β -glucuronidasa (GUS)

Por:

BRYAN ADEMIR RIVERA HERNÁNDEZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

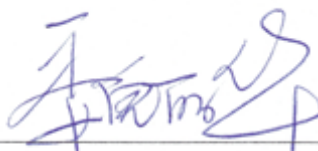
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Aprobada por el comité de asesoría:



Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez

Asesor Principal Interno



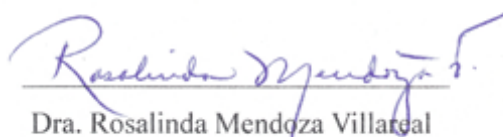
Dra. Lihua Wei

Asesor Principal Externo



Dra. Silvia Yudith Martínez Amador

Co-asesor



Dra. Rosalinda Mendoza Villareal

Co-asesor

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Junio, 2026

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA

Transformación genética de *Brassica oleracea* var. Capitata con el gen de la
 β -glucuronidasa (GUS)

Por:

BRYAN ADEMIR RIVERA HERNÁNDEZ

TESIS

Que somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito para obtener el
título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

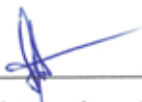
Aprobada por:



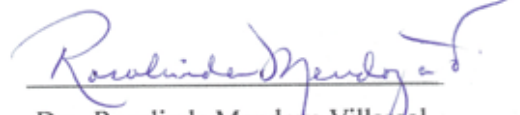
Dra. Sonia Noemi Ramírez Barron
Presidente



Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez
Secretario



Dra. Silvia Yudith Martínez Amador
Sinodal



Dra. Rosalinda Mendoza Villareal
Sinodal



M.C. Sergio Sánchez Martínez
Coordinador de la división de ingeniería

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Junio, 2026

Derechos de autor y declaración de no plagio

Todo material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor de los Estados Unidos Mexicanos, y pertenece al autor principal quien es el responsable directo y jura bajo protesta de decir verdad que no se incurrió en plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos:

Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (corta y pega); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, gráficas, mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente. Así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Por lo anterior nos responsabilizamos de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaramos que este trabajo no ha sido previamente presentado en ninguna otra institución educativa, organización, medio público o privado.



Bryan Ademir Rivera Hernández

Autor principal

Agradecimientos

A la secretaria de ciencia, humanidades, tecnológicas e innovación (SECIHTI) por el apoyo brindado para la realización de esta investigación con el proyecto.

Al Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez por las enseñanzas y conocimientos brindados para poder desarrollar este proyecto, por el apoyo y motivación que me brindó durante mi estancia en este gran equipo de trabajo, pero sobre todo por brindarme su amistad.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por brindarme los conocimientos necesarios para poder formarme profesionalmente, por los servicios prestados, además de las experiencias que me brindó.

A mis seres queridos comenzando por mis padres Juan Rivera y Francisca Hernández que dieron todo su esfuerzo para que pudiera seguir preparándome y poder realizarme como un profesionista, por todo el apoyo que me dieron, las palabras de aliento y motivación, que me hicieron llegar hasta este punto; a mis hermanos Juan Rivera H. y Kevin Rivera H. por motivarme y darme todo su apoyo en los momentos difíciles.

También a aquellas personas que me motivaron y que confiaron en mí por darme esas palabras de aliento que necesitaba para seguir adelante con mis estudios, que me ayudaron dándome consejos para poder aventurarme a esta experiencia.

A mis amigos y compañeros de este gran equipo de trabajo MGWG (Grupo de trabajo de genética molecular) que me brindaron sus conocimientos, habilidades y aportaron grandes experiencias y anécdotas que hicieron más amena mi estancia, especialmente a Luz Ramos, Mireya Salinas, Mariel Herrera, Ángel Arguello, Alejandro Alcocer, Valeriano Carrillo, Zeus Guzman y Edgar Ramírez.

A Adriana Rodríguez por los consejos que me dio, su apoyo incondicional, esas palabras de motivación que siempre eran necesarias, por escucharme cuando estaba frustrado por no poder realizar esta investigación, por ayudarme cuando más lo necesitaba, por todos aquellos buenos y malos momentos que vivimos juntos, estoy realmente agradecido por todo.

Dedicatoria

A mi padre, **Juan Rivera** por ser un ejemplo a seguir, por compartir conmigo sus conocimientos y por aquellos regaños que, con el tiempo, comprendí que fueron de gran ayuda. Gracias por estar presente, por brindarme tu apoyo en todo momento y por todo el esfuerzo y sacrificio que realizaste para que pudiera alcanzar este objetivo y formarme como profesionista. Aunque la vida no te permitió estar físicamente presente en esta ocasión tan importante, no me queda más que agradecerte profundamente y dedicarte todo el esfuerzo, la constancia y la entrega que hubo detrás de la realización de este trabajo.

A mi madre, **Francisca Hernández** por su apoyo incondicional, por guiarme y por las largas pláticas llenas de motivación cuando sentía que ya no podía más y pensaba que no lograría concluir esta etapa de mi vida. Gracias por el enorme esfuerzo que realizaste para apoyarme cuando mi papá ya no estuvo con nosotros, por tu valentía al verme partir y por soportar la distancia durante largos periodos de tiempo. Te agradezco infinitamente por todo tu amor, tu fortaleza y tu apoyo.

A mis hermanos, **Kevin Rivera H.** y **Juan Rivera H.**, gracias por el apoyo que me brindaron a la distancia, por estar presentes en los momentos en que necesitaba conversar, reír, distraerme y sentirme acompañado. También agradezco cada convivencia, cada risa y hasta aquellos enojos que formaron parte de nuestra historia.

Sé que uno de ustedes ya no está físicamente con nosotros, pero su recuerdo, su cariño y su apoyo permanecen siempre en mi corazón. Muchas gracias por todo.

Tabla de contenido

I.	Introducción.....	1
II.	Objetivos.....	3
2.1	Objetivo general.....	3
2.2	Objetivos específicos.....	3
III.	Revisión de bibliografía.....	4
3.1	Generalidades del cultivo de col.....	4
3.1.1	Botánica.....	4
3.1.2	Hábitos de crecimiento.....	5
3.1.3	Taxonomía.....	7
3.1.4	Historia.....	8
3.1.5	Importancia económica.....	10
3.1.6	Plagas de la col.....	10
3.2	Modificaciones genéticas de la col.....	12
3.2.1	Ejemplos de modificaciones genéticas en la col.....	13
3.2.2	Comercialización de la col o cualquier <i>brassica</i> transgénicas.....	17
3.3	Técnicas de modificación genética de plantas.....	18
3.4	Principales técnicas de modificación genética.....	19
3.4.1	Biobalística.....	19
3.4.2	Electroporación.....	19
3.4.3	Transferencia mediada por compuestos químicos.....	20

3.4.4	Microinyección	20
3.4.5	Sonicación	21
3.5	Técnica de modificación genética por <i>R. radiobacter</i>	21
3.6	Vectores binarios para <i>R. radiobacter</i>	22
3.7	Vector pCAMBIA1301	24
3.8	Mecanismo de transferencia genética en la infección por <i>R. radiobacter</i>	26
3.9	Expresión del gen GUS como marcador	28
IV.	Materiales y métodos	31
4.1	Semillas de col.....	31
4.2	Desinfección de semillas	31
4.3	Germinación <i>in vitro</i> de semillas de col.....	32
4.4	Cultivo de <i>R. radiobacter</i> transformado con el vector pCAMBIA1301.....	32
4.5	Preparación del medio de cocultivo	34
4.6	Técnica de infección con <i>R. radiobacter</i> y cocultivo	35
4.7	Transferencia de explantes transformados	35
4.8	Extracción de ADN genómico de explantes transformados.....	36
4.9	PCR de confirmación de la transformación y electroforesis	37
V.	Resultados y discusión	39
5.1	Porcentaje de germinación y de contaminación	39
5.2	Resultados de la verificación de <i>R. radiobacter</i>	40
5.3	Obtención de los explantes	43

5.4	Resultados de la PCR de plántulas posibles transformantes	46
5.5	Importancia del establecimiento de la técnica, utilidad	49
VI.	Conclusión	52
VII.	Literatura citada	54

Índice de tablas

Tabla 1. Secuencia de los cebadores utilizados GUS F, GUS R, KANF Y KANRR	34
Tabla 2. Componentes de la reacción de PCR para el vector pCAMBIA 1301	34
Tabla 3. Programa de PCR para amplificar GUS	34

Índice de figuras

Figura 1. Diferentes tipos de coles, formas y colores	5
Figura 2. Estructura básica de un vector binario (Komori et al., 2007).....	24
Figura 3. Mapa del vector pCAMBIA1301 y sus componentes (Zaman, 2021).	25
Figura 4. Mecanismo de infección por <i>R. radiobacter</i> (Suzuki et al., 2008).	29
Figura 5. Expresión del gen GUS. A) control negativo; B) expresión del gen GUS (Pérez Jorge L. et al., 2021).....	30
Figura 6. Siembra de semillas de col A) día 1 de la siembra; B) 3 días de la siembra, no presenta contaminación.	39
Figura 7. Extracción de ADN plasmídico de <i>R. radiobacter</i>	42
Figura 8. Resultados de la PCR utilizando como sustrato RX1) y RX2) ADN plasmídico de GUS, C+) vector, C-) control negativo y M) marcador de 1kb.....	42
Figura 9. Plantas germinadas con 7 días de crecimiento	44
Figura 10. Transformación de dos tipos de explantes de col. A y B son hipocótilos 10 días después de la transformación. C y D son hipocótilos con peciolo a 10 y 20 de la transformación, respectivamente.....	44
Figura 11. A) Inducción de callos y B) diferenciación en explantes de col	45
Figura 12. Extracción de ADN genómico de plántulas posibles transformantes por CTAB	47
Figura 13. Electroforesis de los productos de PCR utilizando cebadores específicos para el gen Gus. M) marcador de 1 kb, RT1) productos de PCR utilizando genómico de col transformado, RT2) utilizando otra de col no transformado, RNT) de col no transformado	47
Figura 14. Mapa del vector donde se muestra el tamaño del gen GUS, los bordes izquierdo y derecho que indican la region que se transfiere al hospedero	48

Figura 15. Electroforesis de los productos de PCR utilizando cebadores específicos para Kanamicina con un peso de 795 pb M), RT1) productos de PCR utilizando genómico de col transformado, RT2) utilizando otra de col no transformado, RNT) de col no transformado, C-) control negativo y V) vector.....	48
Figura 16. Region del vector que no es transferida.....	49

Resumen

La col, perteneciente a la especie *Brassica oleracea* var. *capitata*, es una de las hortalizas de mayor importancia alimentaria a nivel mundial debido a su alto valor nutricional y a su amplia utilización en la dieta humana. Sin embargo, su producción se ve constantemente afectada por diversos factores bióticos y abióticos, como enfermedades, plagas y condiciones ambientales adversas, los cuales disminuyen tanto la calidad como el rendimiento del cultivo. Ante estas problemáticas y las limitaciones del mejoramiento genético convencional, la ingeniería genética surge como una alternativa capaz de acelerar la obtención de plantas con características deseables, el presente trabajo tuvo como objetivo desarrollar y optimizar un protocolo de transformación genética para la col mediante el uso de *Rhizobium radiobacter* y el vector binario pCAMBIA1301 portador del gen reportero β -glucuronidasa (GUS). La metodología incluyó la desinfección y germinación in vitro de semillas, la obtención y cocultivo de explantes infectados con la bacteria transformada, así como la regeneración de tejidos vegetales bajo condiciones controladas. Posteriormente, se realizó la extracción de ADN y la verificación de la integración del gen GUS mediante PCR y electroforesis en gel de agarosa. Los resultados permitieron establecer condiciones adecuadas para el cultivo in vitro y evidenciaron la presencia del gen GUS en algunas plántulas transformadas, confirmando la transferencia genética mediada por *R. radiobacter*. Se concluye que el protocolo desarrollado constituye una base importante para futuras investigaciones enfocadas en el mejoramiento genético y el estudio funcional de genes en esta especie vegetal.

I. Introducción

La col es uno de los vegetales mayormente consumidos en todo el mundo debido a su gran importancia nutricional ya que contiene ácido fólico, vitaminas C, K, y A, calcio y propiedades antiinflamatorias, sin embargo, existen diversas problemáticas ligadas a los estrés bióticos y abióticos, además de las plagas que atacan este cultivo afectando considerablemente en las pérdidas de la cantidad y calidad del producto (Gerszberg, 2018).

Estudios previamente realizados han documentado la necesidad de un mejoramiento genético en diversos enfoques en el cultivo de la col, es por eso que se buscan alternativas como la ingeniería genética, debido a que ayuda a acortar el tiempo del mejoramiento genético convencional (Li et al., 2021), como el uso de *Rhizobium rhizogenes* y *Rhizobium radiobacter* para la transformación de col. La primera opción permite obtener raíces transgénicas pero mayores dificultades en la regeneración de plantas, habiendo variación en cierto grado dependiendo del genotipo. La transformación mediada por *A. tumefaciens* es más común pero también presenta baja eficiencia, habiendo también variación dependiendo del genotipo (Gerszberg, 2018).

Se ha encontrado que algunas variedades son difíciles de transformar, por lo que no es posible desarrollar un protocolo universal de transformación de col. Para realizar la transformación genética de una planta, se deben contar con diversas técnicas bien estandarizadas, tales como el cultivo *in vitro* (cultivo de explantes, callogénesis, organogénesis), modificación genética de vectores, transformación de *R. radiobacter*, entre otros. En cuanto al cultivo *in vitro* existen diversos protocolos, en los cuales se han examinado el uso de diferentes explantes como hoja, hipocótilo, peciolo, cotiledones y protoplasto, de los cuales se determinó que el uso de hipocótilos y cotiledones

que presentan mejores resultados de propagación y regeneración de plántulas nuevas (Sharma et al., 2014).

La transformación mediada por *R. radiobacter* es de las más utilizadas, Sin embargo, no sé a podido establecer protocolos eficientes, ya que las tasas de transformación de explantes que se han reportado previamente, por distintos métodos oscilan entre el 1% al 11% (Sheng et al., 2022), dicha tasa nos habla de la recalcitrancia de este cultivo a la transformación genética y de la falta de un método eficiente de transformación. ya que para esto primero se deben optimizar varios factores como los tratamientos a seguir, los medios de cultivo necesarios a utilizar y sobre todo las condiciones en las cuales debe de desarrollarse todo este proceso, es decir en condiciones asépticas y controladas, además de esto se debe contar con un vector binario que contenga un tamaño pequeño, marcadores de selección y sobre todo el gen de interés, en este estudio lo que se busca es establecer un protocolo de transformación que nos permita ser utilizado en futuras transformaciones y con diferentes genes.

II. Objetivos

2.1 Objetivo general

Desarrollar y optimizar un método confiable para la transformación genética de *Brassica oleracea* var. capitata, empleando *Rhizobium radiobacter* como vehículo para introducir el gen reportero β -glucuronidasa (GUS), con el propósito de evaluar qué tan eficiente es el proceso y generar una base sólida que facilite futuras estrategias de mejoramiento genético en este cultivo.

