



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Transformación de cloroplastos de lechuga con tres
genes sintéticos de protegrinas con actividad
antimicrobiana”**

Tesis que presenta

Omar Patiño Rodríguez

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Director de Tesis:

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

San Luís Potosí, S.L.P., Julio de 2007



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "Transformación de Cloroplastos de Lechuga con 3 Genes Sintéticos de Protegrinas con Actividad Antimicrobiana" presentada para obtener el Grado de de Maestro(a) en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Omar Patiño Rodríguez** y aprobada el **04 de 07 de 2007** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Angel G. Alpuche Solís
(Director/Codirector de la tesis)

Dr. Gerardo Argüello Astorga
(Director/Codirector/Asesor de la tesis)

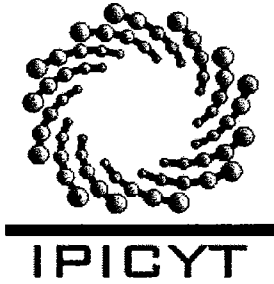
Dr. Roberto Montes de Oca Luna
(Asesor de la tesis)



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del **Dr. Ángel G. Alpuche Solís**.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología No. **201862**.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 035 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 4 días del mes de julio del año 2007, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga	Presidente	IPICYT
Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís	Secretario	IPICYT
Dr. Roberto Montes de Oca Luna	Sinodal externo	UANL

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Omar Patiño Rodríguez

sobre la Tesis intitulada:

Transformación de Cloroplastos de Lechuga con 3 Genes Sintéticos de Protegrinas con Actividad Antimicrobiana

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

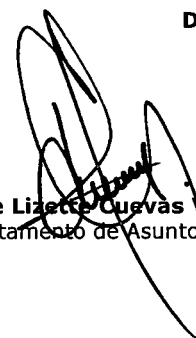
El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 14:35 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 4 días del mes julio de 2007.


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico


L.C.C. Ivonne Lizette Cuevas Velez
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares



Dedicatoria

“Quisiera dedicar el fruto de mi trabajo a Dios que me ha permitido la vida y continuar en lo que más me gusta hacer, a mi esposa Aída que ha sido mi compañera en las buenas y en las malas, así como a toda mi familia que me ha apoyado y creído en mí”

Agradecimientos

De manera muy especial quisiera agradecer al **Dr. Ángel G. Alpuche Solís**, por haberme permitido estar en su distinguido grupo de trabajo así como brindarme su apoyo para realizar mi maestría, ya que aprendí grandes cosas que me han ayudado a madurar personal y académicamente. Al **Dr. Gerardo Argüello Astorga**, **Dr. Sergio Casas Flores**, **Dr. Francisco Jiménez Bremont**, por su amistad y apoyo en los momentos más difíciles, así como sus consejos que me guiaron por el camino correcto. Al **Dr. Roberto Montes de Oca Luna**, por sus comentarios y sugerencias que contribuyeron a mi formación académica y científica.

A los técnicos del laboratorio: **Rosalba Castillo** y **Salvador Ambriz**, por su ayuda y amistad, al igual que a **Vero Zarate** y a **Elvira Hernández**.

A mis compañeros, que con su apoyo y consejos me permitieron lograr terminar mi trabajo: **Ruth Elena Soria**, **Sergio Rosales**, **Areli Herrera**, **Silvia Flores**, **Victoria Lima**, **Luzmila Martínez**.

A todos mis compañeros del laboratorio 1 que hacían del trabajo algo muy divertido y ameno: **Aída Araceli Rodríguez**, **Elida Gómez**, **Alejandro Juárez**, **Josefat Gregorio**, **Bernardo Bañuelos**, **Armando Mauricio**, **Sandra Pérez**, **Edith Uresti**, **Mariana Cantú**, **Aurora Londoño**, **Miguel Ángel Salas**, **Iliana Torres**, **Mayté Cervantes**, **Miguel Ángel Silva**, **Alfonso Toro**, **Zaira Delgado**, **Aremiza Bernal**, **Marcela López**, **Yair Cárdenas**, **Sra. Rosa Maria Cruz**.

ÍNDICE

	Pág.
Portada	i
Constancia de aprobación de tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimiento	v
Índice	vi
Lista de tablas	xi
Lista de figuras	xii
Resumen	xiv
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Enfermedades infecciosas como problema de salud pública	1
1.2 Resistencia a antibióticos y problemas para controlar infecciones	3
1.3 Péptidos antimicrobianos como alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas	4
1.3.1 Defensinas	5
1.3.2 Catelicidinas	6
1.3.2.1 Protegrinas	7
1.4 Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos	10
1.5 Aplicaciones clínicas de los péptidos antimicrobianos	11
1.6 Uso de la agrobiotecnología para la transformación de plantas	12
1.7 Utilidad del cultivo de tejidos en la transformación vegetal	13
1.8 Transformación de cloroplasto	14

1.8.1 Organización del genoma y principios de la transformación de cloroplasto	14
1.8.2 Diseño de vectores para la transformación de cloroplasto	16
1.8.3 Métodos de transformación de cloroplastos	17
1.8.3.1 Transformación por bombardeo de partículas	18
1.8.3.2 Transformación vía protoplastos	19
1.8.4 Sistemas de eliminación del gen de resistencia	20
1.8.5 Aplicaciones de la transformación de cloroplastos	21
1.9 Usos comerciales de la producción de proteínas recombinantes	23
1.10 Características del modelo vegetal <i>Lactuca sativa</i> (lechuga)	26
1.10.1 Expresión de proteínas recombinantes en cloroplastos de lechuga	26
II. OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo general	29
2.2 Objetivos específicos	29
III. JUSTIFICACIÓN	30
IV. MATERIAL Y EQUIPO	32
4.1 Material biológico	33
4.2 Vectores utilizados	34
4.3 Reactivos y suplementos	35
4.4 Equipo	39
V. METODOLOGÍA	41
5.1 Preparación de soluciones y medios de cultivo	42
5.1.1 Medios de cultivo para plantas	42
5.1.2 Vitaminas para medios de cultivo	43
5.1.3 Preparación de antibióticos, reguladores de crecimiento y agentes antioxidantes	43

5.1.3.1	Antibióticos	43
5.1.3.2	Reguladores de crecimiento	44
5.1.3.3	Agentes antioxidantes	44
5.1.4	Preparación de medios de cultivo para bacterias	44
5.1.5	Preparación de soluciones	45
5.2	Soluciones Bradford para cuantificación de proteínas	45
5.3	Aislamiento y purificación de ADN	46
5.3.1	Extracción de ADN plasmídico de <i>E.coli</i>	46
5.3.2	Extracción de ADN plasmídico de <i>E.coli</i> en grandes cantidades (Maxiprep)	47
5.3.2.1	Maxiprep modificado de Sambrook y col. (1989)	47
5.3.4	Extracción de ADN de plantas	48
5.4	Métodos de cuantificación de ADN	48
5.5	Amplificación de ADN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	49
5.6	Manipulación enzimática del ADN	51
5.6.1	Reacciones de digestión y purificación de ADN	51
5.6.1.1	Digestión para caracterización de clonas positivas	51
5.6.1.2	Purificación de fragmentos de ADN, a partir de un producto de digestión	51
5.6.2	Reacciones para generar extremos romos	51
5.6.3	Reacciones de ligación y purificación	52
5.7	Transformación de <i>E. coli</i> con los plásmidos recombinantes	52
5.7.1	Preparación de células calcio competentes	52
5.7.2	Método de transformación mediante choque térmico	53
5.8	Ensayos de detección de péptidos recombinantes en <i>E.coli</i>	53
5.8.1	Extracción de proteínas	53
5.8.2	Análisis electroforético en geles de SDS-poliacrilamida de las proteínas totales solubles	54
5.8.3	Condiciones de electroforesis	55
5.8.4	Tinción de los geles con azul de Coomasie	55

5.9 Métodos de transformación en plantas	56
5.9.1 Esterilización y germinación de semillas	56
5.9.2 Transformación de cloroplastos de tabaco y lechuga mediante biobalística	56
5.9.3 Preparación de la suspensión de micropartículas de oro	56
5.9.4 Preparación de material para el bombardeo	57
5.9.5 Cobertura de microacarreadores con ADN	57
5.9.6 Preparación del material biológico	58
5.9.7 Bombardeo del material biológico de tabaco y lechuga	58
5.10 Ensayos de actividad biológica de plantas transgénicas	59
5.10.1 Extracción de proteína total soluble de tejidos vegetales	59
5.10.2 Ensayos de inhibición bacteriana en placa	59
5.10.2.1 Método de antibiograma	60
5.10.2.2 Preparación del inóculo	60
5.10.2.3 Aplicación de los discos a las placa inoculadas	61
5.10.2.4 Lectura de las placas e interpretación de los resultados	61

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	62
6.1 Análisis de los genes antimicrobianos	63
6.2 Construcción de vectores bicistrónicos para bombardeo de tabaco	66
6.3 Construcción de vectores bicistrónicos de recombinación homóloga para la transformación de lechuga por biobalística	73
6.4 Análisis de la orientación de las clonas transformantes para el vector pADCt	78
6.5 Análisis del funcionamiento de las construcciones en <i>E. coli</i>	82
6.5.1 Funcionalidad del gen de selección a espectinomycin (<i>aadA</i>) en <i>E. coli</i> .	83
6.5.2 Análisis electroforético de las proteínas producidas por los vectores bicistrónicos en <i>E. coli</i>	84
6.6 Transformación de cloroplastos de lechugas y tabaco por el método de	86

bombardeo de partículas (biobalística)	
6.6.1 Selección de brotes transplastómicos	86
6.7 Análisis por PCR de los brotes transformantes	89
6.7.1 Análisis de la integración del transgén al genoma de cloroplasto	89
6.8 Ensayos <i>in vitro</i> de la actividad antimicrobiana	91
VII. CONCLUSIONES	94
VIII. PERSPECTIVAS	96
IX. BIBLIOGRAFÍA	98
X. APÉNDICE	109
10.1 Medios de cultivo para plantas	110
10.2 Vitaminas para plantas	111
10.2.1 Vitaminas del medio RMOP (Necesarios para <i>Nicotiana tabacum</i>)	111
10.2.2 Vitaminas B5 (Necesarias para <i>Lactuca sativa</i>)	111
10.2.3 Vitaminas MS	111
10.3 Medios de cultivo para lechuga y tabaco	112
10.3.1 Medios de cultivo para lechuga (<i>Lactuca sativa</i>)	112
10.3.2 Medios para tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)	112