2.2 Objetivos específicos

- Establecer un sistema de cultivo *in vitro* de *Brassica oleracea* var. capitata que permita la obtención de explantes viables y libres de contaminación para su posterior transformación genética.
- Realizar la transformación genética mediada por *R. radiobacter* utilizando el vector pCAMBIA1301, optimizando las condiciones de infección, cocultivo y regeneración de explantes.
- Verificar la integración del gen GUS en el genoma de los explantes transformados mediante PCR, con el fin de determinar la eficiencia del proceso de transformación.

III. Revisión de bibliografía

3.1 Generalidades del cultivo de col

3.1.1 Botánica

El cultivo de col es una de las hortalizas que tienen una alta demanda durante todo el año, debido a que es uno de los alimentos más importantes para el consumo humano ya que contiene gran valor nutricional (Babula et al., 2007), también contiene propiedades antioxidantes, antibacterianas y antiinflamatorias, además de ser utilizado contra enfermedades gastrointestinales (Šamec et al., 2011), por lo que se aprovechan las hojas que conforman la cabeza que se caracterizan por tener hojas compactas y superpuestas que se pueden consumir en estado fresco, cocinadas y encurtidas (Mérida Fernández Jean Josué, 2016).

Dependiendo del tipo de variedad, las cabezas de la col pueden variar, teniendo diferentes formas como: cónicas, aplanadas y redondas. Incluso su color es diferente y varían entre un verde claro, morado y un color verde-azulado ver Figura 1 (Everardo Zamora, 2015). Mientras que el tallo suele ser corto y robusto que sirve para darle soporte a las hojas, ya que en algunas variedades el tallo suele ser muy largo principalmente en plantas que no han formado una cabeza compacta, por otro lado, el sistema radicular es fibroso conteniendo raíces secundarias, y su raíz principal es de forma cilíndrica y pivotante, estas son las encargadas de la absorción del agua y los nutrientes necesarios para el desarrollo y crecimiento saludable (Babula et al., 2007).

También es necesario realizar una fertilización este paso es de gran relevancia para el crecimiento de plantas porque se les proporciona nutrientes necesarios y así obtener un mayor rendimiento, la zona en la que se cultive también es importante debido a que se pueden utilizar diferentes fertilizantes (Thompson et al., 2000). En cuanto al crecimiento de la col su periodo de mayor crecimiento en cuanto a peso es hasta los 90 – 100 días, posterior a esto el crecimiento es rápido es decir las plantas duplican su peso a los 9 días (North, 1957).

3.1.3 Taxonomía

Esta hortaliza tiene una clasificación taxonómica que, de acuerdo con (Mérida, 2016), es de la siguiente manera:

Reino: vegetal

Subreino: Embryobionta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Dillenidae

Orden: Capparales

Familia: Brassicaceae

Género: *Brassica*

Especie: *Brassica oleracea*

Subespecie: royal vintage

Las especies pertenecientes al género *brassica*, particularmente *brassica oleracea* representan uno de los ejemplos más notables de diversificación morfológica inducida por domesticación y selección artificial, la cual de una misma especie ancestral se originaron distintas variedades botánicas con características fenotípicas altamente diferenciadas, de las cuales se destacan *Brassica* var. *capitata* (col), var *itálica* (brócoli) y var. *botrytis* (coliflor), estas diferencias morfológicas se relacionan con modificaciones específicas en la expresión génica, en regulación del

desarrollo vegetal y procesos de selección acumulados durante la evolución y domesticación (Mabry et al., 2021).

La variedad botánica *Brassica oleracea* var. *capitata* se caracteriza por la formación de una cabeza compacta constituida por hojas superpuestas que presentan curvatura hacia el interior. Esta estructura corresponde a una modificación vegetativa derivada de cambios en el crecimiento foliar, polaridad celular y organización del meristemo apical. Estudios genéticos han demostrado que la formación de la cabeza es un carácter cuantitativo regulado por múltiples loci asociados al desarrollo foliar, expansión celular y señalización hormonal (Sharma et al., 2014). Por otra parte, *Brassica oleracea* var. *italica* (brócoli) y var. *botrytis* (coliflor) corresponden a variedades seleccionadas por modificaciones en los órganos reproductivos, particularmente en la inflorescencia. En ambos casos, el producto comercial deriva de una hipertrofia de tejidos florales inmaduros (Treccarichi et al., 2023).

Además de las variedades derivadas de *B. oleracea*, otros cultivos pertenecientes al género *Brassica* poseen elevada importancia económica y alimentaria a nivel mundial. Entre ellos destacan *Brassica napus* (canola o colza), utilizada principalmente para la producción de aceite vegetal y biocombustibles; *Brassica rapa*, que incluye nabos y col china; y *Brassica nigra* (mostaza negra), empleada como condimento y fuente de compuestos bioactivos (Treccarichi et al., 2023).

3.1.4 Historia

La col ha desarrollado un papel muy importante en los sistemas alimentarios mundiales durante siglos ya que tiene diferentes usos, además de contar con una gran variedad de especies y a su vez también es utilizado para forraje (Mabry et al., 2021), el cual surgió a principios de la Edad Media europea convirtiendo a los Países Bajos en el centro de su producción, posteriormente, se extendió a muchos países de Europa y Asia, este tiene un origen que se remonta a variedades de

tipos silvestres que crecían en las costas atlánticas y mediterráneas de Europa, se piensa que las hojas de estas plantas no formaban cabezas compactas y que inicialmente se utilizaban como plantas medicinales, tiempo después se domesticó con el desarrollo de la cultura y civilización humana en el antiguo Egipto, al igual que con las civilizaciones romanas y griegas. Comenzó a consumirse como un vegetal ya que se valoraba por su resistencia a climas adversos y su capacidad por dar sustento durante los inviernos y viajes largos (Leikei, 1988; Patel et al., 2024).

La col es una especie vegetal que ha experimentado una amplia diversificación morfológica, dando paso a una gran variedad de cultivos, como la col común, la coliflor, el brócoli y las coles de Bruselas. Esta diversificación es el resultado de un largo proceso de domesticación que se remonta a varios milenios atrás (Gómez-Campo & Prakash, 1999). Esta domesticación se originó a partir de *Brassica oleracea* var. *sylvestris*, y la especie más cercana y similar es *Brassica cretica*. De acuerdo con diferentes hallazgos, ambas comparten un ancestro común, por lo que se considera a esta última como el progenitor silvestre, lo que dio como resultado la diversificación de este cultivo (Mabry et al., 2021).

La domesticación de la col no se ha aclarado por completo en lo que respecta a la ubicación inicial (Maggioni et al., 2018), por lo que se ha estudiado a través de evidencia genética y arqueológica, estos estudios sugieren que la domesticación fue en la región del Medio Oriente, más específicamente en las áreas del mediterráneo Oriental, pero también se tiene la hipótesis que la domesticación inicial tuvo lugar en la costa atlántica y las primeras formas cultivadas fueron traídas de allí al mediterráneo donde ocurrió la selección de muchos de los primeros cultivos y también se consideran posibles rutas de dispersión en las cuales se han propuesto la ruta del este en la cual también se tiene la hipótesis que las coles fueron transportadas desde Europa occidental a través de

esta ruta comercial durante la edad del bronce, las cuales fueron domesticadas en medio oriente para luego reintroducidas a Europa (Cai et al., 2022; Maggioni et al., 2018).

La llegada de la col a América fue gracias al intercambio cultural y biológico que se dio al momento de la llegada de los europeos al continente americano en el siglo XV. Este suceso se le conoce como el intercambio colombino y se realizó un intercambio masivo de plantas, animales, cultura y enfermedades entre el viejo mundo y el nuevo mundo después del viaje de Cristóbal Colón en 1492, en donde la col fue uno de los cultivos que trajeron consigo, y se adaptó a los nuevos climas y suelos. Posteriormente se integró a la agricultura y la gastronomía de muchas regiones del continente (Crosby JR & Alfred W, 1972).

3.1.5 Importancia económica

El cultivo de *Brassica* es una de las hortalizas más importantes y ampliamente consumidas en el mundo, con una producción variada en todo el mundo y siendo China el principal productor con aproximadamente 32,800,000 de toneladas, en segundo lugar, se encuentra India, con 8,500,000 y en tercer lugar Rusia con 3,309,315 (Atambo Daniel et al., 2023).

En México, la producción de col se lleva a cabo en al menos 25 entidades con una superficie total de 6,030 hectáreas y una producción de al menos 205,168 toneladas, de estas las entidades con mayor producción son Zacatecas con un rendimiento de 49.69 toneladas por hectárea; Durango, con 43.05 toneladas por hectárea; Puebla, con 40.9 toneladas por hectárea; Nuevo León, con 37.65 toneladas por hectárea; y Baja California con 37.41 toneladas por hectárea (SIAP, 2024).

3.1.6 Plagas de la col

Las principales plagas de insectos que atacan la col son la polilla dorso diamante (*Plutella xylostella*), el gusano tejedor de la col (*Helula undalis*), la mariposa blanca de la col (*Pieris*

brassicae), pulgón de la col (*brevicoryne brassicae*), la oruga medidora de la col (*Trichoplusia ni*). Sin embargo, la polilla dorso de diamante y el gusano tejedor de la col son las plagas más destructivas en muchos de los países en los que se cultiva la col y en diferentes etapas del crecimiento (Mpumi et al., 2020).

Comúnmente y en algunos países para controlar estas plagas se utilizan principalmente plaguicidas que por sus compuestos activos han sido catalogados como extremada o altamente peligrosos, y el uso intensivo provoca la reducción de la biodiversidad de los ecosistemas, así como daños en la salud humana por lo que se están buscando alternativas para combatir estas plagas sin generar tantos daños (Weinberger & Srinivasan, 2009).

También existen enfermedades causadas particularmente por hongos y bacterias, de las cuales son de gran importancia y que no solo afectan a la col si no a cualquier otra crucífera. Los patógenos se transmiten principalmente por medio de la lluvia y el viento. Incluso, las raíces pueden crecer en la dirección de alguna espora de hongo (Hussain & Rathore, 2018). A continuación, se describen algunas de las principales enfermedades de la col y las formas de controlarlas.

La mancha y tizón de la hoja es una enfermedad destructiva para cultivos de semillas en donde las hojas viejas son las más susceptibles y se presenta con pequeñas manchas de color amarillo oscuro, posteriormente estas manchas se agrandan en áreas circulares con anillos concéntricos y posiblemente rodeadas con halos amarillos y en casos graves puede provocar la defoliación de la planta. El principal control es darles un tratamiento a las semillas con agua caliente a 50 °C durante 30 min para minimizar a la enfermedad. También se pueden rociar en plena floración con captan u oxiclورو para controlar la enfermedad (Hussain & Rathore, 2018).

Podredumbre negra es una enfermedad causada por una bacteria que es común en áreas húmedas y cálidas. Las plántulas pueden infectarse durante el crecimiento y los síntomas se

manifiestan con hojas color verde amarillento pálido, posteriormente se vuelven marrones, y en cuanto más avanza la enfermedad van perdiendo hojas inferiores e incluso puede morir la planta, la forma para controlar esta enfermedad es tratando las semillas con Agrimycin o streptocycline y sembrar en lugares donde se facilite el drenaje (Hussain & Rathore, 2018).

Mildiú veloso es una enfermedad grave en invernaderos, pero también se puede mostrar en campo, esta es causada por el abundante rocío, lluvias provocando humedad alta, se puede apreciar cuando las hojas tienen lesiones de color verde claro en la superficie inferior, luego comienzan en la parte superior, otra característica es que se forma un moho color blanco grisáceo en la superficie de la planta, para controlar esta enfermedad es necesario destruir todo tipo de malezas, además de que el cultivo debe regarse con un cierto control para evitar una alta humedad (Hussain & Rathore, 2018).

Hernia de la col se desarrolla en condiciones de humedad, frescos y ácidos que favorecen el desarrollo y la propagación lo que provoca es que se formen tumoraciones en las raíces de hasta 15 cm en los casos más severos y no son visibles hasta después de 3 semanas de la infección, en caso de que se infecten en invernadero las plantas pueden morir y en caso de que sea en campo muy rara vez mueren, pero la captación de minerales y agua se reduce. El control para esta enfermedad es la rotación de los cultivos cada determinado tiempo y elevando el pH del suelo para inhibir el desarrollo del patógeno (Hussain & Rathore, 2018).

3.2 Modificaciones genéticas de la col

La col es un cultivo de gran importancia debido a que es uno de los componentes más importantes en la dieta humana, ya que es una fuente valiosa de ácido fólico, vitaminas y calcio. Sin embargo, existen problemáticas relacionadas con estreses bióticos y abióticos como enfermedades fúngicas, plagas, que causando una pérdida en la calidad y cantidad en el rendimiento de col. Los

principales daños importantes son causados por enfermedades fúngicas y por insectos lepidópteros, buscando una solución a esta problemática se han desarrollado diferentes estudios y análisis para procedimiento de regeneración y transformación, debido a que el método tradicional es insuficiente (Gerszberg, 2018).

El método tradicional de modificación genética utiliza especies silvestres con características deseadas para mejorar la especie mediante hibridación. Sin embargo, este proceso requiere una investigación exhaustiva de diferentes tipos de especies para obtener las características deseadas. Una limitante importante es la falta de acceso a los germoplasmas adecuados, por lo que la transformación genética ha hecho posible que estos mejoramientos sean más rápidos y obteniendo buenos resultados en las características deseadas, que parece ser una técnica eficiente para la mejora de la col (Liu et al., 2013).

Aún con todos los avances que se han logrado no se ha desarrollado un procedimiento de transformación rutinario y se debe a la baja eficiencia de la transformación de col que está relacionada con el genotipo y también a que algunas de las variedades son recalcitrantes a la transformación (Gerszberg, 2018).

3.2.1 Ejemplos de modificaciones genéticas en la col

Dentro de las diversas modificaciones genéticas que se han aplicado al cultivo de col, se han aplicado distintas estrategias con distintos objetivos específicos, se explican algunos ejemplos de estas estas modificaciones. Una de ellas es la transformación de col china (*Brassica campestris ssp. Pekinensis*) debido a que es una de las hortalizas más importantes que se consumen durante el invierno en China, japon y Corea (Park et al., 2005).

Teniendo en cuenta la gran importancia de esta hortaliza se desarrolló una mejora genética que busca investigar la eficiencia transgénica y la función de los genes de las proteínas abundantes en la embriogénesis tardía (LEA) que se expresan altamente en las últimas etapas del desarrollo en condiciones normales y también cuando las plantas que se encuentran en condiciones de estrés ambiental esta transformación es mediada por la función de la proteína LEA 3 en la col china para la expresión del grupo 3 de *B. napus* con la finalidad de probar el papel del gen de proteína LEA en la tolerancia al estrés, en esta investigación se utilizó el método de transformación por *R. radiobacter* con el vector binario pIG1201 y la cepa LBA4404, teniendo como resultado que se tiene una baja eficiencia de la transformación debido a que hay muy poca susceptibilidad de la col con *R. radiobacter* y una baja regeneración de tejidos infectados, pero mostrando resultados satisfactorios en las plantas transformadas demostrado que la col china es tolerante al déficit hídrico y al estrés salino logrando tener un mejor rendimiento en comparación con las no transformadas y apoyando el uso de la proteína LEA en la promoción de la tolerancia al estrés hídrico (Park et al., 2005).

Otro estudio realizado fue la transformación de plástidos mediante el método de biobalística, en el cual se busca transferir el gen *cryIAb* al genoma del cloroplasto de la col y que obtengan una resistencia a la plaga de larvas de la polilla de espalda de diamante, para este procedimiento se utilizó el plásmido pMT91GDA que contiene el casete de expresión del cloroplasto, posteriormente se prepararon las hojas jóvenes para realizar el bombardeo de las partículas de oro y transferir las hojas a un medio G1 para su regeneración, para después seleccionar las plantas regeneradas por su resistencia a espectinomicina y la estreptomicina (Tseng et al., 2014).

Posterior a esto se realizaron una serie de pasos para la selección de los explantes transformados, hasta llevarlos a la aclimatación en donde se realizaron las últimas pruebas de revelación de GUS demostrando que se logró obtener plantas transformadas y una resistencia

significativa a las larvas de la polilla de espalda de diamante, sin embargo, uno de los principales problemas de la transformación de col por este método es que la regeneración es muy baja (Tseng et al., 2014).

La transformación de cloroplastos se ha convertido recientemente en una tecnología establecida para la mejora de cultivos. En este estudio, se buscó la expresión de un gen de toxina de *Bacillus thuringiensis* (*cry1Ab*) en los cloroplastos de la col de dos variedades de coles dando una eficacia insecticida contra *Plutella xylostella*, para lograr esto se utilizó el vector pASCC201 el cual contiene los genes *aadA* y *cry1Ab* y se realizó por el método de biobalística (Liu et al., 2008).

Las plántulas regeneradas se seleccionaron por su resistencia a la espectinomicina y la estreptomycin. Una vez realizada esta selección se calculó el porcentaje de regeneración de las dos variedades de col el cual fue del 4 al 5 %. Los resultados de los análisis de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), hibridación Southern, Northern y Western indicaron que los genes *aadA* y *cry1Ab* no solo se integraron con éxito en el genoma del cloroplasto, sino que se expresaron funcionalmente a nivel de ARNm y proteína, además de que la expresión de la proteína *cry1Ab* fue de un rango del 4.8 % al 11.1% total de las hojas transgénicas de ambas especies, demostrando los efectos insecticidas sobre *Plutella xylostella* en la col (Liu et al., 2008).

La podredumbre blanda bacteriana es la enfermedad más grave y la col china es muy susceptible a esta, por lo que se buscó alternativas para el mejoramiento de la col china transgénica debido a que estas presentan cierta resistencia a esta enfermedad. Esta transformación se realizó con un vector binario pCAMBIA1302 el cual contiene el gen de fusión (*pinII*SP-*aii*), el péptido señal del inhibidor de proteasa II de la patata (*PinII*) fusionado al gen de inactivación del autoinductor (*aii*) de *Bacillus sp.* GH02, el gen de la proteína fluorescente verde (*gfp*) y un gen de la higromicina

fosfotransferasa II (*hptII*) para la resistencia a la higromicina y este se introdujo en una cepa de *R. radiobacter* LBA4404 (Vanjildorj et al., 2009).

Posteriormente se realizó el proceso de transformación y regeneración de los explantes infectados, para la realización de pruebas quedo demostrado La tolerancia a la enfermedad de podredumbre blanda se evaluó en la etapa de tejido y plántula. Las plantas transgénicas mostraron una tolerancia significativamente mejorada (2-3 veces) a la enfermedad de podredumbre blanda en comparación con las plantas de tipo silvestre. Por lo tanto, la expresión del gen de fusión *pin* IISP - *aii* reduce la susceptibilidad a la enfermedad de podredumbre blanda en la col china (Vanjildorj et al., 2009).

Los métodos de edición genómica, especialmente la tecnología CRISPR/Cas9, están emergiendo como una herramienta clave en el desarrollo de nuevas técnicas de mejoramiento genético. Esta innovadora tecnología permite avances significativos en la mejora de características vegetales, particularmente en lo que se refiere a la resistencia a enfermedades, superando los límites del mejoramiento genético convencional. Uno de los virus más perjudiciales y extendidos que afectan a las especies de *Brassica* a nivel mundial es el virus del mosaico del nabo (TuMV), un potyvirus que causa graves daños (Lee et al., 2023).

En este estudio, se generó una mutación específica en el gen *eIF(iso)4E* en el cultivar "Seoul", que es susceptible al TuMV, utilizando la tecnología CRISPR/Cas9, con el objetivo de desarrollar col china resistente a este virus. Se identificaron varias mutaciones inserciones o deleciones heredables en las plantas T0 editadas, y se avanzó a la generación T1 a través de la progresión generacional. El análisis de secuenciación de las plantas T1 editadas con *eIF(iso)4E* confirmó que las mutaciones se transmitieron a las generaciones posteriores. Estas plantas T1

editadas mostraron resistencia al TuMV, lo que se corroboró mediante un análisis ELISA, que reveló la ausencia de acumulación de partículas virales (Lee et al., 2023).

Además, se observó una fuerte correlación negativa entre la resistencia al TuMV y la frecuencia de edición genómica del gen *eIF(iso)4E*. Estos hallazgos demuestran que la técnica CRISPR/Cas9 puede acelerar significativamente el proceso de mejoramiento genético, permitiendo la mejora de rasgos en plantas de col china de manera más eficiente y precisa. Este estudio resalta el potencial de la edición genómica para desarrollar cultivos resistentes a enfermedades de forma rápida y efectiva (Lee et al., 2023).

3.2.2 Comercialización de la col o cualquier *brassica* transgénicas

Los cultivos genéticamente modificados son una herramienta muy eficiente, en cuanto al manejo de plagas y la disminución de pesticidas, fertilizantes y otros insumos, obteniendo beneficios tanto económicos como ambientales, aunque muchos países siguen analizando posibles impactos negativos de estos cultivos, lo que ha llevado a que se implementen sistemas regulatorios muy estrictos y regulaciones que son más restrictivas para ciertos cultivos (Dias & Ortiz, 2013).

Otro factor importante es la percepción y la demanda del consumidor. En diversas regiones, especialmente en Europa, existe una fuerte resistencia a los alimentos modificados genéticamente, mientras que en Estados Unidos y Canadá apoyan el desarrollo de alimentos modificados genéticamente (Dias & Ortiz, 2013).

Es fundamental mencionar que, hasta la fecha, no hay disponibles en el mercado variedades comerciales de col (*Brassica oleracea*) ni de otras *brassicas*, como el brócoli, la coliflor o la col rizada, que hayan sido modificadas genéticamente. A diferencia de cultivos como el maíz, la soja o

la canola, que han sido ampliamente modificados, las *brassicas* no han logrado una comercialización significativa en su versión transgénica, a pesar de los avances en la investigación en este campo.

3.3 Técnicas de modificación genética de plantas

La modificación genética de plantas es una forma de alterar el material genético para mejorar características deseables como lo son resistencia a herbicidas, plagas y virus, que van más allá de los métodos tradicionales de cruce y selección, el cual se busca propagar aquellas plantas que contengan alguna de las características deseables, esto sucede después de obtener varias generaciones de cruces y es un proceso largo, que puede llevar hasta 15 años en producir una nueva variedad, así mismo la ingeniería genética permite acelerar este proceso drásticamente (Key et al., 2008), de esta forma se pueden adicionar o eliminar genes con una mayor precisión, lo cual nos lleva a tener una mayor eficiencia en la mejora de cultivos. Debido a esto se han desarrollado diferentes técnicas que facilitan este proceso. Existen diferentes métodos de transformación los cuales tienen como objetivo ser más eficientes en la transferencia de ADN hacia los tejidos vegetales. Los sistemas de transformación con los que se cuenta en la actualidad se clasifican en métodos indirectos y métodos directos, de acuerdo con el mecanismo utilizado para la transferencia del material genético (Díaz Granados & Chaparro-Giraldo, 2012).

Los métodos indirectos son aquellos en los que se utilizan vectores biológicos, aprovechando la característica natural de patogenicidad de este organismo. De acuerdo con (Day, 1996) el descubrimiento de la transformación del ADN en bacterias y la comprensión de que la información genética está codificada en la secuencia de bases de nucleótidos del ADN sugirieron que podría ser posible transformar organismos superiores con secuencias de codificación de ADN para efectuar cambios genéticos dirigidos. Para los métodos directos se emplean técnicas con procedimientos químicos, fisicoquímicos, y mecánicos. (Díaz Granados & Chaparro-Giraldo, 2012). En la

actualidad hay numerosos métodos de transformación que se encuentran disponibles, aunque la mayoría son muy poco utilizados en el laboratorio. Los métodos más empleados son la transformación mediada por *R. radiobacter* y Biobalística, tanto para usos experimentales como para usos comerciales. (Díaz Granados & Chaparro-Giraldo, 2012).

3.4 Principales técnicas de modificación genética

3.4.1 Biobalística

Es una técnica, también conocida como “pistola de genes”, que utiliza micropartículas de oro o tungsteno recubiertas por el ADN que se desea transferir. Estas son disparadas hacia el tejido vegetal a una alta velocidad, penetrando a las células y depositando el ADN en su interior. La técnica fue diseñada en la Universidad de Cornell en 1987 para facilitar la transformación genética de cereales, aunque puede aplicarse en muchas otras especies. Es una técnica ampliamente aceptada debido a su capacidad para introducir múltiples genes. (Rivera et al., 2012).

Debido a su metodología sencilla, sus principales aplicaciones incluyen los estudios de expresión génica transitoria, la inoculación de plantas con patógenos virales y en la producción de plantas modificadas genéticamente. Esta última aplicación se ha utilizado en cultivos como arroz, trigo y maíz. Sin embargo, una de las principales desventajas es una eficiencia baja de la transformación, debido a su integración aleatoria del ADN en el genoma. Además, de que el equipo y materiales requeridos son costosos (Kikkert Julie R. and Vidal, 2004).

3.4.2 Electroporación

Esta técnica es ampliamente utilizada debido a simplicidad, rapidez y eficiencia en una amplia variedad de tejidos vegetales (Rivera et al., 2012). Su funcionamiento se basa en aumentar la conductividad eléctrica mediante pulsos que van desde microsegundos hasta milisegundos lo que

provoca una desestabilización temporal de la membrana. Esto genera una pérdida temporal de permeabilidad, creando poros microscópicos reversibles que permiten a la célula absorber micro o macromoléculas, sin embargo, si la corriente eléctrica es demasiado intensa, la membrana no puede volver a sellarse, lo que resulta en la muerte de la célula. Además, este método requiere el uso de protoplastos, lo que representa una de sus principales desventajas. Entre sus ventajas destacan que su aplicación es sencilla, el bajo costo, su adaptabilidad a diferentes células y teniendo un alto porcentaje de transformación, algunos de los principales cultivos en los que se ha utilizado la electroporación son tabaco, arroz y cerezo silvestre (Krassowska & Filev, 2007; Ozyigit, 2020).

3.4.3 Transferencia mediada por compuestos químicos

Esta técnica se basa en el uso de compuestos químicos que inducen permeabilidad en la membrana celular. Para esto, las células vegetales deben ser tratadas con la sustancia química en las concentraciones y en las condiciones preestablecidas. Entre los compuestos químicos más empleados se encuentran: Polietilenglicol (PEG), Fotostato de calcio y Poly-L-omotina. Estas sustancias ayudan a inducir permeabilidad en las membranas, mediante la inducción de poros transitorios o daño reversible de la membrana, lo que permite o favorece el paso del ADN foráneo y de macromoléculas, a través de la membrana hacia el interior de la célula (Díaz Granados & Chaparro-Giraldo, 2012).

3.4.4 Microinyección

Es una técnica precisa en la introducción de ADN externo la cual consiste en el uso de microagujas de vidrio y microscopia para insertar el ADN en el interior de las células vegetales, ya sea en el núcleo o citoplasma (Rivera et al., 2012). El procedimiento implica en inmovilizar las células con una pipeta de retención y con una suave succión para evitar dañar las células. La microinyección se utiliza principalmente para transformar células animales debido a que en células

vegetales puede haber peligro de liberar hidrolasas o algún compuesto tóxico y llevar a la muerte rápida del protoplasto. A pesar de esto, se ha empleado este procedimiento en cultivos de tabaco y Haba (Rakoczy-Trojanowska, 2002). Teniendo como desventaja que es una técnica muy lenta, requiere un micromanipulador costoso, procedimientos tediosos y los conocimientos adecuados para inmovilizar las células, Sin embargo, es extremadamente eficiente, muy precisa y permite la introducción no solo de plásmidos sino también de cromosomas completos en células vegetales (Rivera et al., 2012).

3.4.5 Sonicación

Es un método se utiliza comúnmente para realizar transformaciones en tejidos vegetales, células en suspensión y protoplastos, lo que lo convierte en una técnica viable y con gran potencial. Para realizar este proceso es necesario un ultrasonido con frecuencias superiores a 20 kHz lo que lleva a que la célula genere permeabilidad formando poros transitorios por el cual el ADN externo ingresa a la célula vegetal para después colocarlo en un medio nuevo de crecimiento (Díaz Granados & Chaparro-Giraldo, 2012). Estos efectos son logrados debido a la cavitación acústica la cual contiene un medio líquido en reposo el cual propaga las ondas, provocando que se formen burbujas que crecen y colapsen debido a las oscilaciones formando chorros y produciendo daños en objetos sólidos cercanos, este método tiene desventajas como la formación de radicales libres, daños en la pared celular y alteraciones en la permeabilidad de la célula (Díaz Granados & Chaparro-Giraldo, 2012; Mehier-Humbert et al., 2005)

3.5 Técnica de modificación genética por *R. radiobacter*

Durante los primeros años, el estudio de *R. radiobacter* se enfocó principalmente en identificar las causas de las agallas destructivas en plantas ornamentales. Posteriormente, se comenzaron a realizar estudios que permitieron dar origen a toda una nueva industria de

modificaciones genéticas en plantas(Nester, 2015). Estos análisis han identificado diferentes genes vegetales importantes para la transformación genética, y el cómo es que *R. radiobacter* actúa en sus hospedantes para así tener una mayor probabilidad de éxito (Gelvin, 2009).

Este es el método más utilizado para insertar genes de interés a las células vegetales debido a sus principales ventajas: bajo costo, facilidad de manejo, no requiere equipo especializados y tiene una integración eficiente del ADN-T, por otro lado, su principal desventaja es el bajo índice de transformación. Debido a esto se han producido y liberado plantas genéticamente modificadas en diferentes países después de realizar diferentes procesos legales, teniendo en 1996 la primera planta transgénica y para 2019 en 29 países ya se cultivaban plantas transgénicas, como lo son: el algodón, tabaco, tomate, papa, trigo y arroz, siendo alguno de los principales cultivos transgénicos (Azizi-Dargahlou & Pouresmaeil, 2023).