LISTA DE TABLAS

No.	Nombre	Pág.
1	Actividad antimicrobiana de las protegrinas	9
2	Transformación de cloroplastos de plantas superiores	18
3	Producción heteróloga de péptidos antimicrobianos en plantas	24
4	Condiciones para la amplificación mediante PCR	50
5	Temperaturas utilizadas en la PCR	50
6	Resumen de resultados de los disparos con las construcciones generadas	88

LISTA DE FIGURAS

No.	Nombre	Pág.
1	Principales causas de muerte en países en desarrollo.	3
2	Ilustración de productos génicos de catelicidinas.	7
3	Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos.	10
4	Transformación del genoma de cloroplasto por dos eventos de recombinación homóloga.	17
5	Representación esquemática del sistema de eliminación del gen de resistencia.	21
6	Homología entre las tres protegrinas seleccionadas (PG1, PG3cc y PG-IB367)	63
7	Oligos para la secuenciación de los genes monocistrónicos	65
8	Vectores monocistrónicos para co-bombardío de tabaco	67
9	Digestión del vector pKCZ-P5'UTR- <i>aadA</i> con <i>EcoRI</i> y <i>KpnI</i> , para dar un fragmento de 1295 pb.	68
10	Oligonucleótidos para la amplificación del gen de selección a espectinomycin (<i>aadA</i>).	68
11	PCR de colonia para el vector pKCZ-UbPG1 bic.	69
12	Análisis de restricción del vector bicistrónico pKCZ-UbPG1 bic.	69
13	PCR de colonia para el vector bicistrónico pKCZ-UbPG3cc bic.	70
14	Análisis de restricción del vector bicistrónico pKCZ-UbPG3cc bic.	70
15	PCR de colonia para el vector pKCZ-UbIB367 bic.	71
16	Análisis de restricción del vector bicistrónico pKCZ-UbIB367 bic.	71
17	Mapa de restricción del vector bicistrónico.pKCZ-UbPG.	72
18	Construcción bicistrónica de las protegrinas.	73
19	Estrategia para la generación de vectores para recombinación homóloga conteniendo las construcciones bicistrónicas para la transformación de cloroplastos de lechuga.	74
20	Generación de la construcción bicistrónica en el vector pADCt-6.	75
21	PCR de colonia para el vector pADCt-PG1 bic.	76
22	PCR de colonia para el vector pADCt-PG3cc bic.	76
23	PCR de colonia para el vector pADCt-PGIB367 bic.	77
24	Oligonucleótidos usados para la amplificación de las regiones 16S- <i>trnI-trnA</i> -23S del genoma de cloroplasto de lechuga.	78
25	Orientación correcta del cassette de expresión para el vector pADCt-6.	78
26	Diagrama de ubicación de oligonucleótidos para realizar el análisis de orientación de la inserción del cassette de expresión.	79
27	Análisis de orientación de la construcción con la protegrina 1 mediante PCR.	80

28	Análisis de orientación de las construcciones de protegrinas en pADCt.	81
29	Mapa de restricción del vector pADCt-PG bic para la transformación de cloroplastos de lechuga.	81
30	Análisis de la expresión del gen <i>aadA</i> en <i>E. coli</i> .	83
31	Fracción soluble de proteínas totales de <i>E. coli</i> .	85
32	Brotes obtenidos de callos de lechuga.	87
33	Brotes posiblemente transplstómicos provenientes de hojas de lechuga de 2.5 meses después del bombardeo.	88
34	Identificación de brotes transplastómicos por PCR.	90
35	Resultados del ensayo antimicrobiano de los extractos proteicos de los callos transplastómicos de lechuga.	92

Capítulo 1
INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Enfermedades infecciosas como problema de salud pública

Las enfermedades infecciosas son la primer causa de muerte a escala mundial según lo reportado por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2000). El incremento de las enfermedades infecciosas, que supone el 25 % de todas las consultas médicas al año, amenaza la salud pública y contribuye de modo importante al aumento de los costos de la atención médica. El total de las enfermedades infecciosas es probablemente subestimado, debido a la insuficiencia en el diagnóstico oportuno de dichas enfermedades en países de escasos recursos (Gestal-Otero, 1997). Por otra parte, estas enfermedades aumentan considerablemente debido al uso indiscriminado de antibióticos de amplio espectro, lo cual resulta en un aumento en el número de cepas resistentes a una gran variedad de antibióticos mas aun un amplio número de especies bacterianas son capaces de intercambiar la información genética necesaria para contrarrestar altas concentraciones de compuestos antimicrobianos (Lapeña, 1999; Martel y col., 2000).

Los grupos de población con mayor riesgo de sufrir infecciones graves son bs individuos inmuno-deprimidos; tales como las personas de la tercera edad, los pacientes internados en hospitales y asilos y personas con deficiente acceso a la atención sanitaria, (como vagabundos, trabajadores agrícolas y otros colectivos de bajo estatus socioeconómico). También los niños atendidos en guarderías, tienen alto riesgo de contraer infecciones (Gestal-Otero, 1997).

La aparición y reaparición de estas enfermedades está influenciada por múltiples factores, el deterioro de la infraestructura de la salud pública, el crecimiento de la población y cambios en su densidad, distribución y estructura etaria, los cambios de conducta como la promiscuidad sexual y el consumo de drogas; los avances médicos con prácticas diagnósticas y terapéuticas invasivas, y aumento en el uso de prótesis y catéteres, las alteraciones ecológicas, tales como la deforestación y reforestación; el movimiento de personas y microorganismos de una región a otra; el transporte internacional de mercancía, en especial de animales infectados, y los cambios climáticos etc. Todo lo anterior ha

provocado un incremento en el nivel de enfermedades infecciosas a todos los niveles socioeconómicos (Gestal-Otero, 1997).

El incremento en enfermedades infecciosas repercute un mayor gasto en la salud pública a nivel nacional, y conduce a un uso inadecuado de los recursos destinados a prevenir y combatir dichas enfermedades. En general las enfermedades infecciosas continúan siendo la principal causa de muerte en países en desarrollo (Fig.1).

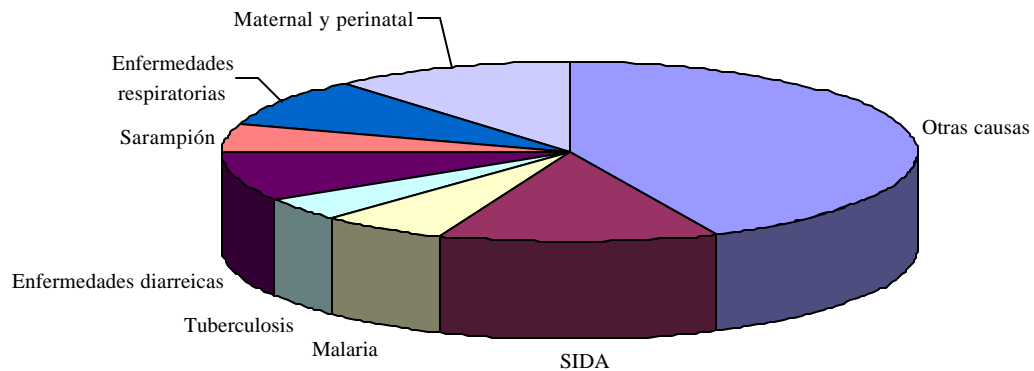


Figura 1. Principales causas de muerte en países en desarrollo. Imagen tomada de WHO/CDC (2000).

1.2 Resistencia a antibióticos y problemas para controlar infecciones

La capacidad de los antibióticos para curar enfermedades infecciosas que eran mortales en el pasado, ha desembocado en la falsa noción popular de que se trata de medicamentos “milagrosos”, que en su mayoría superan a lo que realmente se puede atribuir a sus propiedades farmacológicas. En la mayoría de los países europeos, los antibióticos ocupan el segundo lugar en la lista de medicamentos más usados después de los analgésicos. Su uso excesivo, y en muchos casos inapropiado, en medicina, veterinaria y agricultura, ha dado lugar a un rápido aumento en la prevalencia de microorganismos resistentes a los medicamentos. De hecho, muchos de los antiguos antibióticos han dejado de ser eficaces o lo son en menor grado que antes (Lapeña, 1999; Martel y col., 2000).

La tolerancia a los antibióticos se desarrolla por selección y la transferencia de características genéticas de resistencia entre las bacterias de la misma o diferentes especies.