3.6 Vectores binarios para *R. radiobacter*

Durante los primeros intentos para realizar las modificaciones con *R. radiobacter* e introducir el ADN-T a las células vegetales, se tuvieron muchas complicaciones principalmente en el manejo de los plásmidos Ti debido a la obtención de un bajo número de copias en *R. radiobacter*, además de que no se puede replicar en *E. coli*, de esta manera se buscó la forma de realizar un sistema que facilitara este proceso, dando como resultado la evolución de los vectores binarios simplificando la manipulación genética en plantas y permitiendo insertar los genes de una manera más eficaz y precisa y en los últimos 25 años se han desarrollado más vectores sofisticados y especializados para propósitos específicos (Lee & Gelvin, 2008).

Los vectores binarios son una herramienta comúnmente utilizada en la transformación de plantas superiores mediada por *R. radiobacter*. Este sistema cuenta con dos vectores: uno contiene la región del ADN-T con un plásmido Ti de tipo salvaje o desarmado (es decir, no contiene los genes

que causan la tumoración) y el otro contiene los genes de virulencia, que actúan como un ayudante. Un ADN-T artificial se puede construir dentro del plásmido y replicarse tanto en *R. radiobacter* como en *E. coli*. Esta construcción del plásmido debe ser completada en *E. coli* y transferir el vector hacia *R. radiobacter* obteniendo una cepa lista de la cual se han obtenido transformaciones exitosas de algunas variedades como el cereal (Ebert et al., 1988; Komari et al., 2006).

Sin embargo, al momento de seleccionar un vector binario se debe tener en cuenta las propiedades que poseen ya que pueden variar y una característica importante que se debe considerar es su rango de huésped, que se pueda llevar a cabo una infección en cualquier tipo de planta en particular (Ebert et al., 1988). De esta forma los primeros vectores binarios obtenidos fueron el pBin19 y pBil21, posteriormente se siguieron realizando mejoras como sitios de clonación múltiple, alta capacidad de clonación y con una mayor eficiencia en la transformación, obteniendo vectores como pPZP y pCAMBIA (Komori et al., 2007).

Estos vectores son seleccionados y muy utilizados e incluso se les considera como básicos debido a que poseen ventajas como tener el gen de interés y manipularlo en *E. coli* para posteriormente transformar a *R. radiobacter* manteniendo replicones autónomos y teniendo esto se puede realizar la transformación de células vegetales (An, 1987). A continuación, en la Figura 2 se puede observar la estructura básica de un vector binario.

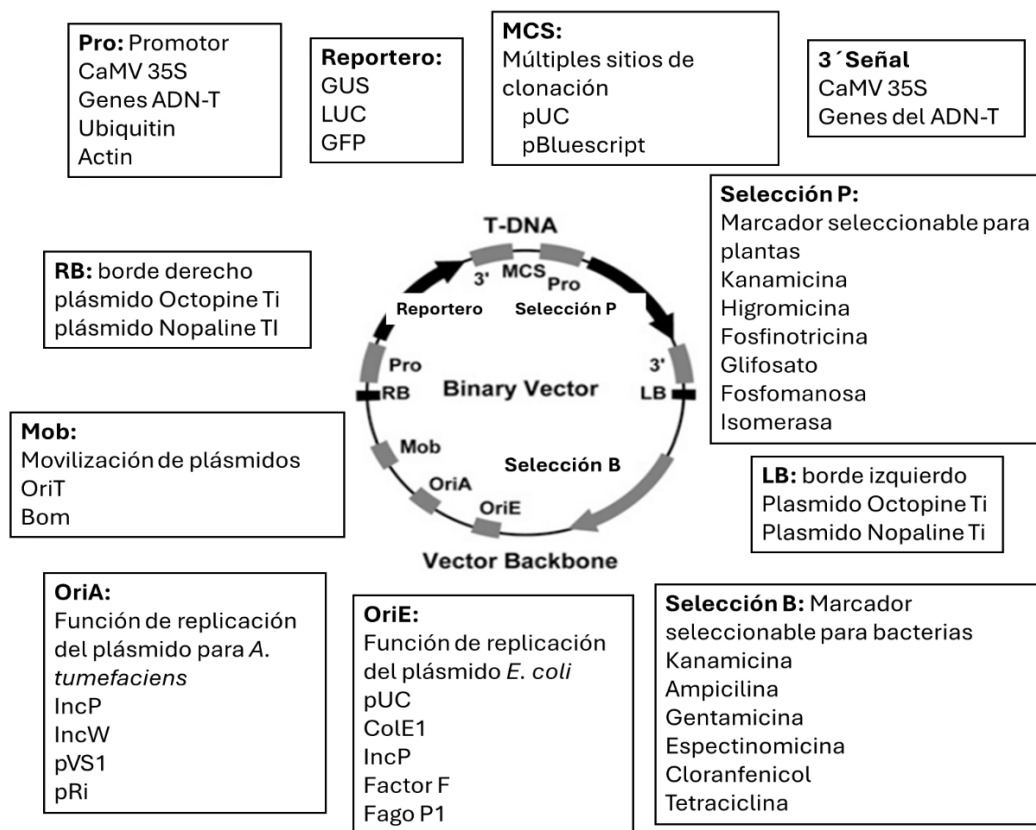


Figura 2. Estructura básica de un vector binario (Komori et al., 2007).

3.7 Vector pCAMBIA1301

El vector pCAMBIA1301 (Figura 3) se creó en Australia por una organización sin fines de lucro, derivado de los vectores pPZP, este posee dos orígenes de replicación específicos, el primero es para *E. coli* (pBR322) y el segundo para *R. radiobacter* (pVS1-REP), de esta manera se logra tener una mejor estabilidad y un alto número de copias de estas bacterias, además de que se han vuelto populares por tener un fácil manejo y estabilidad (Choi et al., 2019; Leclercq et al., 2015).

En la actualidad los vectores son herramientas muy importantes ya que son diseñados principalmente para la transferencia de genes de interés a plantas y de esta forma poder aprovechar la capacidad de infección que tiene *R. radiobacter* para que de esta forma se puedan estudiar función,

expresión y localización (Choi et al., 2019). Esto se logra debido a que el vector contiene marcadores de selección como la higromicina que ayuda a la selección en plantas ya transformadas y la kanamicina, para el crecimiento de bacterias, también contiene un gen reportero GUS que ayuda a la detección visual en tejidos vegetales, aunque este también puede ser sustituido por un gen de interés (Andargie et al., 2016; Choi et al., 2019).

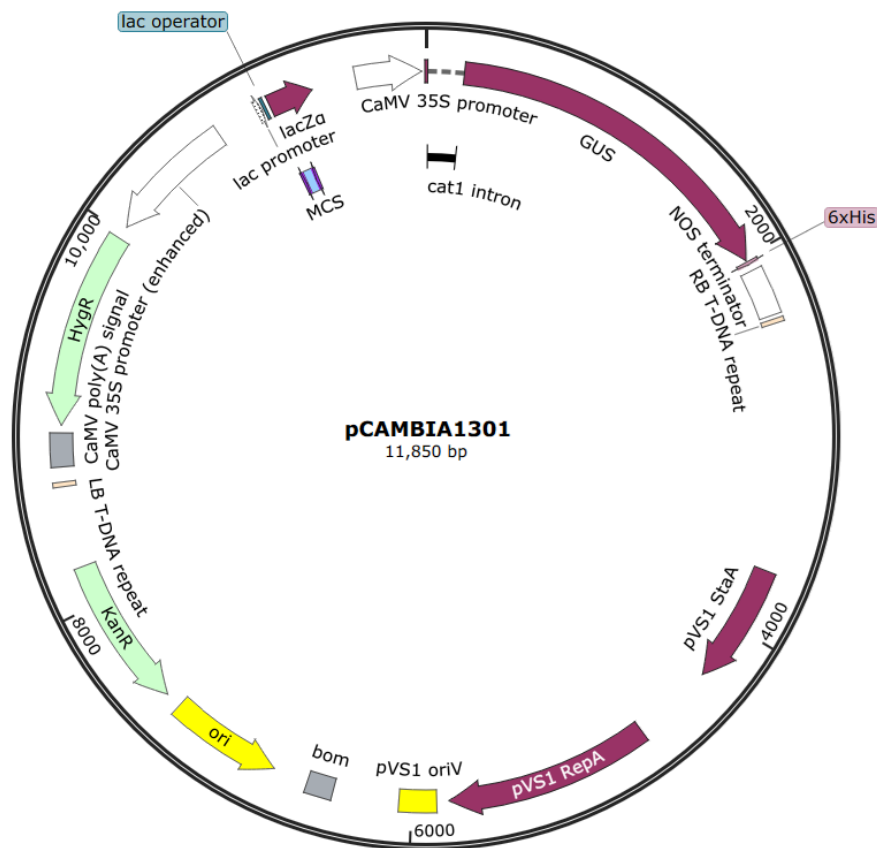


Figura 3. Mapa del vector pCAMBIA1301 y sus componentes (Zaman, 2021).

3.8 Mecanismo de transferencia genética en la infección por *R. radiobacter*

El mecanismo de transferencia de *R. radiobacter tumefaciens* ocurre de forma natural en relación bacteria/planta el cual consiste en insertar una parte de su ADN conocido como ADN de transferencia (ADN-T), que se encuentra en el plásmido Ti (plásmido inductor de tumores), este a su vez contiene *genes vir* que son genes de virulencia los cuales son necesarios para la transferencia e integración del ADN-T en el genoma de la planta lo que provoca la formación de agallas y coronas en diversas especies dicotiledóneas (Milena et al., 2005).

El plásmido Ti tiene un tamaño aproximado de 200 y 800 kpb, a su vez contiene regiones T en los plásmidos Ti nativos los cuales son de un tamaño aproximado de 10 y 30 kpb, en algunos casos, solo se encuentra una sola región T, mientras que en otras se pueden encontrar varias regiones T, las cuales están definidas con secuencias repetitivas llamadas bordes del ADN-T, y miden 25 pb teniendo una alta homología de secuencias las cuales flanquean la región T en orientación de repetición directa, la cual los bordes del ADN-T delimitan la región transferida debido a que el objetivo específico de las endonucleasas VirD1/VirD2 que procesa el ADN-T desde el plásmido Ti (Gelvin, 2003).

Para que el proceso de infección ocurra correctamente, deben desarrollarse eventos clave como: (I) la activación del sistema de virulencia bacteriana en respuesta a señales de la planta, (II) la formación del complejo ADN-T, (III) el traslado del ADN-T desde *R. radiobacter* hasta el núcleo de la célula receptora, (IV) la incorporación del ADN-T en el genoma del huésped (Ziemienowicz, 2014).

Al momento de identificar las señales que envía la planta que indican el inicio de la infección, actúan dos grupos de proteínas las VirA y VirG, las cuales reaccionan a plantas que tienen heridas promoviendo la activación transcripcional de los *genes Vir*. Para ello primero actuará la proteína de

la membrana VirA y estará en contacto con los compuestos liberados por la planta herida que son principalmente compuestos fenólicos, flavonoides y acetosiringona. A su vez la proteína citoplasmática VirG que es fosforilada por VirA y el complejo ChE-azúcar dando paso a la transducción y activación de señales para los genes Vir, por otro lado, la proteína ChvG funciona como un sensor por parte del complejo ChvG/ ChvI cumpliendo una función importante en la regulación de genes inducibles a un pH ácido ya sea de forma directa o indirecta la acidez extracelular (Milena et al., 2005; Shimoda et al., 1993).

Posteriormente, en la síntesis del ADN-T intervienen las proteínas VirD2 y VirD1, las cuales actúan como endonucleasas que se unen en el plásmido Ti en los extremos del ADN-T realizando cortes en la cadena inferior de este, permitiendo a la proteína VirD2 unirse al extremo 5' para que de esta forma se pueda trasladar desde la bacteria hasta el hospedero con ayuda del operon *virB* (Milena et al., 2005). Para evitar que el ADN-T unido a VirD2 sea degradado las proteínas VirE2 se unen formando un complejo T, esto ocurre en el citoplasma de la célula vegetal y a su vez también funciona como una guía para que pueda entrar al núcleo de la célula vegetal (Suzuki et al., 2008).

Para el traslado del ADN-T de la bacteria a la célula vegetal es necesario que se unan los diferentes tipos de VirB para formar un sistema de secreción tipo IV (T4SS), este factor es importante en este proceso de infección debido a que transporta genes de virulencia necesarios para que se realice el traslado del ADN-T de la bacteria a la célula vegetal y algunas proteínas VirE2 y VirF ya que estas actúan como una unión entre el complejo ADN-T/VirD2 con la secreción codificada por VirB, que ayudan a la disolución de la membrana de la bacteria y estar en contacto con la célula vegetal. También son necesarias las proteínas VirD4 debido a que son las encargadas de formar el Pili de virulencia y funcione como un ducto de transferencia de información, insertando

el ADN-T en el hospedero y concretando la infección (Gelvin, 2003). En la Figura 4 se muestra el esquema del proceso de infección.

3.9 Expresión del gen GUS como marcador

El desarrollo de los estudios sobre la localización y sincronización celular en la expresión de genes suelen ser de gran importancia debido a que ayudan en la comprensión de la integración y función de los genes a nivel organismo, para la localización de la expresión de genes se comenzó utilizando la inmunocitoquímica con anticuerpos específicos para proteínas las cuales contenían un marcador con fluorescencia, posteriormente la invención técnicas moleculares permitieron el desarrollo de los sistemas de genes reporteros facilitando la detección y la expresión de estos, Entre los genes reporteros más utilizados en la actualidad son los genes *lacZ* y *uidA* (*gusA*) de *E. coli*, que codifican para la β -galactosidasa y la α -glucuronidasa (GUS) (Guivarc'h et al., 1996).

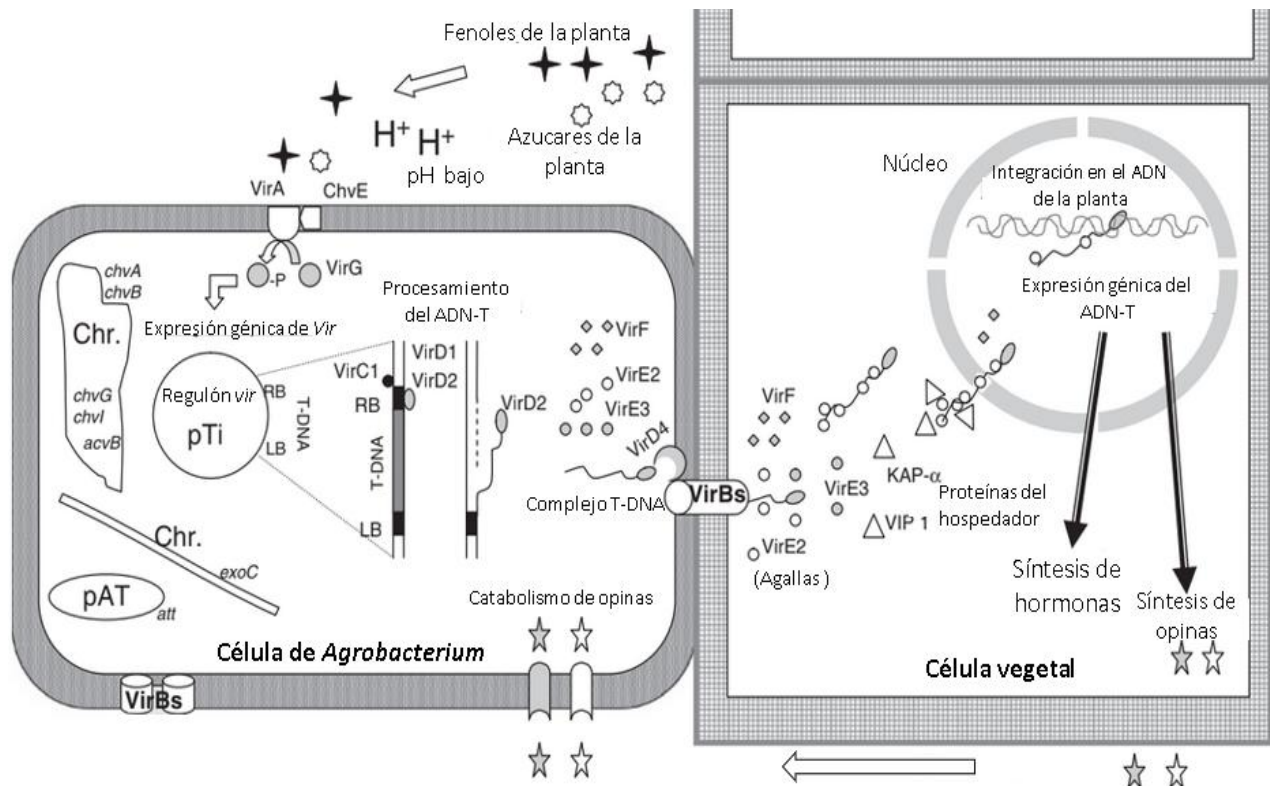


Figura 4. Mecanismo de infección por *R. radiobacter* (Suzuki et al., 2008).

El gen bacteriano de la β - glucuronidasa (*uidA*, *gusA*), ampliamente conocido como el gen GUS, es el principal gen reportero usado para el análisis de la expresión génica de las plantas, debido a que cuenta con una amplia aceptación debido a sus ventajas como lo es el análisis rápido y no reactivo, también es extremadamente sensible, y es posible obtener datos tanto cuantitativos como cualitativos, debido a la simplicidad de los ensayos, cromogénicos y fluorogénicos, para análisis principalmente cuantitativos, como lo es el sustrato histoquímico sensible 5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-glucurónido (X-gluc), además, la expresión del gen no es perjudicial para los huéspedes (Martin et al., 1992; R. A. Jefferson, 1989).

Para la detección de GUS en material genético transgénico, se puede realizar a través de dos métodos, el primero consiste en cuantificar los extractos vegetales a través de un sustrato fluorogénico en tejidos completos, principalmente es utilizado el 4-metil-umbeliferil- β -D-glucurónido (MUG) dando como resultado un producto fluorescente 4-metilumbeliferona (MU), aunque existen diferentes sustratos fluorogénicos este es el principal. El segundo método consiste en agregar el sustrato X-gluc, generando un producto incoloro y soluble, el cual se oxida y forma un color azul oscuro que se puede observar fácilmente en el tejido sin necesidad de equipo especializado, como se muestra en la Figura 5 (Huttly, 2009).

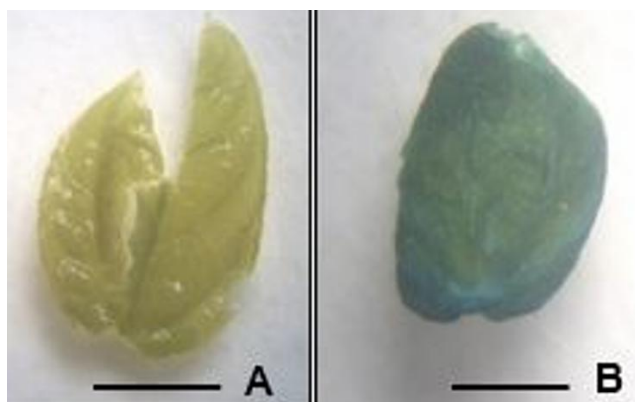


Figura 5. Expresión del gen GUS. A) control negativo; B) expresión del gen GUS (Pérez Jorge L. et al., 2021).

IV. Materiales y métodos

4.1 Semillas de col

En este trabajo se utilizaron semillas de col de la variedad Royal Vantage de la casa comercial Sakata, México, Esta variedad se caracteriza por producir grandes cabezas que son ideales para el mercado fresco en México, cuenta con una excelente vida de anaquel para transportaciones de largas distancias, además de ser una planta fuerte y vigorosa que se puede adaptar a diversos climas y condiciones del suelo (Sakata, 2016).

4.2 Desinfección de semillas

La desinfección de semillas realizó por medio de tres lavados, comenzando con etanol al 3.33%, el segundo con cloro 1/3 (una parte de cloro y dos de agua estéril), por último, en agua destilada estéril.

Este procedimiento se realizó en la campana de flujo laminar vertical (CV-2, Ecoshel) en donde las semillas de col se sumergieron en etanol al 3.33%, por 3 min, en constante agitación, y pasado el tiempo se descartó el etanol y se le dio un enjuague rápido con agua destilada, posteriormente se sumergieron en una solución de 1/3 de cloro por 20 min, en donde se mantuvieron en constante agitación, por último, se pasaron las semillas de col a agua destilada estéril por 10 min de igual forma manteniendo en constante agitación.

Al término del tiempo se decantó el agua destilada y se realizaron enjuagues rápidos hasta eliminar completamente residuos formados de las semillas. Una vez eliminados estos residuos las semillas desinfectadas se colocaron en papel secante estéril dejándolas secar por 10 min, en la campana de flujo laminar, para su posterior siembra.

4.3 Germinación *in vitro* de semillas de col

Para la realización de la germinación de semillas de col, fue necesario preparar medio de cultivo Murashige and Skoog (MS), el cual contiene micronutrientes y macronutrientes, además esta adicionado con vitaminas, agar 0.8 %, gelzan y sucrosa 5% (Phytotech, CAT M5825), en una proporción de 36.43g/L, el medio en polvo fue disuelto en agua destilada, con agitación y temperatura constante, hasta la clarificación. el pH fue ajustado a 5.7 – 5.8, subiendo el pH con ayuda del hidróxido de sodio (NaOH) al 1M o bajando el pH con ácido clorhídrico (HCl). Una vez preparado el medio MS, fue dosificado en 10 mL por cada frasco de cultivo.

Las semillas de col de la variedad *Royal Vantage*, las cuales fueron previamente desinfectadas como se menciona previamente, colocando cinco semillas por frasco de manera cuidadosa para no sumergir las semillas en el medio, todo esto se realiza en condiciones de esterilidad. Posterior a la siembra, los frascos se colocaron en un cuarto de cultivo (27 °C, 16 horas luz por 8 de oscuridad), 3 días después de la siembra, se contabilizaron las semillas germinadas y los casos de contaminación, para evaluar el porcentaje de germinación y contaminación.

4.4 Cultivo de *R. radiobacter* transformado con el vector pCAMBIA1301

En campana de flujo laminar vertical (CV-2 Ecoshel), una colonia previamente transformada de *Rizhobium radiobacter* transformada con el vector pCAMBIA 1301 por el método de congelación/descongelación fue colocada en 30 mL de medio YEB líquido (Yeast Extraction Beff de(Phytotech, CAT Y8575), adicionada con antibióticos, los cuales fueron kanamicina 100 mg/L (Goldbio CAT k-120-5) y rifampicina 50 mg/L (Biobasic CAT R00808) dejando 36 h en constante agitación a 200 rpm (revoluciones por minuto) y a una temperatura de 27 °C, en total oscuridad para su crecimiento.

Para la verificación se realizó la extracción del ADN plasmídico por medio del protocolo de lisis alcalina (Sambrook J. et al., 1989), para lo cual se tomó una muestra de 1 mL del cultivo de *Rhizobium r.* en microtubos de 1.5 mL, los cuales se centrifugaron a 14,000 rpm (revoluciones por minuto) por 5 min para decantar el sobrenadante y agregando 150 µL de la solución I (25 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8) para la resuspensión, con ayuda del agitador tipo vortex se resuspendió el pellet formado, posterior a esto se agregaron 200 µL de la solución II ((0,2 N NaOH and 1% SDS) y se mezcló 4 veces por inversión, se agregaron 300 µl de la solución III (5M KOAc, 96% ácido acético) se mezcló por inmersión y se colocó en hielo por 10 min.

Después se centrifugó durante 10 min a 14,000 rpm, y se tomaron 400 µL del sobrenadante, el cual fue colocado en un nuevo tubo para poder agregar el mismo volumen de isopropanol frio, mezclando por inmersión 6 veces, dejando en hielo a -20 °C por 20 min. Posteriormente se centrifugó por 15 min y decantando el sobrenadante, para realizar un lavado agregando 600 µL de etanol al 70% frio y mezclando por inmersión así mismo se centrifugó por 5 min y decantando cuidadosamente para evitar que se caiga el pellet formado, este se dejó secar por al menos 4 horas.

Posteriormente con el ADN plasmídico se realizó una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) utilizando el estuche comercial GoTaq® Green Master Mix, Promega, USA con cebadores GUSF y GUSR ver Tabla 1 (Dündar, 2009), para corroborar que la secuencia del gen GUS estuviera presente se utilizó un termociclador Axygen® MaxyGene II, en la Tabla 2 se observan los componentes de la reacción, mientras que en la Tabla 3 se muestra el programa de la reacción. Los productos obtenidos fueron separados y visualizados por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, TAE1X, con un voltaje constante de 80V donde también se utilizó un marcador de peso molecular de 1kb para determinar las pares de bases de las bandas obtenidas y posteriormente ser visualizados en el fotodocumentador (Axygen® T100).

Tabla 1. *Secuencia de los cebadores utilizados GUS F, GUS R, KANF Y KANRR*

Nombre	Secuencia
GUS F	5' TCGTCCGTCCTGTAGAAA 3'
GUS R	3' TTCACCGAAGTTCATGCC 5'
KANF	5' CTAAAACAATTCATCCAGTA 3'
KANRR	3' ATGGCTAAAATGAGAATATC 5'

Tabla 2. *Componentes de la reacción de PCR para el vector pCAMBIA 1301*

Componentes	Volumen
Agua MQ	7 µL
Primer F (10 µM)	1 µL
Primer R (10 µM)	1 µL
pCAMBIA 1301	1 µL
Gotaq green master mix	10 µL
Volumen final	20 µL

Tabla 3. *Programa de PCR para amplificar GUS*

Pasos	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	94	5 min	1 ciclo
Desnaturalización	94	30 s	
Alineamiento	53	30 s	35 ciclos
Extensión	72	1 m	
Extensión	72	10 min	1 ciclo

4.5 Preparación del medio de cocultivo

Para la realización de este medio fue necesario preparar medio de cultivo MS (Phytotech CAT M5825), como previamente se describen este documento. El medio se esterilizo en la autoclave, y

se dejó enfriar a temperatura ambiente, posteriormente se agregó acetosiringona a 100 mM (Cayman Cat 23224), este es un compuesto fenólico que potencia a *R. radiobacter* a inducir la infección es decir transferir el T-ADN obteniendo más explantes transformados, una vez agregado se sirvió el medio en frascos de cultivo, dejando dos días en observación para prevenir contaminación y posteriormente utilizarlos.

4.6 Técnica de infección con *R. radiobacter* y cocultivo

Después de 36 horas de crecimiento de *R. radiobacter* en medio YEB (Phytotech, CAT Y8575, se centrifugó a 1000 rpm por cinco min, se descartó el sobrenadante y resuspendió con 30 ml de medio de cultivo MS basal líquido (Phytotech, CAS HAY0519275G). En total asepsia se seleccionaron las plántulas germinadas que se utilizarían, tomando los hipocótilos y los hipocótilos con peciolo principalmente, lesionando levemente haciendo de 3 a 4 incisiones en los explantes seleccionados y se sumergieron en la solución bacteriana de *R. radiobacter* por 15 min, posteriormente se dejaron secar en papel secante estéril por al menos 5 min para después sembrar en el medio de cocultivo preparado previamente. Este proceso se realizó con todos los explantes, excepto los testigos negativos, los frascos de cultivo con los explantes infectados se dejaron por 3 días en total oscuridad y a una temperatura de 27 °C.

4.7 Transferencia de explantes transformados

Después de tres días, los explantes infectados se transfirieron a dos tratamientos diferentes para el crecimiento de brotes y la selección de los explantes. El primer tratamiento consistió en medio de cultivo MS (Phytotech, CAT M582), adicionado con hormonas 6-Bencilaminopurina (6-BAP) (Sigma, CAS 1214-39-7) 4.44µM y ácido Naftalenoacetico (ANA) (Sigma CAS 86-87-3) 0.53µM, carbón activado (1g/L), los cuales se agregan antes de esterilizar y los antibióticos carbecilina (goldbio, CAT C-103-5) (250mg/L) e higromicina (goldbio, CAT H-270-1) (25mg/L),

que se agregan en campana de flujo laminar, antes de vaciar el medio debido ya que los antibióticos no se pueden esterilizar porque pierden su funcionalidad.

El segundo tratamiento consistió en medio de cultivo MS (Phytotech, CAT M582) adicionado con hormonas BAP 4.44 μ M y ANA 0.53 μ M, carbón activado (1g/L), los cuales se agregan antes de la esterilización y los antibióticos cefotaxima (goldbio, CAT C-104-5) (250mg/L) e higromicina (goldbio, CAT H-270-1) (25mg/L), se realizan los mismos pasos que con el anterior medio.

Los explantes permanecieron por 15 días en un periodo de 16 hrs/8hrs (luz/oscuridad) a una temperatura de 27 °C, para su crecimiento y formación de brotes, realizándoles un cambio de medio a los 10 días.

4.8 Extracción de ADN genómico de explantes transformados

Seleccionando los explantes infectados totalmente al azar sanos, se tomó toda la muestra para realizar la extracción de ADN, por el método CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio), para lo cual se utilizó la solución de CTAB comercial de (Biosciences CAT 786-565). La solución fue precalentada a 60 °C por 20 en la campana de flujo laminar vertical CV-2 Ecoshel se seleccionaron los explantes de nuestro interés, y se colocaron en un mortero para su molienda al cual se le agrego 500 μ L de CTAB (Biosciences CAT 786-565), una vez agregado este se comenzó la maceración hasta que el tejido se deshizo por completo, posteriormente se pasó a un microtubo de 1.5 mL estéril, este se incubo durante 30 min en el incumix Select Bioproducts mezclándolo ocasionalmente.