Por lo general, cuanto más se usa un antibiótico específico, mayor es el riesgo de que surja y se extienda la resistencia al mismo, y por consiguiente, que sea cada vez menos eficaz. Para evitar una resistencia de este tipo, se han desarrollado nuevos antibióticos con propiedades químicas similares, pero no idénticas; sin embargo a un mediano plazo puede surgir resistencia a estos medicamentos (Gestal- Otero, 1997). La consecuencia más grave de esta estrategia, es la aparición de nuevas cepas bacterianas resistentes a diversos antibióticos del mismo tipo. Las infecciones causadas por agentes patógenos con resistencia múltiple, suponen un reto especial que acarrea un aumento de las complicaciones clínicas, lo que incluye el riesgo de sufrir una enfermedad grave que hasta la fecha se podría haber tratado con éxito, además de estancias hospitalarias de mayor duración y una factura significativamente más alta para la sociedad. El peor escenario, es que los agentes patógenos peligrosos adquieran con el tiempo resistencia a todos los antibióticos hasta ahora eficaces, lo que daría lugar a epidemias incontrolables de enfermedades microbianas imposibles de tratar.

Por tal motivo resulta indispensable desarrollar nuevas estrategias para asegurar la disponibilidad de tratamientos eficaces contra infecciones bacterianas agresivas. Del mismo modo, también es esencial que los nuevos medicamentos, al igual que los anteriores, se usen de una manera más restringida y siempre apoyada en sólidos conocimientos médicos. Además, muchos antibióticos son compuestos químicos estables que no se descomponen en el cuerpo y que permanecen activos después de su excreción. En la actualidad, los antibióticos contribuyen considerablemente al creciente problema de las sustancias médicas activas presentes en el medio ambiente (Gestal-Otero, 1997).

1.3 Péptidos antimicrobianos como alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas

Alexander Fleming fue el primero en observar que las secreciones lagrimales tenían poderes bactericidas. La lisozima resultó ser la causante de esta actividad y la primera proteína antimicrobiana registrada; desde entonces se han encontrado otras proteínas y péptidos que tienen función antimicrobiana (Fleming, 1950).

Se considera que los péptidos antimicrobianos existen desde el inicio de la evolución de la respuesta inmune. Su amplia distribución en el reino animal y vegetal demuestra que constituyen una parte esencial de la inmunidad de los organismos multicelulares (Lehrer y col., 1993; Zasloff, 2002).

La mayoría de los péptidos antimicrobianos son moléculas catiónicas con regiones hidrofóbicas (Bruno y col., 2006), que difieren en tamaño, secuencia de aminoácidos y estructura; sin embargo, todos están genéticamente codificados es decir, un gen codifica para cada péptido específico, independientemente de que éstos puedan tener alguna modificación postraduccional como es el caso de las catelicidinas y las α -defensinas (Boman, 1995; Zasloff, 2002). Los péptidos antimicrobianos se agrupan en familias de acuerdo con su tamaño, su estructura y la organización de los aminoácidos. En humanos, existen tres familias: defensinas, catelicidinas e histidinas, de las cuales las mas importantes son las catelicidinas y defensinas cuyas características se describirán mas adelante (Kaiser y Diamond, 2000). Estos péptidos tienen carga positiva neta debido a la presencia de un gran número de aminoácidos básicos (lisina y arginina), y además, cerca del 50% de los aminoácidos que los constituyen son hidrofóbicos (Ganz y col., 1985; Boman, 1995).

1.3.1 Defensinas

Las defensinas de los mamíferos son péptidos catiónicos, relativamente ricos en arginina, con un peso molecular de 3-4.5 kDa; contienen invariablemente seis residuos de cisteína los cuales están unidos entre sí por tres puentes disulfuro. El número de aminoácidos que conforman estos péptidos pueden variar de 20 a 45 (Ganz y col., 1985; Boman, 1995).

La familia de las defensinas se divide tres grupos: α , β y θ , y su clasificación se basa en la posición de los enlaces disulfuro (Ganz y col., 1985; Boman, 1995). En ensayos *in vivo*, las defensinas muestran actividad antimicrobiana a concentraciones de 1-10 $\mu\text{g/mL}$. Sin embargo, a concentraciones de 15-30 $\mu\text{g/mL}$ se ha observado que existe actividad citotóxica (Ganz y col., 1985).

1.3.2 Catelicidinas

En 1992, Zannetti descubrió en bovinos y cerdos un grupo de péptidos antimicrobianos diferentes a los conocidos previamente, y los nombró catelicidinas, que actualmente se conocen con el nombre de Protegrinas (PG) en cerdos, y LL-37 en humanos. Estas catelicidinas son multifuncionales y tienen una clara importancia para la respuesta inmune del hospedero (Zannetti y col., 1995). En la actualidad se han encontrado derivados de catelicidinas en gatos, conejos, cabras y ratones (Turner y col., 1998; Wu y col., 1999; Nizet y Gallo, 2003). Los genes de las catelicidinas son muy conservados y contienen 4 exones y tres intrones; los primeros 3 exones corresponden a una secuencia señal y un propéptido, el cuarto exón es muy variable y corresponde al dominio con propiedades antimicrobianas (Shinnar y col., 2003).

Los prepropéptidos son sintetizados en médula ósea y son dirigidos a los neutrófilos donde se almacenan como propéptidos. Como se muestra en la Figura 2, los propéptidos se activan con la desgranulación de los neutrófilos, que liberan proteinasa 3 en humanos o elastasa en cerdos, para finalmente liberar un péptido antimicrobiano que puede adoptar una estructura de α -hélice como LL-37/hCAP-18 en humanos (Turner y col., 1998), de lámina β -plegado, como las protegrinas de cerdos (Shi y Ganz, 1998), o ser ricos en aminoácidos de prolina y arginina como Bac7 de bovinos (Zanetti y col., 1995).

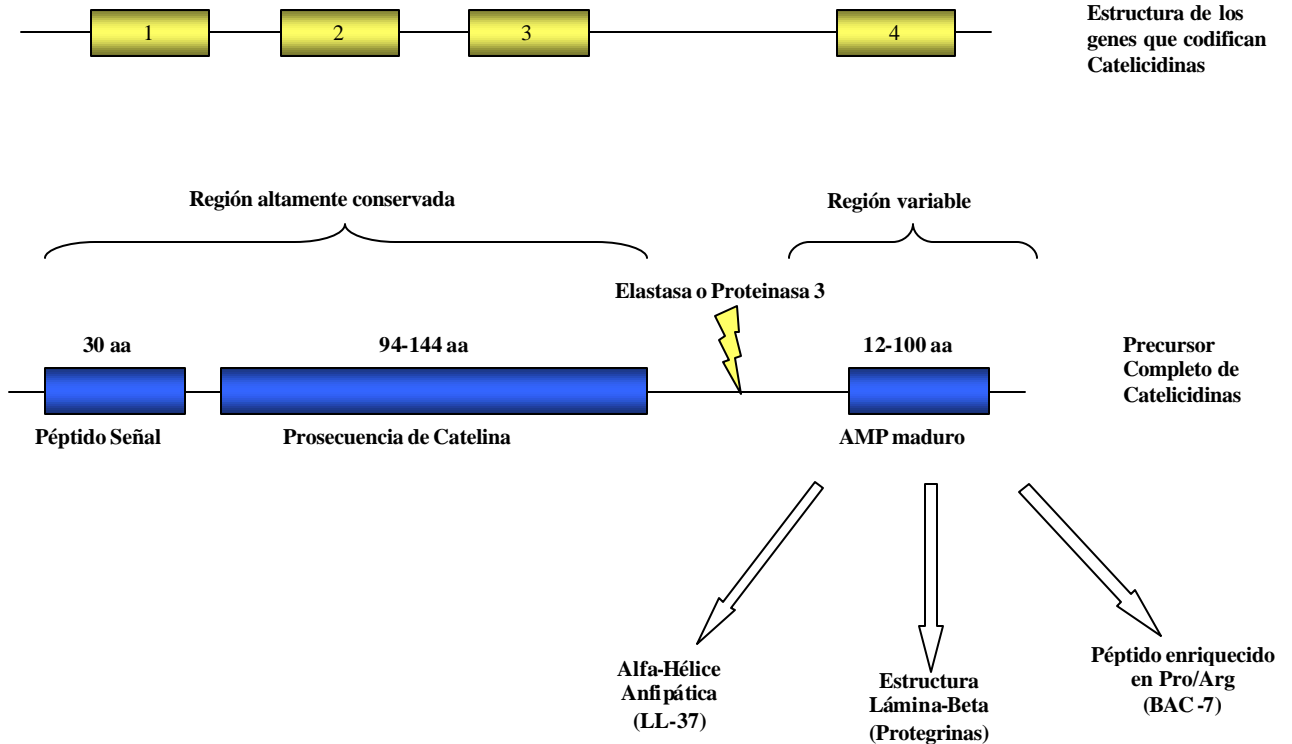


Figura 2 Ilustración de productos génicos de catelecidas. El precursor inactivo corresponde al péptido señal, y al dominio de catelecida unido al antimicrobiano, siendo un prepropéptido inactivo. La serin proteasa 3 ó la elastasa activan el péptido antimicrobiano, ya que liberan el dominio de catelina y dejan activo al antimicrobiano. Imagen modificada Nizet y Gallo (2003).

1.3.2.1 Protegrinas

Las protegrinas (PG) <latín *protegere*>, son péptidos de la familia de las catelecidas, ricos en arginina y cisteína, tienen entre 16 a 18 residuos con una parte carboxi-terminal amidada. Su estructura es β -plegada, con dos puentes disulfuro y se encuentran presentes en neutrófilos de cerdo (*Sus scrofa*). A la fecha se han identificado 5 protegrinas naturales en cerdos, con un amplio espectro de acción que abarca principalmente a bacterias y hongos (Zhao y col., 1995; Mangoni y col., 1996).