Al finalizar el tiempo se le agregó 0.6 volúmenes de 24:1 (cloroformo: alcohol isoamílico a cada muestra y se mezclaron por inmersión durante 15 min para después centrifugar por 10 min a 15000 rpm, obteniendo la fase acuosa la cual se transfirió a un nuevo microtubo de 1.5 mL,

recuperando 300 μ L a esto se le agrego 0.6 volúmenes de isopropanol a cada una de las muestras y se centrifugaron por 8 min a 15000 rpm, lo cual nos ayudó a precipitar el ADN formando un pellet.

Por último, se realizaron lavados con etanol al 70 % para eliminar cualquier residuo de la última solución utilizada, para el primer lavado se le agregaron 400 μ L posteriormente centrifugó por 5 min a 15000 rpm, se decantó el sobrenadante y se realizó el segundo lavado con etanol al cual se le agrego 200 μ L de etanol al 70 % y se centrifugó por 3 min a 15000 rpm decantando el sobrenadante y dejando secar.

Como control negativo se seleccionaron plántulas de col no transformado y una planta externa al experimento para realizar la extracción de ADN por el método antes mencionado. Las muestras de ADN genómico obtenido fueron visualizadas por medio de electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. TAE 1X, a un voltaje constante de 80V para la verificación de una correcta extracción y visualizando en el fotodocumentador (Axygen® T100).

4.9 PCR de confirmación de la transformación y electroforesis

A partir del ADN genómico extraído de los explantes infectados se realizó una PCR con el kit comercial GoTaq® Green Master Mix, Promega, USA con cebadores GUS F y GUS R, como controles para esta PCR se incluyeron el ADN genómico de col no transformado, el ADN genómico de la planta externa al experimento, agua ultrapura en lugar de ADN y usando el vector pCAMBIA 1301 como sustrato, utilizando el termociclador Axxygen® MaxyGene II para amplificar las muestras, en la Tabla 3 podemos observar el programa de la reacción.

Los productos obtenidos se separaron en una electroforesis en gel de agarosa al 1% a un voltaje constante de 70V y visualizados en el fotodocumentador (Axygen® T100). Tomando en

cuenta las muestras que dieron positivas a la prueba de PCR se determinó el porcentaje de éxito de esta transformación.

Además de la reacción de amplificación anterior, también se realizó otra utilizando el ADN genómico utilizando los cebadores KANF y KANRR, los cuales son específicos para el gen aminoglucósido 3'-fosfotransferasa II (gen de resistencia a la kanamicina) ver Tabla 1, utilizando los mismos controles antes mencionados y los productos obtenidos se separaron en una electroforesis en gel de agarosa al 1% a un voltaje constante de 70V y visualizados en el fotodocumentador (Axygen® T100).

V.

V. Resultados y discusión

5.1 Porcentaje de germinación y de contaminación

El protocolo utilizado para la desinfección de semillas demostró alta eficacia. Tres días posteriores a la siembra se observó la germinación de las semillas y la ausencia de contaminación, en el cultivo in vitro (figura 6). En cuanto a los porcentajes de germinación se obtuvo una tasa del 95 %, lo cual indica la buena calidad de la semilla utilizada, y el porcentaje de contaminación fue del 0 %, se observó que el proceso de desinfección es el adecuado ya que no se presentó ningún tipo de contaminación en los medios de cultivo. Cabe mencionar que el medio de germinación no cuenta con ningún antibiótico añadido.

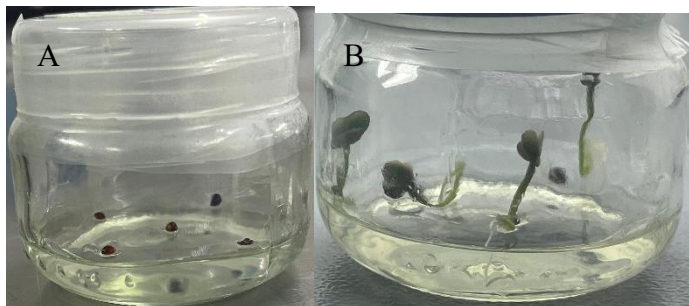


Figura 6. Siembra de semillas de col A) día 1 de la siembra; B) 3 días de la siembra, no presenta contaminación.

Previamente se han documentado diferentes protocolos de desinfección para diferentes semillas, como el reportado por (Calana-Janeiro et al., 2019), quienes compararon diferentes tratamientos utilizando hipoclorito de sodio a varias concentraciones, en el cual las semillas se sumergieron en hipoclorito de sodio a 1.25%, 2.5% y 5%, posterior a esto se realizaron enjuagues en agua destilada estéril para eliminar cualquier residuo de hipoclorito de sodio, las evaluaciones de la germinación se llevaron a cabo a los 7, 14 y 21 días esto con la finalidad de evaluar el índice de contaminación, germinación y crecimiento de las plántulas, dando como resultado que el 100% de

desinfección y de germinación la obtuvieron del tratamiento de hipoclorito de sodio al 5% por 1 minuto, esto en comparación a sus controles negativos los cuales no tuvieron una diferencia significativa en cuanto a crecimiento de las plántulas. La mayoría de los métodos de desinfección utilizan hipoclorito de sodio por su amplia disposición y economía, y las evaluaciones realizadas son con el objetivo de determinar los tiempos óptimos de exposición para la desinfección total sin afectar la viabilidad de las semillas.

Existen otras sustancias que se utilizan para desinfección de semillas, como lo son el peróxido de hidrógeno, hipoclorito de calcio, sulfato de cobre y cloruro de mercurio II, de los cuales el mejor tratamiento para la desinfección de semillas es el peróxido de hidrogeno al 3% en combinación con el sulfato de cobre y la solución de cloruro de mercurio II 0.1%, teniendo un 100% de desinfección y una germinación de hasta el 90%, dependiendo de la especie utilizada (Aguilar-Rito et al., 2023).

5.2 Resultados de la verificación de *R. radiobacter*

La extracción de ADN plasmídico por el método de lisis alcalina (Figura 7), permitió obtener material genético con la calidad suficiente para realizar la amplificación por PCR. El ensayo de amplificación tuvo la finalidad de identificar que nuestra que el vector extraído contiene el gen GUS, el cual resulta ser un sello distintivo del vector pCambia 1301 no modificado.

El producto de la amplificación utilizando los cebadores GUSR Y GUSF, como puede verse en Figura 8, resultó en un amplicón del tamaño esperado de 2000 pb, dicho tamaño puede ser corroborado con el mapa genético del vector pCambia 1301 Figura 3. El tamaño del amplicón obtenido, la especificidad de los cebadores utilizados y la capacidad de la cepa bacteriana para crecer en medio suplementado con Kanamicina/rifampicina permitió confirmar la identidad de la cepa

bacteriana transformada con el vector correcto y por lo tanto es el adecuado para realizar el proceso de infección, ver Figura 8.

Durante décadas de realizar transformación genética de plantas, se han desarrollado diversas cepas “desarmadas” de *R. radiobacter*, las cuales presentan modificaciones que facilitan la generación de plantas transgénicas. Estas cepas se caracterizan por su capacidad de propagarse en medios de cultivo suplementados con antibióticos específicos para su selección. La rifampicina permite el crecimiento bacteriano debido a que la resistencia a este antibiótico se encuentra codificada en el genoma de la bacteria (Erickson et al., 2014). Por otro lado, la resistencia a la kanamicina es conferida mediante el vector de transformación, lo que garantiza la selección exclusiva de las bacterias que portan el constructo de interés (Takara BIO Inc.).

En este trabajo se utilizó la cepa *R. radiobacter* LBA4404 de la casa comercial Clontech™, actualmente parte de Takara Bio™, según el fabricante, esta cepa esta optimizada para la transformación vía electroporación, sin embargo en un trabajo previo, se llevó a cabo el cultivo de esta misma cepa, perdiendo la capacidad electrocompetente, el cultivo resultante fue a su vez tratado con cloruro de calcio para darle capacidad competente por medio del método de congelación y descongelación (freezer and thaw) (Mazzola et al., 2007).

La cepa de *R. radiobacter* por si sola esta tiene la capacidad de colonizar tejidos vegetales dañados, además de tener la capacidad de transferir e integrar material genético en las células vegetales de manera natural, lo que provoca una enfermedad conocida como agalla de corona, esta capacidad es de las más importantes de esta bacteria la cual depende de la presencia de un plásmido Ti, el cual es material extracromosomal responsable de la transferencia de ADN hacia la planta hospedera, este plásmido Ti fue modificado por medio de ingeniería genética eliminando los genes que provocan la formación de tumores y conservando solamente las regiones que transfieren el T-

ADN, cuando *R. radiobacter* contiene un vector binario adquiere la capacidad de transferir genes específicos de gran interés, como lo son genes de resistencia a enfermedades o plagas, expresión de genes reporteros como Gus, también estos vectores suelen tener marcadores de selección, es decir resistencia a antibióticos los cuales permiten seleccionar a las plantas transformadas (Holsters et al., 1978).

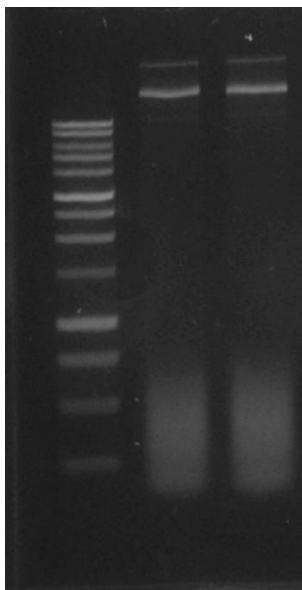


Figura 7. Extracción de ADN plasmídico de *R. radiobacter*

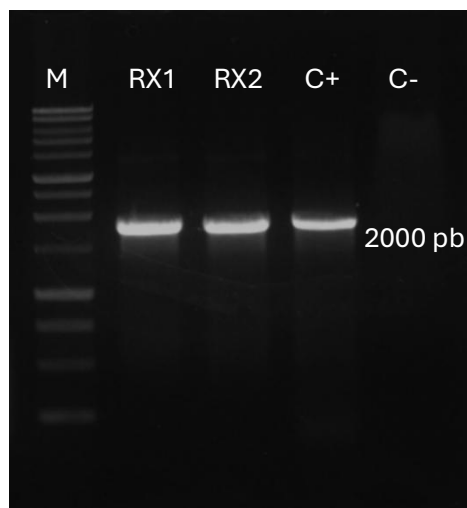


Figura 8. Resultados de la PCR utilizando como sustrato RX1) y RX2) ADN plasmídico de GUS, C+) vector, C-) control negativo y M) marcador de 1kb

5.3 Obtención de los explantes

Los explantes utilizados para este proceso fueron obtenidos de plántulas que tenía al menos siete días de crecimiento (Figura 9) posteriores a la germinación, la evidencia previa (Li et al., 2021) sugiere que los explantes jóvenes facilitan que el proceso de infección se lleve a cabo correctamente, ver Figura 10, de los cuales se tomaron los hipocótilos e hipocótilos con peciolo, estos explantes tenían un tamaño aproximado de 1.5 cm, y se sembraron en un medio de cocultivo adicionado con acetosiringona el cual ayuda a la activación y expresión de los genes de virulencia de *R. radiobacter*.

Posteriormente se traspasaron a un medio de cultivo de selección y regeneración el cual contenía medio MS, antibióticos como higromicina, cefotaxima y hormonas BAP y NAA los cuales son importantes en este proceso ya que influyen directamente a la regeneración de los explantes principalmente en la formación de brotes, elongación de brotes y el enraizamiento, es importante mencionar que el proceso de regeneración dependerá de la concentración de estas hormonas ya que concentraciones muy bajas ayudan a que el proceso sea más rápido, mientras que concentraciones altas afectan la morfología de las raíces, también es importante tener en cuenta el origen del explantes utilizados ya que también influye en la regeneración (Baskar et al., 2016; Gerszberg, 2018).

Este medio se utiliza para seleccionar los explantes transformados de los no transformados, es decir los antibióticos tienen un papel fundamental tanto en la selección de tejidos transformados como en el control del crecimiento bacteriano después de la infección con *R. radiobacter*, comúnmente se utilizan antibióticos como cefotaxima para inhibir la síntesis de la pared celular bacteriana de *R. radiobacter* y así poder eliminar las bacterias remanentes. Mientras que el uso de Kanamicina se utiliza principalmente como un selector, es decir que va a permitir identificar y diferenciar los explantes infectados que han logrado integrar el ADN exógeno, de los explantes que

no lo han logrado (Takeshi Takasaki et al., 1997), Figura 10, los explantes se dejaron por 10 días y se realizó un cambio de medio esto se repitió constantemente hasta que se obtuvieron plantas, como se puede observar en la Figura 11.



Figura 9. Plantas germinadas con 7 días de crecimiento

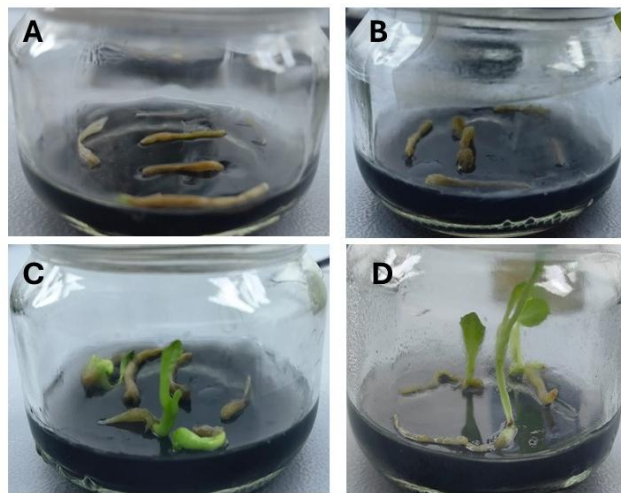


Figura 10. Transformación de dos tipos de explantes de col. A y B son hipocótilos 10 días después de la transformación. C y D son hipocótilos con peciolas a 10 y 20 de la transformación, respectivamente

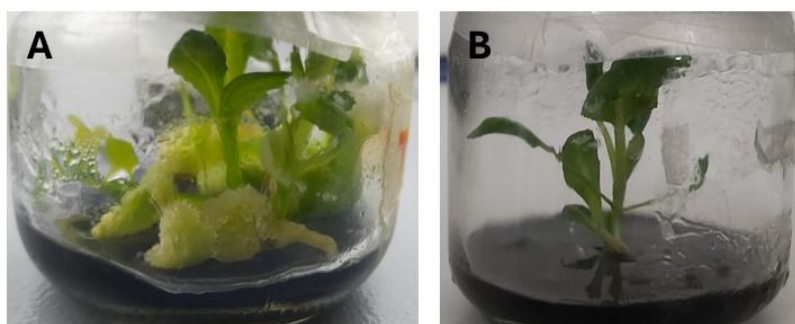


Figura 11. A) Inducción de callos y B) diferenciación en explantes de col

Existen diversos factores que pueden ayudar a que la transformación sea más eficiente como modificaciones en el proceso de infección estas pueden ser la manipulación del explante o la bacteria para aumentar su virulencia, estas manipulaciones actúan sobre el aumento de células vegetales competentes para la transformación a través de un precultivo, en cuanto a la bacteria también intervienen en la inducción de los genes virulencia añadiendo compuestos fenólicos como la acetosiringona. El estudio realizado por (Henzi et al., 2000) se desarrolla un protocolo eficiente para la transformación añadiendo algunos componentes bioquímicos, reportando una eficacia y optimización en la tasa de transformación del 33%.