A diferencia de las defensinas de humanos, las PGs conservan su actividad en presencia de NaCl (a concentraciones fisiológicas) así como de cationes divalentes (Shi y Ganz y col., 1998). Otra ventaja interesante es que algunos inhibidores de protegrinas presentes en el suero humano, como α -macroglobulinas y serpinas, tienen poco efecto

inhibitorio en las protegrinas. Conservan su actividad en un amplio rango de pH, a diferencia de las defensinas de humanos y conejos cuyo pH óptimo es entre 6.5 y 7.5; las protegrinas son activas a pH 4.5 contra bacterias ácido tolerantes gram-negativas, o levaduras (Bellm y col., 2000). Las protegrinas naturales son activas a concentraciones micromolares, sin embargo, a concentraciones muy altas pueden generar actividad hemolítica contra eritrocitos de humanos. Por esta razón se han generado cientos de análogos de PGs con modificaciones en la quiralidad, la longitud y conformación del péptido, el estado de amidación y los puentes disulfuro (Chen y col., 2000). La Tabla 1 resume la actividad antimicrobiana de las protegrinas (tomada de Herrera-Díaz, 2005).

El amplio espectro de acción de las protegrinas contra agentes infecciosos, además de su eficacia para matar microorganismos de interés biomédico y su actividad en presencia de fluidos biológicos, las ubica como potentes antimicrobianos (Bellm y col., 2000). Sin embargo, aún cuando se han realizado numerosos estudios de este grupo de péptidos, sólo se tiene un reporte de su actividad antimicrobiana, contra microorganismos fitopatógenos. En un estudio de Kamysz y col. (2003) se reportó actividad antimicrobiana contra diferentes patovariedades de *Pectobacterium carotovorum* (*Erwinia carotovora*) y *Pectobacterium chrysanthemi* (*Erwinia chrysanthemi* Dickeya sp).

Tabla 1. Actividad antimicrobiana de las protegrinas

Microorganismo	Gpo	Enfermedad	Protegrina MIC/IC ₅₀ (µg/mL)		Referencia
<i>Streptococcus sp.</i>	G +	Artritis y mucosistis	0.25-4	IB367	Chen y col., 2000.
<i>Corynebacterium sp.</i>	G +	Difteria y bacteriemia	0.13-0.25	IB367	Chen y col., 2000.
<i>Staphylococcus sp.</i>	G +	SOC toxico, artritis, meningitis	0.13-4 1.7	IB367 PG1	Chen y col., 2000. Steinberg y col., 1997
<i>Moraxella sp.</i>	G -	Infec. respiratorias	0.2-0.8	IB367	Chen y col., 2000.
<i>Enterococcus faecalis</i>	G +	Asociada a mucosistis	2.7	PG1	Steinberg y col., 1997
<i>Streptococcus mitis</i>	G +	Asociada a mucosistis	2-43	IB367	Mosca y col., 2000.
<i>Streptococcus salivarius</i>	G +	Asociada a mucosistis	0.2-5	IB367	Mosca y col., 2000.
<i>Streptococcus sanguis</i>	G +	Asociada a mucosistis	4-64	IB367	Mosca y col., 2000.
<i>Streptococcus mutans</i>	G +	Asociada a mucosistis	0.7-1.3	IB367	Mosca y col., 2000.
<i>Enterococcus faecales</i>	G +	Asociada a mucosistis	2.7	PG1	Steinberg y col., 1997
<i>Listeria monocytogenes</i>	G +	Listeriosis	>10	PG1	Turner y col., 1998
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	G -	Gonorrea	8 0.3-10	IB367 PG1	Chen y col., 2000; Shafer y col., 1998
<i>Serratia marcescens</i>	G -	Asociada a mucosistis	16-256	IB367	Mosca y col., 2000.
<i>Haemophilus sp.</i>	G -	Septicemias y neumonía	1-8 0.5-5	IB367 PG1	Chen y col., 2000; Forney y col., 2002
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	G -	Infec. Urinarias y neumonía	1-5	IB367	Chen y col., 2000.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	G -	Asociada fibrosis quística	1-8 0.5	IB367 PG1	Chen y col., 2000; Albrecht y col. 2002.
<i>Burkholderia cepacia</i>	G -	Asociada fibrosis quística	6-10	PG1	Albrecht y col. 2002.
<i>Escherichia coli</i>	G -	Diarreas y septicemia	0.25-1	IB367	Chen y col., 2000.
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	M	Tuberculosis	50	PG1	Miyakawa y col., 1996.
<i>Leptospira interrogans</i>	E	Leptosporiosis	4.3-215	PG1	Sambri y col., 2002.
<i>Borrelia sp.</i>	E	Enfermedad de Lyme	215.6	PG1	Sambri y col., 2002.
<i>Treponema pallidum</i>	E	Sífilis	32.3	PG1	Sambri y col., 2002.
<i>Candida albicans</i>	L	Candidosis	4-16 4-16	IB367 PG1	Chen y col., 2000; Yoon-Cho y col., 1998.
<i>Chlamydia trachomatis</i>	P	Clamidiosis	1.76-2.4 6	IB367 PG1	Yasin y col. 1996; Chon-Cerr y col. 2003.
<i>Tripanosoma brucei</i>	P	Enfermedad del sueño	107	PG1	Mc Gwire y col., 2003.
VIH	V	SIDA	10-50	PG1	Tammamura y col., 1995; Seinestraesser y col., 2005.

G +: Bacterias Gram positivas; G -: Bacterias Gram negativas; E: espiroquetas; L: levaduras; M: micobacterias; P: protozoarios; V: virus; VIH; virus de inmunodeficiencia humana; SIDA: Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida; MIC: Concentración Mínima Inhibitoria; IC₅₀: Concentración Inhibitoria del 50%.

1.4 Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos

El primer paso de la interacción entre el péptido catiónico y la membrana aniónica de un microorganismo se lleva a cabo por atracción electrostática. El segundo paso es la permeabilización de la membrana. Existen dos mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos; uno es conocido como el modelo de barril, que se da por la formación de poros en la membrana debido a la incorporación de los péptidos y su organización en poros; el segundo modelo es el modelo de carpeta, que se da por la agregación continua de péptidos en la membrana bacteriana y posteriormente la ruptura de la membrana al promoverse el paso de péptidos al interior de la célula en un proceso autocatalítico (Fig. 3). Al final se lisa la célula como consecuencia de un choque osmótico (Ogata y col., 1992; Boman, 1995).

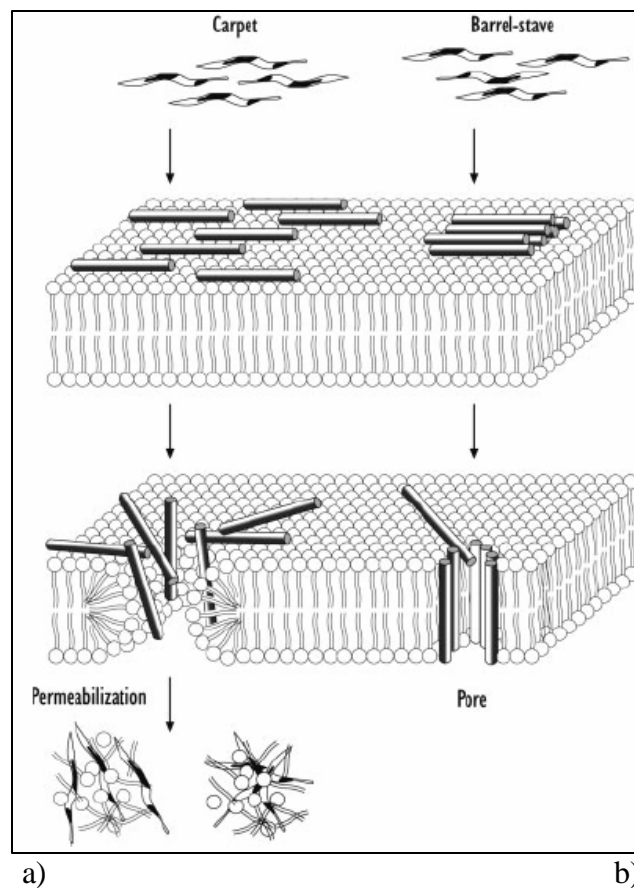


Figura 3. Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos:
a) Modelo de carpeta, b) Modelo de barril. Tomada de Pontus y col., (2003).

Los péptidos antimicrobianos producen exclusivamente daño en la membrana celular bacteriana, pues tienen afinidad con está debido a que la superficie de las bacterias tiene muchos fosfolípidos con carga negativa. En contraste, la membrana externa de las células de plantas y animales está compuesta principalmente por lípidos con baja carga eléctrica, mientras que los lípidos con alta carga eléctrica solo se encuentran en la cara interna de la membrana. Además, la presencia de colesterol en la membrana de las células eucariontes le confiere estabilidad, reduciendo aun más la actividad de los péptidos antimicrobianos (Zasloff, 2002).

La actividad antimicrobiana de las protegrinas fue caracterizada en experimentos *in vitro* con defensinas purificadas. Los péptidos antimicrobianos, específicamente las protegrinas, tienen un amplio espectro de acción microbiana en contra de bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como también contra virus con cubierta lipídica y hongos. Las concentraciones mínimas inhibitorias se encuentran en un rango de 0.1-100 µg/mL (Starner y col., 2005). Se ha observado que la resistencia bacteriana a los péptidos antimicrobianos es un fenómeno bastante raro, no obstante puede tener lugar por la inactivación del péptido, la incapacidad del péptido para llegar a la diana bacteriana, modificación de la diana bacteriana, o el uso de mecanismos de captación-expulsión por la bacteria. De forma general involucran la modificación de la capa externa de la pared celular como los lipopolisacáridos, ácido teicoico, y fosfocolina (López-Brea, 1999; Bruno y col., 2006). Además del papel de antibióticos endógenos, los péptidos antimicrobianos tienen otras funciones que favorecen la inflamación, la cicatrización y la regulación de la respuesta inmune (Zasloff, 2002).

Hoy se sabe que los péptidos antimicrobianos no sólo producen la permeabilización de las membranas bacterianas, sino que poseen otras funciones como la inhibición de la síntesis de proteínas del ADN de la bacteria al unirse a los ribosomas, la actividad antitumoral, la estimulación de la proliferación celular y la angiogénesis (Kamysz y col., 2003).

1.5 Aplicaciones clínicas de los péptidos antimicrobianos

El potencial terapéutico de los péptidos antimicrobianos en enfermedades infecciosas es muy amplio. En pacientes con quemaduras graves se ha demostrado la pérdida de la capacidad de producción de defensinas en la piel afectada, por lo que en estos pacientes las infecciones recurrentes son muy comunes, y en ocasiones, se convierten en complicaciones mortales. Se ha observado que la aplicación de defensinas por vía tópica en estos pacientes disminuye hasta en un 90% las infecciones recurrentes, además de que la aplicación de los péptidos antimicrobianos induce una mejor cicatrización debido a que algunos péptidos antimicrobianos como las protegrinas, en especial la LL-37, estimulan la proliferación de las células epiteliales además de su efecto antimicrobiano (Milner y col., 2002). De igual forma se ha encontrado que las protegrinas y las defensinas, son eficaces en contra de *Helicobacter pylori* y *Mycobacterium tuberculosis*. Dada, su importancia en infecciones recurrentes es conveniente estudiar el papel de los péptidos antimicrobianos contra estos microorganismos mas a fondo (Bruno y col., 2006).

El amplio espectro de acción de los péptidos y la baja incidencia de resistencia bacteriana a los mismos, los sitúan como candidatos importantes para la investigación y el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos. Su baja toxicidad, así como la posibilidad de una administración tópica o sistémica, les dan una ventaja sobre otros antibióticos (Bruno y col., 2006). Actualmente se han producido con gran éxito péptidos como los lantibióticos, que se han expresado tanto en bacterias como en hongos (Sahl y Bierbaum, 1998), y en bacterias es necesario introducir el gen de inmunidad para evitar afectar el crecimiento de la cepa receptora del transgén.

1.6 Uso de la agrobiotecnología para la transformación de plantas

La manipulación genética de plantas ha sido posible desde hace más de 20 años, cuando se logró por vez primera introducir genes foráneos al genoma de las plantas por el grupo del doctor Montagu (Herrera-Estrella y col., 1983). La producción heteróloga de proteínas en plantas ofrece ventajas con respecto a otros sistemas como lo siguiente: (1) bajos costos de producción en comparación con biorreactores, ó animales transgénicos, (2)

la purificación de la proteína heteróloga es económica y en ocasiones no es necesaria, (3) se evitan contaminaciones por toxinas o secuencias virales, que pueden tener otros sistemas (Giddings, 2001).

A la fecha se han descrito diferentes estrategias para la transformación de plantas, como la transformación nuclear mediante *Agrobacterium tumefaciens*, uso de vectores virales ó utilizando métodos físicos como biobalística o químicos como polietilenglicol (PEG). En estudios más recientes ha sido posible introducir material genético a organelos, como los cloroplastos (Maliga, 1993).

1.7 Utilidad del cultivo de tejidos en la transformación vegetal

El Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) es un término amplio que se refiere al cultivo de células, tejidos u órganos de plantas en condiciones asépticas, en medios de cultivo sintéticos y en condiciones ambientales controladas (Doods y Roberts, 1982). Esta tecnología se basa en el concepto de que una célula es una unidad autónoma y totipotencial, la cual al ser separada de un organismo multicelular puede crecer, dividirse, diferenciarse y organizarse en tejidos, órganos y finalmente en una planta completa, si se le coloca en un medio de cultivo adecuado con reguladores de crecimiento, nutrientes y en condiciones ambientales controladas.

La técnica de CTV permite el crecimiento de tejido celular indiferenciado denominado “callo”, el cual consiste en una masa amorfa formada por células con adelgazamiento de la pared celular y procedentes de la proliferación de células de tejidos afines. Un callo se forma, frecuentemente, a partir de un explante de cotiledón, tallo o raíz, utilizando para la inducción del tejido reguladores de crecimiento o fitohormonas. La producción de callo no sólo es útil para el estudio *in vitro* de los cultivos sino que igualmente representa una forma de conservar y propagar material vegetal.

El CTV se presenta como una alternativa biotecnológica importante para la propagación y transformación de tejido vegetal, al cual se le puede introducir genes foráneos de diferentes fuentes (animal, bacterianos, viral) y conferir nuevas características heredables al material vegetal bajo estudio.

La metodología presenta las siguientes ventajas: a) permite controlar rigurosamente las condiciones de luz, temperatura y estado nutricional; b) las células están en estrecho contacto con el medio y por lo tanto directamente expuestas a cambios en la composición del medio de cultivo, como la selección con antibióticos, etc.; c) un cultivo celular permite la eliminación de todas las respuestas, excepto aquellas que son operativas a nivel celular; d) el crecimiento es independiente de las fluctuaciones estacionales del medio ambiente, (Hernández y García, 1999).

La transformación de plantas involucra la utilización de un explante (parte de una planta), y la regeneración de una planta completa a partir de éste (Maliga, 2004). Se han descrito dos vías de regeneración de plantas a partir de un explante, los cuales se conocen como embriogénesis somática y la organogénesis. La organogénesis es un proceso de formación *in vitro* de órganos como tallos, hojas y raíces. Por lo general, bajos niveles de auxinas y altos niveles de citocininas conducen al desarrollo de brotes, que después generan raíces en un medio carente de reguladores de crecimiento (Trigiano y Gray, 2000). Por otro lado, la embriogénesis somática consiste en la inducción de embriones a partir de células somáticas. Esta vía es comúnmente inducida con altas concentraciones de auxinas, que promueven la formación de proembriones. La maduración a embriones y su germinación se logra omitiendo los reguladores del medio de cultivo (Herrera-Díaz, 2006).

1.8 Transformación de cloroplasto

1.8.1 Organización del genoma y principios de la transformación de cloroplasto

En la célula vegetal existen tres compartimentos membranosos donde se conserva el material genético en forma de ADN. Dichos compartimentos corresponden al núcleo, mitocondria y cloroplasto, este último con características altamente especializadas en el metabolismo celular. El cloroplasto es responsable de la fotosíntesis, producción de un gran número de productos, y la síntesis de una gran variedad de moléculas requeridas para la arquitectura y funciones básicas de la célula vegetal (Buchanan y col., 2000). El cloroplasto, al igual que la mitocondria es un organelo semi-autónomo y contiene la maquinaria genética requerida para la síntesis de sus propias proteínas, lo que le da a su genoma características particulares muy distintas a las del genoma nuclear. El genoma de

cloroplasto puede tener de 1,000 a 10,000 copias de su genoma (Maliga, 2003), por tal característica los genes al estar en gran número de copias, su expresión, resulta en una abundancia de los transcritos y una alta acumulación de proteínas en el cloroplasto (Mc Bride, y col., 1995), de hasta aproximadamente 46% de proteína total soluble (De Cosa y col., 2001). A diferencia del núcleo, en el cloroplasto su expresión génica no esta estrictamente regulada, y además, que en el genoma de cloroplasto no se han descrito fenómenos de silenciamiento de genes (Sidorov y col., 1999).

El ADN del cloroplasto (cpDNA) tiene forma circular, está constituido por una doble hebra superenrollada, y no existen proteínas con funciones de compactación, como es el caso de las histonas de los cromosomas nucleares. El cpDNA es una molécula de tamaño variable, desde 120 kb hasta 220 kb (Palmer, 1985). La organización de los genes en el cloroplasto es de una forma particular, ya que contiene los genes para producir cada uno de los rRNA de los ribosomas típicos del cloroplasto (16S, 23S, 4.5S y 5S) (Harris y col., 1994). También contiene genes para los tRNA, y genes que codifican algunas proteínas requeridas en los procesos de transcripción y traducción dentro del cloroplasto o requeridas para la fotosíntesis. Algunas de las proteínas con funciones dentro del cloroplasto son codificadas en el ADN nuclear, sintetizadas en el citoplasma y posteriormente transportadas cloroplasto, por lo que existe un mecanismo de transporte de proteínas hacia dentro y fuera del cloroplasto (Buchanan y col., 2000).

El genoma del cloroplasto contiene dos copias de cada uno de los genes para la producción de ARN de transferencia. Los de tRNA se localizan en dos regiones del cpDNA de 10 a 25 kb, con secuencias repetidas idénticas pero con orientación invertida que se conocen como LIR y RIR (Daniell y col., 2004). Lo anterior se presenta como una alternativa en el diseño de vectores para la inserción y expresión de genes sintéticos por recombinación homóloga con la finalidad de expresar una proteína recombinante.

Hasta el momento se han logrado secuenciar 82 genomas de cloroplastos de diversas especies vegetales y algas, lo que abre una amplia ventana de estudio sobre la expresión de proteínas heterólogas en diversas especies, usando como modelo de expresión el genoma de cloroplasto (Cui y col., 2006).

En general, la transformación de cloroplastos para la expresión de proteínas de interés terapéutico se presenta como una alternativa importante en la mejora de la

producción de proteínas recombinantes (Sytnik y col., 2005). La técnica involucra la inserción de genes foráneos flanqueados por secuencias homólogas del genoma de cloroplasto, que facilita la recombinación y la inserción sitio específica del ADN foráneo en el genoma de cloroplasto.