La acetosiringona es una molécula que libera la planta de forma natural en respuesta a las heridas, al agregarse de forma sintética a los medios de cocultivo hace que se induzca la activación de *R. radiobacter* aumentando la capacidad de virulencia y ayudando a que comience el proceso de transferencia del ADN-T hacia el material genético de la planta, dando como resultado un mayor porcentaje de éxito en la transformación de plantas (Sheikholeslam & Weeks, 1987).

Experimentos realizados por (Baskar et al., 2016) indican el uso de explantes precultivados por 3 días a 21 °C en medio MS con hormonas BAP 3mg/L Y NAA 4mg/L en un ambiente controlado a 16/8 horas luz, horas oscuridad. La bacteria se sembró en medio con agar YEP por estriado agregando antibióticos como lo son kanamicina y rifampicina, dejando incubar por 2 días a 28 °C,

posterior a esto se cultivaron en medio líquido YEP para suspender la bacteria y utilizarlo para la infección, en la cual se sumergieron los explantes por 30 min los cuales se sembraron en medio MS con hormonas y acetosiringona por 3 días.

posterior a esto los explantes se transfirieron a un medio adicionado con carbecilina 250mg/L para la eliminación de *R. radiobacter* y higromicina 10mg/L para la selección de los explantes transformados, además de hormonas para la inducción de brotes y realizando trasplantes cada 15 días mostrando una considerable obtención callos y brotes, con una eficiencia de transformación del 15% lo cual indica una transformación efectiva y regeneración indirecta.

5.4 Resultados de la PCR de plántulas posibles transformantes

La extracción de ADN genómico de los posibles transformantes en conjunto de las plantas que servirían como controles positivos/negativos a través del método CTAB, ver Figura 12, permitió realizar la PCR utilizando los cebadores GUSF Y GUSRR que flanquean específicamente el gen GUS, como se puede ver Figura 8. La región del vector que fue transferida al explante hospedero, corroborando mediante una electroforesis en gel de agarosa realizando la amplificación del gen, lo que demuestra que la planta está transformada, debido a que la banda obtenida tiene mismo tamaño que la de nuestro control positivo de 2000 pb, además de corresponder con el tamaño esperado esto se puede ver en la Figura 13. además, poder visualizarlo en el mapa del vector, también podemos observar las regiones del borde izquierdo y el borde derecho, lo que nos indica que todo lo que se encuentra entre estas dos regiones son las únicas que se van a transferir a la planta hospedera esto se puede ver en la Figura 14. La PCR utilizando cebadores kanRR y kanF demostró que solo se insertó el gen GUS y no el vector completo como se puede ver en la Figura 15. Por otra parte, podemos observar en el mapa del vector la región que no se transfiere debido a que no es reconocida

por lo que se mantiene en la bacteria de esta forma se evita transferir características bacterianas no deseadas como la resistencia a la kanamicina Figura 16.

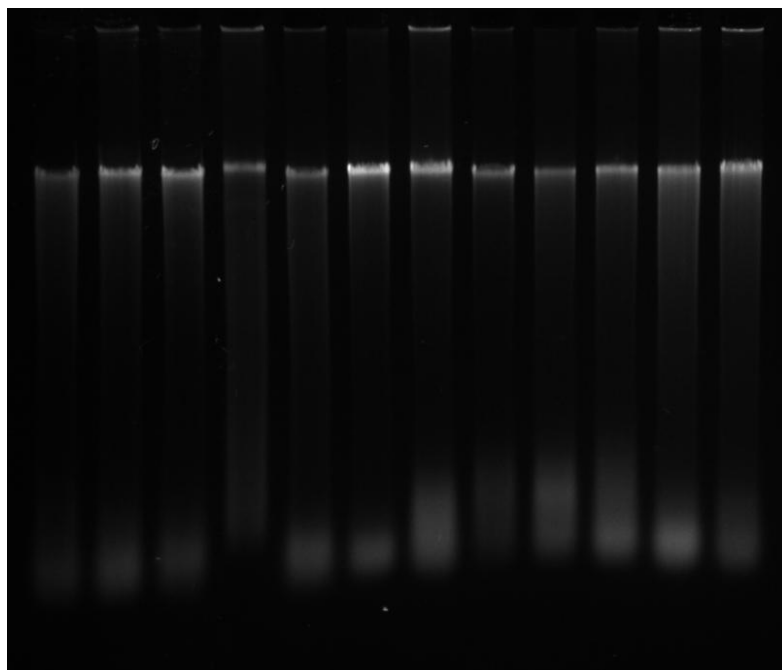


Figura 12. Extracción de ADN genómico de plántulas posibles transformantes por CTAB

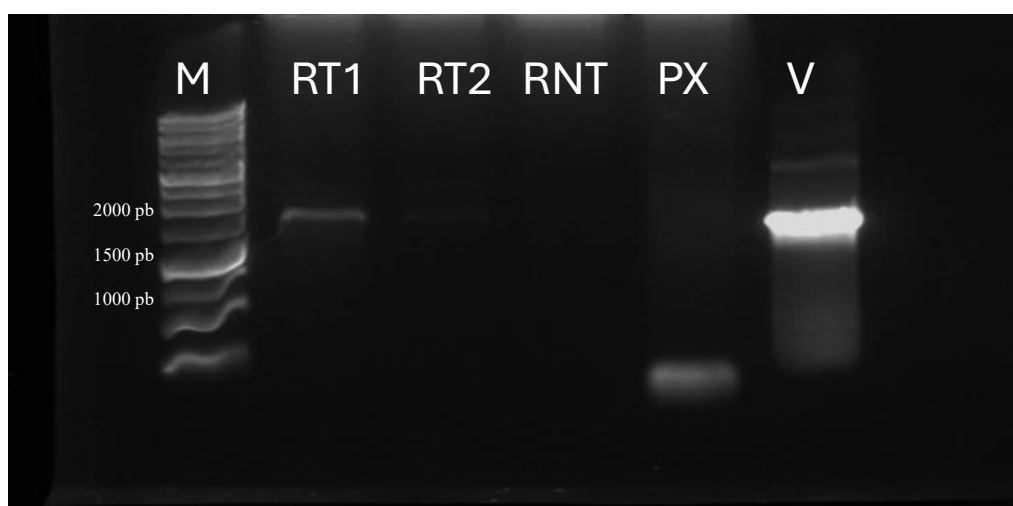
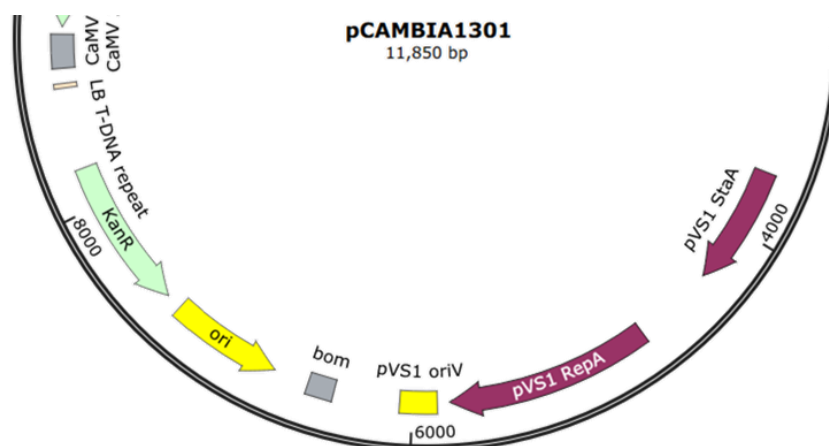


Figura 13. Electroforesis de los productos de PCR utilizando cebadores específicos para el gen *Gus*. M) marcador de 1 kb, RT1) productos de PCR utilizando genómico de col transformado, RT2) utilizando otra de col no transformado, RNT) de col no transformado



5.5 Importancia del establecimiento de la técnica, utilidad

Posteriormente, el vector recombinante fue introducido en células bacterianas competentes para su amplificación y mantenimiento, y subsecuentemente transferido a *R. radiobacter tumefaciens* mediante el método de choque térmico. Este paso fue determinante para establecer un

sistema eficiente de transformación mediada por *R. radiobacter*, el cual permitió la posterior transferencia del ADN de interés hacia células vegetales.

La transformación genética mediada por *R. radiobacter* constituye una estrategia ampliamente utilizada debido a su relativa simplicidad metodológica, reproducibilidad y menor requerimiento de infraestructura especializada, en comparación con métodos físicos como la biobalística. Este último, si bien es efectivo, implica el uso de equipos y reactivos específicos de alto costo, además de una mayor complejidad técnica. En contraste, el sistema basado en *R. radiobacter* facilita el seguimiento de cada etapa del proceso y representa una herramienta eficiente tanto para investigación como para formación académica.

No obstante, la eficiencia del proceso depende en gran medida del dominio de técnicas de cultivo in vitro, particularmente en lo referente a la micropropagación y regeneración de explantes en medio basal MS suplementado con reguladores de crecimiento y, cuando es necesario, antibióticos para la selección. La optimización de estas condiciones es crucial para garantizar la regeneración de plantas transformadas viables. Asimismo, la identificación de eventos transformados requiere la aplicación de herramientas moleculares, incluyendo la extracción de ADN genómico, amplificación mediante PCR con cebadores específicos y análisis por electroforesis, lo que permite confirmar la integración del transgén.

A pesar de las amplias perspectivas que ofrece esta tecnología para el mejoramiento genético de cultivos, su aplicación se encuentra sujeta a marcos regulatorios estrictos en diversos países, incluyendo México, donde existen restricciones relacionadas con la producción y comercialización de organismos genéticamente modificados. Estas regulaciones se fundamentan en preocupaciones sobre posibles efectos en la salud humana y el ambiente; sin embargo, diversos estudios han señalado

que la adopción de cultivos transgénicos puede contribuir a la reducción en el uso de insecticidas y pesticidas convencionales, disminuyendo así el impacto ambiental asociado a su aplicación.

En este contexto, el desarrollo y optimización de esta técnica sienta las bases para la futura incorporación de genes de interés agronómico, como el gen *CrVI*, asociado con resistencia a lepidópteros que afectan significativamente el rendimiento del cultivo. La introducción de este tipo de genes podría representar una estrategia sostenible para el manejo de plagas, incrementando la productividad y reduciendo pérdidas económicas.

VI. Conclusión

El establecimiento del protocolo de transformación genética en *Brassica oleracea* var. capitata representa un avance relevante dentro del campo de la biotecnología vegetal, particularmente para especies que presentan una baja eficiencia de transformación y alta recalcitrancia. La implementación de técnicas de cultivo in vitro, junto con la transformación mediada por *R. radiobacter tumefaciens*, permitió generar las condiciones necesarias para la obtención de explantes viables, su infección y posterior regeneración, sentando así una base metodológica sólida.

El uso del vector pCAMBIA1301 y del gen reportero β -glucuronidasa (GUS) facilitó la verificación de la transformación genética mediante herramientas moleculares como la PCR, lo que permitió identificar la presencia del gen en los tejidos analizados. Si bien la eficiencia de transformación observada se mantiene dentro de los rangos reportados en la literatura para esta especie, los resultados obtenidos confirman la viabilidad del protocolo implementado y evidencian que, a pesar de las limitaciones inherentes al cultivo, es posible lograr eventos de transformación exitosos bajo condiciones controladas.

Asimismo, el adecuado manejo de las etapas críticas del proceso, como la desinfección de semillas, la selección de explantes jóvenes y la optimización de las condiciones de cocultivo, fue determinante para minimizar la contaminación y favorecer la regeneración de tejidos transformados. Estos aspectos resaltan la importancia de la estandarización de cada fase del procedimiento para incrementar la reproducibilidad y eficiencia del sistema.

En conjunto, este trabajo no solo aporta un protocolo funcional para la transformación genética de *Brassica oleracea* var. capitata, sino que también establece una plataforma que puede

ser utilizada en futuras investigaciones orientadas a la introducción de genes de interés como lo es el gen CcV1. De esta manera, se contribuye al desarrollo de alternativas biotecnológicas que podrían impactar positivamente en la productividad y sostenibilidad de este cultivo de importancia económica y alimentaria.

VII. Literatura citada

- Aguilar-Rito, M. G., Arzate-Fernández, A. M., García-Núñez, H. G., & Norman-Mondragón, T. H. (2023). Establishment of an efficient protocol for in vitro disinfection of seeds of seven Agave spp. species. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 42(1). <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2310-1>
- An, G. (1987). [17] Binary ti vectors for plant transformation and promoter analysis. En *Methods in Enzymology* (Vol. 153, pp. 292–305). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)53060-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)53060-9)
- Andargie, M., Yang, C., & Li, J. (2016). Generation of β -glucuronidase reporter-tagged strain to monitor Ustilaginoidea virens infection in rice. *Journal of Microbiological Methods*, 131, 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.10.014>
- Atambo Daniel, K., Mwende Muindi, E., & Mbuvi Muti, S. (2023). Cabbage (Brassica oleracea) Production in Kenya: A Review of its Economic Importance, Ecological Requirement and Production Constraints. *International Journal of Plant & Soil Science*, 2023(18), 245–254. <https://doi.org/10.9734/IJPSS/2023/v35i183287i>
- Azizi-Dargahlou, S., & Pouresmaeil, M. (2023). Agrobacterium tumefaciens-Mediated Plant Transformation: A Review. *Molecular biotechnology*.
- Babula, D., Kaczmarek, M., Ziolkowski, P. A., & Sadowski, J. (2007). *Brassica oleracea*. <http://www.bioimages.org.uk>
- Baskar, V., Gangadhar, B. H., Park, S. W., & Nile, S. H. (2016). A simple and efficient agrobacterium tumefaciens-mediated plant transformation of brassica rapa ssp. Pekinensis. *3 Biotech*, 6(1). <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0402-1>
- Cai, C., Bucher, J., Bakker, F. T., & Bonnema, G. (2022). Evidence for two domestication lineages supporting a middle-eastern origin for Brassica oleracea crops from diversified kale populations. *Horticulture Research*, 9. <https://doi.org/10.1093/hr/uhac033>
- Calana-Janeiro, V. M., Izquierdo-Oviedo, H., Gonzalez-Cepero, M. C., Rodriguez-Llanes, Y., Rodriguez-Hernandez, M., & Horta-Fernandez, D. (2019). Disinfection of pepper seeds (Capsicum annuum L.) cultivar 'YAMIL' for in vitro implantation. *Cultivos Tropicales*, 40(3), NA-NA.
- Choi, S.-Y., Ro, H., & Yi, H. (2019). The First Step in Cloning. En *DNA Cloning: A Hands-on Approach* (pp. 29–66). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-024-1662-6_3
- Crosby JR, & Alfred W. (1972). *The Columbian Exchange: Biological and Cultural Consequences of 1492, 30th Anniversary Edition* (Bloomsbury Publishing USA, Ed.; reimpressa). Biological and Cultural Consequences of 1492.
- Day, P. R. (1996). Genetic modification of plants: significant issues and hurdles to success. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 63(4), 651S-656S. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/ajcn/63.4.651>