1.8.2 Diseño de vectores para la transformación de cloroplasto

Los vectores de expresión para la transformación de cloroplasto son similares a los vectores de expresión de otras especies; es necesario que se introduzca a la secuencia genómica de cloroplasto un gen que confiere resistencia a algún agente químico, junto con el gen que se desea expresar, ambos regulados por promotores fuertes que dependen de la especie vegetal que se use. Comúnmente se usan genes bicistrónicos, con ambos genes regulados por un solo promotor, pero también se usa la co-transformación usando en un vector el gen de resistencia y en otro vector el gen de interés, lo cual puede facilitar la eliminación del gen de resistencia si es necesario (Maliga, 2003). Los genes de resistencia más utilizados son el *rrn 16*, que confiere resistencia a la estreptomicina, y también es muy común el gen *aadA* que codifica para la aminoglicósido 3'-adeniltransferasa, enzima que inactiva la espectinomicina y la estreptomicina (Maliga, 2003). Las clonas de plantas con el genoma de cloroplasto transformado (transplastómicas) son identificadas por su capacidad para crecer en el medio de selección, por lo que es de suma importancia prepararlo adecuadamente. Además es importante considerar que el gen de resistencia puede perderse al quitar el agente de selección del medio de cultivo (Staub y Maliga, 1995), lo que da mayores ventajas en la aplicación tecnológica de la transformación de cloroplastos.

En muchos de los métodos de transformación es necesario que el vector introducido a la célula tenga sitios de recombinación homóloga que flanquean la región de clonación del gen de interés (O'Neill y col., 1993), la integración del gen al genoma del cloroplasto es sitio-específico, por lo que se asegura solo la transformación del genoma de cloroplasto y no el genoma nuclear (Koop y col., 2004). El gen foráneo es finalmente introducido dentro de las secuencias de repetidos invertidos que posee el genoma del cloroplasto (IR) (Maliga, 2003); la integración en este sitio es seguida del fenómeno de corrección de copias duplicadas del transgén introducido dentro de otros repetidos invertidos (Fig. 5). Tanto el

diseño del vector como la optimización de codones mediante genes sintéticos para mejorar la traducción de la secuencia en el sistema vegetal, son de vital importancia para la correcta expresión de la proteína recombinante en el cloroplasto.

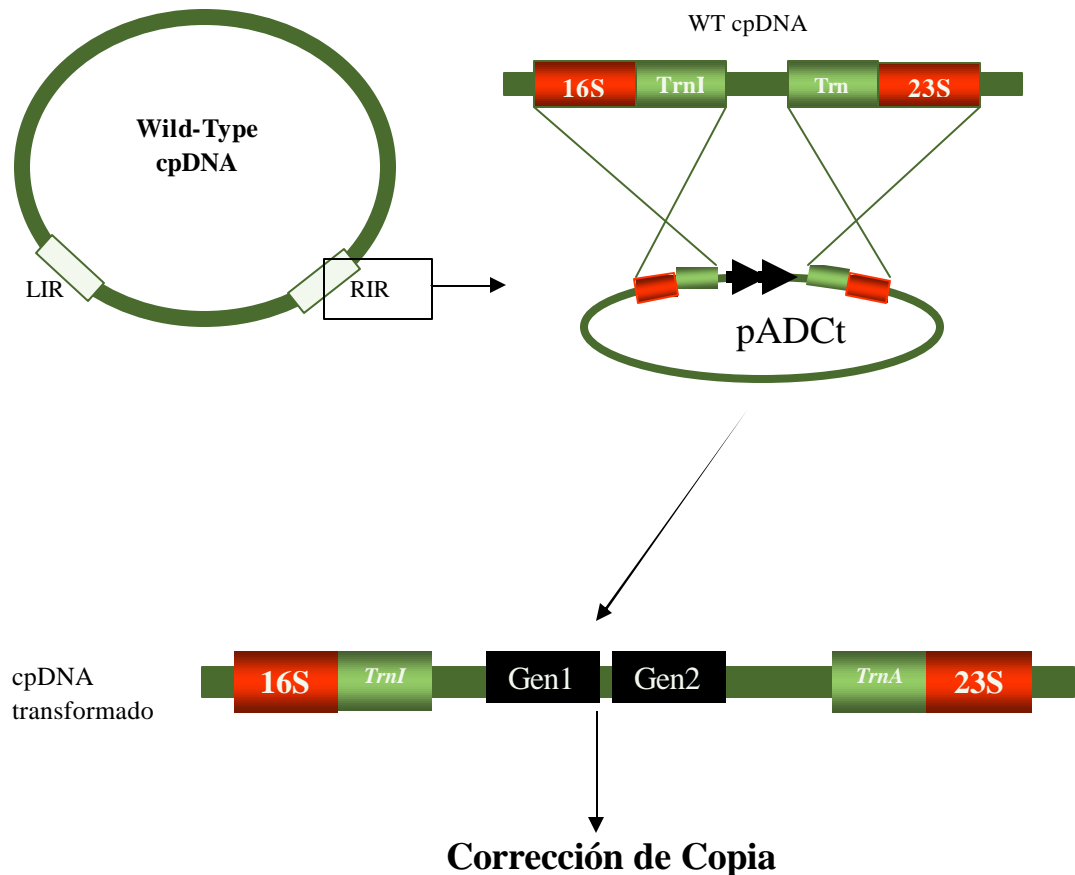


Figura 4. Transformación del genoma de cloroplasto por dos eventos de recombinación homóloga. Los segmentos incluidos en el vector corresponden a regiones homólogas presente en el genoma de cloroplasto denominadas repetidos invertidos (LIR, RIR), respectivamente, posterior al evento de transformación se lleva acabo el fenómeno de corrección de copia que involucra la duplicación del o los genes en el otro repetido invertido (Daniell y col., 2004).

1.8.3 Métodos de transformación de cloroplastos

Las distintas técnicas de transformación de células vegetales se dividen en directas, o indirectas. Las técnicas directas se basan en introducir al ADN modificando la permeabilidad de la célula, dentro de las cuales destacan la electroporación, uso de agentes químicos como polietilenglicol, microláser, microinyección, ultrasonido o bombardeo. Las

técnicas indirectas se basan en utilizar vectores biológicos, como *Agrobacterium* o virus, o bien el uso de vectores introducidos en partículas no biológicas como lo son los liposomas. Las distintas técnicas se usan tanto para transformación nuclear como para la transformación de cloroplastos, solo que para la transformación de los cloroplastos hasta el momento se han usado técnicas directas, como la transformación por bombardeo de partículas, transformación vía protoplastos y transformación por microinyección (Maliga, 2003).

En la siguiente Tabla se muestran los resultados de la transformación de plantas superiores.

Tabla 2. Transformación de cloroplastos de plantas superiores

Species	Método	Resultado	Referencia
<i>N. tabacum</i> (tabaco)	Biobalística/ PEG	Integrado/homoplásmico	Svab y col., 1990; Golds y col., 1993.
<i>N. plumbaginifolia</i> (tabaco)	PEG	Transitorio/ Integrado/homoplásmico	O' Neill y col., 1993; Sporlein y col., 1991.
<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomate)	Biobalística	Integrado/homoplásmico	Ruf y col., 2001.
<i>Solanum tuberosum</i> (papa)	Biobalística	Transitorio/ Integrado/homoplásmico	Hibberd y col., 1998; Sidorov y col., 1999.
<i>D. carota</i> (zanahoria)	Biobalística	Transitorio/ Integrado/homoplásmico	Hibberd y col., 1998; Kumar y col., 2004a.
<i>Oriza sativa</i> (arroz)	Biobalística	Integrado/homoplásmico	Khan y Maliga, 1999.
<i>G. hirsutum</i> (algodón)	Biobalística	Integrado/homoplásmico	Kumar y col., 2004b.
<i>Glycine max</i> (soya)	Biobalística	Integrado/homoplásmico	Zhang y col., 2001; Dufourmantel y col., 2004.
<i>Lesquerella fendleri</i>	Biobalística	Integrado/homoplásmico	Skarjinskaia y col., 2003.
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Biobalística	Integrado/homoplásmico	Sikdar y col., 1998.
<i>L. sativa</i> (lechuga)	PEG	Integrado/homoplásmico	Lelivelt y col., 2005.

Modificado de Heifetz, (2000)

1.8.3.1 Transformación por bombardeo de partículas

El bombardeo con micropartículas para la introducción de ADN en las células fue una técnica desarrollada en 1987 por Sanford y sus colaboradores que le dieron el nombre de “biolística”, o bien, balística biológica. El sistema consiste en disparar micropartículas de aproximadamente 1 μm de diámetro, cubiertas con ADN hacia tejidos o células

vegetales (Rusell y col., 1992). En los primeros experimentos se usaron partículas de tungsteno aceleradas con un dispositivo a base de pólvora (Klein y col., 1988). El daño celular es uno de los principales factores que dificultaron, la recuperación de plantas con transformación estable, ya que tanto el trauma físico causado por el impacto del gas y el choque acústico como la toxicidad del tungsteno contribuían a este daño celular y reducían la eficiencia de la transformación. La técnica fue mejorada usando partículas de oro y un acelerador de partículas con flujo de helio (Rusell y col., 1992; Kim y Minamikawa, 1996).

Esta metodología de transformación tiene ciertas limitaciones. Algunos tejidos oponen una resistencia natural a la penetración de las partículas, dada por cutículas endurecidas o paredes celulares lignificadas. Sin embargo, el principal problema del método continúa siendo la baja relación entre el total de células sometidas al bombardeo y el número de células que logran incorporar de manera permanente y estable la información genética transferida. A pesar de esta desventaja, la versatilidad de la aceleración de partículas para introducir transgenes ha superado muchas de las barreras asociadas a otros métodos de transformación.