- Dias, J. S., & Ortiz, R. (2013). Transgenic vegetables for 21st century horticulture. *Acta Horticulturae*, 974, 15–30. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2013.974.1>
- Díaz Granados, C., & Chaparro-Giraldo, A. (2012). Métodos de transformación genética de plantas. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 15(1), 49–61.
- Dündar, E. (2009). Multiple GUS expression patterns of a single Arabidopsis gene. *Annals of Applied Biology*, 154(1), 33–41. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2008.00270.x>
- Ebert, P. R., Mitra, A., & Ha, S. B. (1988). Binary vectors. En *Plant Molecular Biology Manual* (Vol. 3, Número 988).
- Erie, L. J., French, O. F., Bucks, D. A., & Harris, K. (1982). Consumptive use of water by major crops in the southwestern United States. *Conservation research report*, (29).
- Everardo Zamora, P. (2015). *El cultivo de repollo*.
- Gelvin, S. B. (2003). Agrobacterium -Mediated Plant Transformation: the Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool . *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(1), 16–37. <https://doi.org/10.1128/mmbr.67.1.16-37.2003>
- Gelvin, S. B. (2009). Agrobacterium in the genomics age. *Plant Physiology*, 150(4), 1665–1676. <https://doi.org/10.1104/pp.109.139873>
- Gerszberg, A. (2018). Tissue culture and genetic transformation of cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata): an overview. En *Planta* (Vol. 248, Número 5, pp. 1037–1048). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2961-3>
- Guivarc’h, A., Caissard, J. C., Azmi, A., Elmayan, T., Chriqui, D., & Tepfer, M. (1996). In situ detection of expression of the gus reporter gene in transgenic plants: ten years of blue genes. En *Transgenic Research* (Vol. 5).
- Henzi, M. X., Christey, M. C., & Mcneil, D. L. (2000). Genetic transformation and hybridization Factors that influence Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. italica). En *Plant Cell Reports* (Vol. 19). Springer-Verlag.
- Holsters, M., de Waele, D., Depicker, A., Messens, E., van Montagu, M., & Schell, J. (1978). *Transfection and Transformation of Agrobacterium tumefaciens* (Vol. 163).
- Hussain, S. M., & Rathore, J. (2018). *Major diseases and pathogen ecology of cabbage*. <https://www.researchgate.net/publication/329360150>
- Huttly, A. (2009). Reporter genes. *Methods in Molecular Biology*, 478, 39–69. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-379-0_3
- Key, S., Ma, J. K. C., & Drake, P. M. W. (2008). Genetically modified plants and human health. En *Journal of the Royal Society of Medicine* (Vol. 101, Número 6, pp. 290–298). Royal Society of Medicine Press Ltd. <https://doi.org/10.1258/jrsm.2008.070372>

- Kikkert Julie R. and Vidal, J. R. and R. B. I. (2004). Stable Transformation of Plant Cells by Particle Bombardment/Biolistics. En L. Peña (Ed.), *Transgenic Plants: Methods and Protocols* (pp. 61–78). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-827-7:061>
- Komari, T., Takakura, Y., Ueki, J., Kato, N., Ishida, Y., & Hiei, Y. (2006). Binary Vectors and Superbinary Vectors. En K. Wang (Ed.), *Agrobacterium Protocols* (pp. 15–42). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59745-130-4:15>
- Komori, T., Imayama, T., Kato, N., Ishida, Y., Ueki, J., & Komari, T. (2007). Current status of binary vectors and superbinary vectors. En *Plant Physiology* (Vol. 145, Número 4, pp. 1155–1160). American Society of Plant Biologists. <https://doi.org/10.1104/pp.107.105734>
- Krassowska, W., & Filev, P. D. (2007). Modeling electroporation in a single cell. *Biophysical Journal*, 92(2), 404–417. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.094235>
- Leclercq, J., Szabolcs, T., Martin, F., & Montoro, P. (2015). Development of a new pCambia binary vector using Gateway® technology. *Plasmid*, 81, 50–54. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2015.07.003>
- Lee, L. Y., & Gelvin, S. B. (2008). T-DNA binary vectors and systems. En *Plant Physiology* (Vol. 146, Número 2, pp. 325–332). American Society of Plant Biologists. <https://doi.org/10.1104/pp.107.113001>
- Lee, Y. R., Siddique, M. I., Kim, D. S., Lee, E. S., Han, K., Kim, S. G., & Lee, H. E. (2023). CRISPR/Cas9-mediated gene editing to confer turnip mosaic virus (TuMV) resistance in Chinese cabbage (*Brassica rapa*). *Horticulture Research*, 10(6). <https://doi.org/10.1093/hr/uhad078>
- Leikei, H. (1988). *1.2 Cabbage (Brassica oleracea var capitata L.)*.
- Li, X., Li, H., Zhao, Y., Zong, P., Zhan, Z., & Piao, Z. (2021). Establishment of A Simple and Efficient Agrobacterium-mediated Genetic Transformation System to Chinese Cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *Horticultural Plant Journal*, 7(2), 117–128. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2021.01.006>
- Liu, C. W., Lin, C. C., Yiu, J. C., Chen, J. J. W., & Tseng, M. J. (2008). Expression of a *Bacillus thuringiensis* toxin (cry1Ab) gene in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.) chloroplasts confers high insecticidal efficacy against *Plutella xylostella*. *Theoretical and Applied Genetics*, 117(1), 75–88. <https://doi.org/10.1007/s00122-008-0754-y>
- Liu, H., Mao, B., Cui, P., Tian, T., Huang, C., Xu, X., & Zhou, W. (2013). Genetic modifications for pest resistance. En *Biotechnology of Crucifers* (Vol. 9781461477952, pp. 221–234). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7795-2_12
- Mabry, M. E., Turner-Hissong, S. D., Gallagher, E. Y., McAlvay, A. C., An, H., Edger, P. P., Moore, J. D., Pink, D. A. C., Teakle, G. R., Stevens, C. J., Barker, G., Labate, J., Fuller, D. Q., Allaby, R. G., Beissinger, T., Decker, J. E., Gore, M. A., & Pires, J. C. (2021a). The Evolutionary History of Wild, Domesticated, and Feral *Brassica oleracea* (Brassicaceae). *Molecular Biology and Evolution*, 38(10), 4419–4434. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab183>

- Mabry, M. E., Turner-Hissong, S. D., Gallagher, E. Y., McAlvay, A. C., An, H., Edger, P. P., Moore, J. D., Pink, D. A. C., Teakle, G. R., Stevens, C. J., Barker, G., Labate, J., Fuller, D. Q., Allaby, R. G., Beissinger, T., Decker, J. E., Gore, M. A., & Pires, J. C. (2021b). The Evolutionary History of Wild, Domesticated, and Feral *Brassica oleracea* (Brassicaceae). *Molecular Biology and Evolution*, 38(10), 4419–4434. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab183>
- Maggioni, L., von Bothmer, R., Poulsen, G., & Lipman, E. (2018). Domestication, diversity and use of *Brassica oleracea* L., based on ancient Greek and Latin texts. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 65(1), 137–159. <https://doi.org/10.1007/s10722-017-0516-2>
- Martin, T., Wöhner, R.-V., Hummel, S., Willmitzer, L., & Frommer, W. B. (1992). The GUS reporter system as a tool to study plant gene expression. *GUS protocols: using the GUS gene as a reporter of gene expression*, 23–43.
- Mazzola, L., Paull, R., Wolfe, J., Hebert, P., Sinkula, M., Luther, W., Kippen, H., Laskin, D., Yang, L., Watts, D. J. ; B. R., Pradeep, T., & Limbach, L. K. (2007). A modified freeze-thaw method for efficient transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. En *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol* (Vol. 93, Número 6).
- Mehier-Humbert, S., Bettinger, T., Yan, F., & Guy, R. H. (2005). Ultrasound-mediated gene delivery: Kinetics of plasmid internalization and gene expression. *Journal of Controlled Release*, 104(1), 203–211. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.01.011>
- Mérida, J. (2016). *Adaptabilidad de cultivares de repollo*.
- Milena, A., Fonseca, V., Rafael, ;, Isaza, A., & Kafuri, L. A. (2005). “Ingeniería genética natural aplicada”. *Revista facultad nacional de Agronomía de Medellín*, 58 (1), 2569–2585.
- Mpumi, N., Machunda, R. S., Mtei, K. M., & Ndakidemi, P. A. (2020). Selected insect pests of economic importance to *Brassica oleracea*, their control strategies and the potential threat to environmental pollution in Africa. En *Sustainability (Switzerland)* (Vol. 12, Número 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/su12093824>
- Nester, E. W. (2015). *Agrobacterium: Nature’s Genetic Engineer*. *Frontiers in Plant Science*, 5(JAN). <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00730>
- North, C. (1957). Studies in Morphogenesis of *Brassica oleracea* L. I. growth and development of cabbage during the vegetative phase. *Experimental botany*, Vol. 8, 304–312. <http://jxb.oxfordjournals.org/>
- Ozyigit, I. I. (2020). Gene transfer to plants by electroporation: methods and applications. *Molecular Biology Reports*, 47(4), 3195–3210.
- Park, B. J., Liu, Z., Kanno, A., & Kameya, T. (2005). Genetic improvement of Chinese cabbage for salt and drought tolerance by constitutive expression of a *B. napus* LEA gene. *Plant Science*, 169(3), 553–558. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.05.008>
- Patel, A. K., Joshi, D., Khan, A., Jaisval, G. K., Kumar, A., Pathania, R., Hasan, W., & Kushwaha, T. N. (2024). Biology, Diversity, Distribution, and Characterization of *Brevicoryne brassicae*

- (L.) Cabbage. *International Journal of Plant & Soil Science*, 36(3), 336–347. <https://doi.org/10.9734/ijpss/2024/v36i34431>
- R. A. Jefferson. (1989). The GUS reporter gene system. *Nature*, 342 (6251), 837–838.
- Rakoczy-Trojanowska, M. (2002). Alternative methods of plant transformation-a short review. en cellular & molecular biology letters. *Cellular & molecular biology letters*, 7, 849–858. <http://www.cmbi.org.pl>
- Rivera, A. L., Gómez-Lim, M., Fernández, F., & Loske, A. M. (2012). Physical methods for genetic plant transformation. En *Physics of Life Reviews* (Vol. 9, Número 3, pp. 308–345). <https://doi.org/10.1016/j.plrev.2012.06.002>
- Sakata. (2016). *Semilla de Repollo Sakata Variedad Royal Vantage*. www.sakata.com.mx
- Sambrook J., Fritsch E. F., & Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning A Laboratory Manual Second Edition Sambrook* (second edition).
- Šamec, D., Piljac-Žegarac, J., Bogović, M., Habjanič, K., & Grúz, J. (2011). Antioxidant potency of white (*Brassica oleracea* L. var. capitata) and Chinese (*Brassica rapa* L. var. pekinensis (Lour.)) cabbage: The influence of development stage, cultivar choice and seed selection. *Scientia Horticulturae*, 128(2), 78–83. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.01.009>
- Sharma, S., Gambhir, G., & Srivastava, D. K. (2014). High frequency organogenesis in cotyledon and hypocotyl explants of cabbage (*Brassica oleracea* L. Var. capitata). *National Academy Science Letters*, 37(1), 5–12. <https://doi.org/10.1007/s40009-013-0191-6>
- Sheikholeslam, S. N., & Weeks, D. P. (1987). Acetosyringone promotes high efficiency transformation of *Arabidopsis thaliana* explants by *Agrobacterium tumefaciens*. En *Plant Molecular Biology* (Vol. 8).
- Sheng, X., Yu, H., Wang, J., Shen, Y., & Gu, H. (2022). Establishment of a stable, effective and universal genetic transformation technique in the diverse species of *Brassica oleracea*. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1021669>
- Shimoda, N., Toyoda-Yamamoto, A., Aoki, S., & Machida, Y. (1993). Genetic evidence for an interaction between the VirA sensor protein and the ChvE sugar-binding protein of *Agrobacterium*. *Journal of Biological Chemistry*, 268(35), 26552–26558. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)74348-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)74348-8)
- SIAP. (2024). *Entre col y col, comí como caracol _ Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera _ Gobierno _ gob.mx*.
- Suzuki, K., Tanaka, K., Yamamoto, S., Kiyokawa, K., Moriguchi, K., Yoshida, K., Suzuki, K., Tanaka, K., Yamamoto, S., Kiyokawa, K., Moriguchi, K., & Yoshida, K. (2008). *Ti and Ri Plasmids*. https://doi.org/10.1007/7171_2008_22
- Takeshi Takasaki, Katsunori Hatakeyama, Kunihiro Ojima, Masao Watanabe, Kinya Toriyama, & Kokichi Hinata. (1997). Factors influencing *Agrobacterium* -mediated transformation of *Brassica rapa* L. *Breeding Science*, 47, 127–134.

- Thompson, T. L., Doerge, T. A., Godin, R. E., Thompson, T. L., & Godin, R. E. (2000). *DIVISION S-8-NUTRIENT MANAGEMENT & SOIL & PLANT ANALYSIS Nitrogen and Water Interactions in Subsurface Drip-Irrigated Cauliflower: I. Plant Response*.
- Treccarichi, S., Ben Ammar, H., Amari, M., Cali, R., Tribulato, A., & Branca, F. (2023). Molecular Markers for Detecting Inflorescence Size of *Brassica oleracea* L. Crops and *B. oleracea* Complex Species (n = 9) Useful for Breeding of Broccoli (*B. oleracea* var. *italica*) and Cauliflower (*B. oleracea* var. *botrytis*). *Plants*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/plants12020407>
- Tseng, M. J., Yang, M. Te, Chu, W. R., & Liu, C. W. (2014). Plastid transformation in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.) by the biolistic process. *Methods in Molecular Biology*, 1132, 355–366. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-995-6_23
- Vanjildorj, E., Song, S. Y., Yang, Z. H., Choi, J. E., Noh, Y. S., Park, S., Lim, W. J., Cho, K. M., Yun, H. D., & Lim, Y. P. (2009). Enhancement of tolerance to soft rot disease in the transgenic Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) inbred line, Kenshin. *Plant cell reports*, 28(10), 1581–1591. <https://doi.org/10.1007/s00299-009-0757-4>
- Weinberger, K., & Srinivasan, R. (2009). Farmers' management of cabbage and cauliflower pests in India and their approaches to crop protection. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 12(4), 253–259. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2009.08.003>
- Ziemienowicz, A. (2014). Agrobacterium-mediated plant transformation: Factors, applications and recent advances. En *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* (Vol. 3, Número 4, pp. 95–102). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.10.004>