El método de biobalística ha sido reportado como el mejor método de transformación de organelos como mitocondrias y cloroplastos, además de ser un método de transformación casi universal útil para una gran variedad de organismos principalmente monocotiledoneas (Daniell y col., 1999). La biobalística ha sido utilizada con éxito para producir plantas transgénicas a partir de una gran variedad de tejidos vegetales, entre los que se incluyen hojas, meristemos, embriones en desarrollo, embriones maduros, callos embriogénicos, suspensiones celulares, entre otros. Los logros más sobresalientes en la generación de plantas transgénicas por medio de este método, incluyen especies de gran importancia económica como son la soya, el maíz, el arroz, el sorgo, la papaya, la caña de azúcar, el trigo y el espárrago.

1.8.3.2 Transformación vía protoplastos

La introducción y expresión de ADN foráneo en protoplastos fue el primer método de transferencia directa claramente demostrado en plantas, y esto se debió a que se disponía, para algunas especies, de procedimientos eficientes para la regeneración a partir

de protoplastos. La transformación de protoplastos mediada por polietilenglicol (PEG) es el método más comúnmente usado.

En un inicio se requiere la preparación del protoplasto (célula vegetal sin la pared), los protoplastos se fusionan mediante el PEG, y de esta manera se obtienen híbridos, que finalmente por recombinación homóloga con el vector que contiene el cassette de expresión, se obtienen células transgénicas (O'Neill y col., 1993). Su principio implica que el cloroplasto adquiere el ADN foráneo en presencia de PEG por cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática, de forma que este entra al citoplasma y se transporta al cloroplasto donde se añade como parte integral de su genoma (Potrykup, 1990). Este método se presenta como una buena alternativa en la transformación de cloroplastos, pero la regeneración de una planta completa a partir de los protoplastos en algunas ocasiones no suele ser muy eficiente.

1.8.4 Sistemas de eliminación del gen de resistencia

En muchas ocasiones, después de obtener una planta transgénica se requiere eliminar el gen de resistencia y tener una planta que solo exprese la proteína de interés. El primer método desarrollado para eliminar el gen de resistencia, involucra el uso de secuencias repetidas que flanqueen el gen de selección, de manera que este pueda perderse al formarse un “loop” (Iamtham y Day, 2000). Este sistema presenta una grave dificultad, debido a que la transformación y la eliminación del gen de selección puede llevarse a cabo casi simultáneamente, lo que constituye una pérdida de transformantes al seleccionar positivamente con antibiótico (Maliga, 2002). En el caso de la transformación de cloroplasto, se ha descrito que el gen de selección puede eliminarse de una forma eficiente al incluir en el vector los sitios de ADN repetidos (aproximadamente 174 pb) que flanqueen el gen, de modo que al desarrollar las plantas en ausencia del antibiótico, el gen de selección puede ser eliminado por recombinación homóloga (Fig. 6). Otro método desarrollado para eliminar el gen marcador es usando un gen que no codifique funciones de resistencia a antibióticos. Un ejemplo es usar un gen de la espinaca que codifica para la enzima betaína aldehído deshidrogenasa, la cual está presente en el cloroplasto de un número limitado de plantas, cuya función es convertir la betaína aldehído (compuesto

tóxico) a glicina betaína (producto no tóxico), la selección positiva de las transformantes se puede realizar al adicionar betaína aldehído al medio de cultivo (Buchanan y col., 2000).

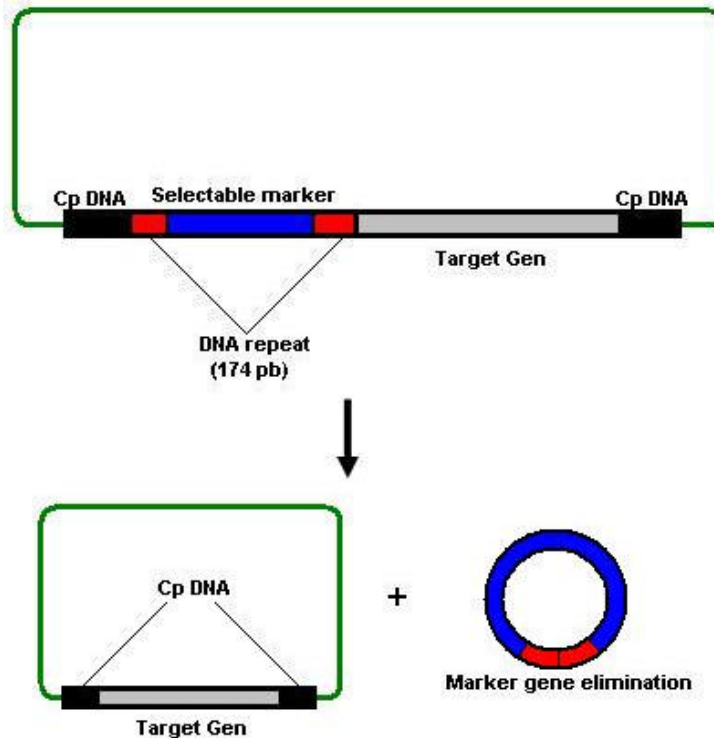


Figura 5. Representación esquemática del sistema de eliminación del gen de resistencia. Posterior a la introducción de los genes al genoma del cloroplasto mediado por recombinación homóloga, las células transformantes se seleccionan con la resistencia al antibiótico adecuado. Después de seleccionar las transformantes se elimina el agente de selección del medio de cultivo y el gen de resistencia se pierde por otro evento de recombinación homóloga (Daniell y col., 2004).

1.8.5 Aplicaciones de la transformación de cloroplastos

La transformación de plantas, se presenta como una excelente alternativa para el estudio de los mecanismos moleculares de la fisiología vegetal, así como la producción de proteínas recombinantes de interés biológico. En un inicio la transformación nuclear ofreció una serie de ventajas para el estudio de los mecanismos reguladores de la expresión de genes en la célula vegetal, lo que hizo posible la validación directa de hipótesis que habían sido imposibles o muy difíciles de resolver utilizando otros métodos (Birch, 1997). Sin embargo resultó ser desfavorable el uso de esta metodología para la expresión de proteínas

recombinantes de interés terapéutico o biotecnológico no ha sido muy exitoso, ya que la transformación nuclear está sujeta a una serie de procesos de silenciamiento y fenómenos muy complejos de regulación génica (Sidorov y col., 1999; De Cosa y col., 2001). Es por eso que la transformación de cloroplastos se presenta como una interesante alternativa en la producción de proteínas recombinantes, así como para el estudio de los genes del cloroplasto y para entender los mecanismos moleculares involucrados en la fotosíntesis y el metabolismo celular.

Las aplicaciones de la transformación de cloroplasto en la investigación se pueden resumir en las siguientes:

- a) Estudio de procesos de regulación de la fotosíntesis.
- b) Introducción de genes para el estudio de procesos moleculares.
- c) Estudio de los mecanismos de defensa contra patógenos propios de la planta.
- d) Estudio de los efectos de estrés abiótico.
- e) Estudio de los procesos de desarrollo.

De igual forma la transformación de cloroplastos ofrece un sin número de ventajas que le confieren al método gran versatilidad y expectativa de desarrollo. Así, el genoma de los plástidos se ha convertido en un blanco atractivo para la ingeniería genética ya que esta tecnología ofrece una serie de ventajas sobre la transformación del genoma nuclear (Díaz y col., 2003):

1.- Se pueden obtener altos niveles de expresión de los transgenes y elevados niveles de acumulación de las proteínas codificadas por ellos hasta el 46% de las proteínas solubles totales (PTS). Cabe hacer notar que el nivel de acumulación observado a partir de transgenes nucleares es generalmente inferior al 1% de PTS.

2.- Es posible expresar transgenes en un sistema tipo “operón”, con varias secuencias codificantes bajo el control de un mismo promotor.

3.- No se observa efecto de posición debido a que la integración del transgén está dirigida a un sitio particular del plastoma. Esto hace que no sea necesario obtener una gran población de transformantes, a diferencia de lo que ocurre con las plantas transgénicas nucleares.

4.- No se observa silenciamiento de transgenes.

5.- Para las especies que tienen transmisión materna de los plástidos (la mayoría), se minimiza la dispersión de los transgenes por el polen debido a la ausencia de transmisión de plástidos por el mismo.

6.- A pesar de la naturaleza eminentemente procariota del sistema genético de los plástidos, se ha demostrado que estos organelos pueden procesar proteínas eucariotas permitiendo su correcto plegamiento y la formación de puentes disulfuro gracias a la presencia de proteínas como las chaperonas y sistemas enzimáticos endógenos.

1.9 Usos comerciales de la producción de proteínas recombinantes

Los usos comerciales en la producción de proteínas recombinantes es evidente, ya que la facilidad de crecimiento de algunas especies vegetales favorece obtener grandes cantidades de plantas transgénicas en un determinado tiempo, además que no se requiere personal capacitado para la producción a gran escala, lo cual reduce costos, y aumenta las posibilidades de la producción de proteínas que requieran procesos postraduccionales (ensamblaje adecuado y formación de puentes disulfuro). Además la purificación de las proteínas suele ser más económica que en bacterias (Daniell y col. 2004).

Los beneficios para la salud de los animales para consumo humano, son inminentes, en la medida que sea posible producir vacunas y hormonas de crecimiento en sistemas vegetales. Actualmente, los animales reciben múltiples tratamientos, para mantener una salud óptima y una alta eficiencia de alimentación, lo cual es inconveniente, ya que provoca estrés en el animal y puede causar algún daño en la carne o baja calidad en el producto lácteo.

A través de la modificación de una planta para expresar vacunas orales u hormonas, puede ser posible que se eviten estos problemas, ya que es más atractivo el consumo de vegetales para vacunarse o ingerir hormonas que recibir una vacuna vía intramuscular. De igual forma la metodología es atractiva para la producción de vacunas humanas, antibióticos y hormonas humanas, entre otros.

En general la transformación de cloroplastos se presenta como una interesante alternativa en la investigación básica y en la producción de proteínas recombinantes de interés terapéutico, a pesar de que esta tecnología es nueva, muchos investigadores se han

dedicado a demostrar la estabilidad de la transformación de cloroplastos (Kanamoto y col., 2006). La enorme variedad de genomas secuenciados de cloroplasto, así como la amplia posibilidad de encontrar modelos de expresión adecuados abre la posibilidad de producir a gran escala, hormonas, antibióticos y vacunas, con la transformación del cloroplasto. Los altos niveles de expresión de la proteína, así como la eliminación subsecuente del agente de selección añaden a esta metodología una mayor posibilidad de desarrollo a gran escala y de su uso en la investigación básica.

Una desafortunada desventaja es que en los cloroplastos no se lleva a cabo la glicosilación de proteínas (Maliga y col., 2003), pero se puede propiciar el transporte y almacenamiento en el retículo endoplásmico donde todos los procesos postraduccionales pueden llevarse a cabo.

Tabla 3. Producción heteróloga de péptidos antimicrobianos en plantas.

Especie transformada	Péptido utilizado	Origen del Péptido	Organismos sensibles	Referencia
Tabaco	Cecropina B	<i>Hyalophora cecropia</i> (I)	<i>Pseudomonas syringae</i>	Florack y col., 1995.
Papa	Cecropina B	<i>H. cecropia</i> (I)	<i>Erwinia</i> sp.	Allefs y col., 1995.
Tabaco	Rs-AFP2	<i>Raphanus sativus</i> (P)	<i>Alternaria longipes</i>	Epple y col., 1997.
Tabaco	Cecropina B	<i>Hyalophora cecropia</i> (I)	<i>Pseudomonas solanacearum</i>	Jaynes y col., 1993.
Tabaco	a-Tionina	<i>Hordeum vulgare</i> (P)	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	Carmona y col., 1993.
Tabaco	D4E1	Sintético	<i>A. flavus</i> , <i>Verticillium dahliae</i> , <i>Colletotrichum destructivum</i>	Cary y col., 2000.
<i>Arabidopsis</i>	RsAFP2 DmAMP1-	<i>Raphanus sativus</i> <i>Dahlia merckii</i> (P)	<i>Fusarium culmorum</i>	Francois y col., 2002.
Tabaco	Esculentin-1	<i>Rana esculenta</i> (A)	<i>P. syringae</i> pv. Tabaci; <i>P. aeruginosa</i>	Ponti y col., 2003.
Papa	Cecropina-Melitina	<i>H. cecropia</i> <i>Apis mellifera</i> (I)	<i>E. carotovora</i> ; <i>Fusarium</i> sp, <i>Phytophthora</i> sp	Osusky y col., 2000.
Tomate	alf-AFP	<i>Medicago sativa</i> (P)	<i>Verticillium dahliae</i>	Gao y col., 2000.
Rosa	Ace-AMP1	<i>Allium cepa</i> (P)	<i>Sphaerotheca pannosa</i>	Li y col., 2003.

P: Planta; I: Insecto; A: Anfibio.

Los estudios iniciales que se han llevado a cabo sobre la transformación de cloroplastos, constituyen un primer paso en el desarrollo de una tecnología emergente que requiere de años para madurar. La comercialización de esta tecnología depende de la viabilidad de la producción así como la purificación de las proteínas recombinantes que además tengan un control de calidad adecuado.

En estudios recientes, la producción heteróloga de péptidos en plantas se presenta como una alternativa interesante para generar modelos vegetales capaces de expresar una alta cantidad de proteína recombinante (Kanamoto y col., 2006). DeGray y col. en el 2001, fueron capaces de expresar péptidos antimicrobianos en el cloroplasto de tabaco, para controlar hongos y bacterias fitopatógenas, observando una expresión de la proteína por arriba del 46% de la proteína total soluble. De igual forma Fernández-San Millán y col. (2003), expresaron albúmina de humano en el cloroplasto de tabaco observando una expresión de la proteína de aproximadamente de el 11.1%. Recientemente (Kanamoto y col., 2006), lograron realizar una transformación estable de los cloroplastos de lechuga con el gen reportero de GUS (*gfp*), y se encontró una acumulación de aproximadamente 36% de la proteína total soluble.

Según lo descrito por Daniell y col. (2004), para llevar a cabo una transformación de cloroplastos exitosa, es necesario contar con un vector bien diseñado. Es necesario tomar en cuenta cada uno de los factores que influyen en la expresión de proteínas en cloroplasto, la estabilidad del mensajero, la orientación y el tipo de promotor, así como las secuencias de recombinación homóloga que posee el vector. En este sentido se han diseñado un gran número de vectores, los cuales son patentados para su uso en la expresión de proteínas heterólogas en plantas. En el 2001, Zhuong y Koop diseñaron un vector que posee las características de tener los sitios de recombinación homóloga para cloroplasto de tabaco. La estrategia para generar el vector fue amplificar las regiones de los *trnR* y *trnN*, para posteriormente subclonarlos y obtener finalmente un vector para la transformación de cloroplastos de tabaco, llamado: pKCZ. Del mismo modo Herrera-Díaz (2005), fue capaz de generar vectores monocistrónicos para el co-bombardeo de tabaco utilizando como base el vector de transformación el pKCZ el cual modificó agregándole un promotor de cloroplasto y regiones que potencian la traducción. La estrategia de Herrera-Díaz fue

bombardear en vectores separados, el gen de resistencia a espectinomicina y el gen de la Protegrina 1 (PG1), por lo que se esperaba que la integración de los genes, fuera en cada uno de los repetidos invertidos, de esta forma, poder tener en un repetido invertido (IR) el gen de selección, y en el otro IR el gen de la protegrina. Lo anterior presenta la desventaja de que podría integrarse solo uno de los genes bombardeados, por lo que se podían perder en la selección con antibiótico, plantas que solo hayan integrado el gen de la protegrina, así como obtener brotes transformantes que solo tengan el gen de selección de espectinomicina. Según lo reportado por Maliga (2003), la expresión de genes bicistrónicos en cloroplastos resulta en una eficiente expresión del gen de interés, debido a que la regulación de ambos genes está dada por un solo promotor constitutivo, que tiene funcionalidad en cloroplasto, de este modo las plantas que sean capaces de crecer en medio selectivo, resultaría en una evidente integración del gen de selección y por lo tanto del gen de interés.

1.10 Características del modelo vegetal *Lactuca sativa* (lechuga)

La lechuga es una planta herbácea, dicotiledónea que pertenece a la familia de las compuestas. Es una planta originaria de Europa y Asia y ha sido cultivada por más de dos mil años (Claridades Agropecuarias, 1999). Los principales países productores de lechuga son países Europeos y los Estados Unidos. En México se cultiva principalmente en Puebla y Guanajuato y en menor escala en Baja California, San Luís Potosí y Zacatecas (Claridades Agropecuarias, 1999). La lechuga es fuente de fósforo, hierro, sodio, potasio, calcio, magnesio, ácido ascórbico, y vitaminas A, C, E, B1, B2 y B3. Una de las ventajas de la lechuga es que la parte consumible de la planta son las hojas que pueden consumirse sin cocción previa, además que es una planta de rápido desarrollo, por lo que se obtiene un producto comestible y comerciable en un corto tiempo (Herrera-Díaz, 2006).

1.10.1 Expresión de proteínas recombinantes en cloroplastos de lechuga

En estudios recientes sobre la producción de proteínas heterólogas en cloroplasto, se ha propuesto a la lechuga como un interesante modelo de expresión (Kanamoto y col., 2006, principalmente por sus características de consumo, su fácil crecimiento y cultivo, así

como su amplia distribución y fácil transporte. Como se mencionó anteriormente, con la producción de proteínas recombinantes en cloroplasto se puede llegar a ser de un 46 % de proteína total soluble (De Cosa y col., 2001), además de las ventajas que engloba la fácil purificación de la proteína y La producción a gran escala de plantas como la lechuga. Todo esto hace a la lechuga un modelo atractivo para la producción de proteínas recombinantes, y por tal motivo decidimos utilizarlo como una interesante alternativa para la producción de protegrinas.

Capítulo 2
OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Obtener callos transplastómicos de lechuga que expresan protegrinas biológicamente activas.

2.2 Objetivos específicos

1. Construir vectores bicistrónicos con genes de protegrinas y marcador de selección para transformación de cloroplastos de tabaco y lechuga.
2. Determinar si las construcciones son funcionales en *Escherichia coli*.
3. Transformar cloroplastos de lechuga y tabaco por biobalística con las construcciones generadas.
4. Determinar si los genes se integraron por recombinación homóloga en el sitio específico del genoma del cloroplasto.
5. Determinar si las protegrinas expresadas en lechuga poseen actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas de humanos.

Capítulo 3
JUSTIFICACIÓN

III. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades infecciosas son las primeras causas de muerte a escala mundial al final del milenio, según lo reportado por la OMS (2000). Una alternativa importante para combatir las enfermedades infecciosas son los péptidos antimicrobianos, dentro de los cuales las protegrinas se presentan como una interesante alternativa para combatir dichas enfermedades. Las protegrinas (PG), son péptidos de la familia de las catelicidinas, ricos en arginina y cisteína. Las protegrinas conservan su actividad en presencia de NaCl a concentraciones fisiológicas, así como en presencia de cationes divalentes. Además conservan su actividad en un amplio rango de pH, a diferencia de las defensinas de humanos y conejos donde el pH óptimo es entre 6.5 y 7.5, las protegrinas son activas a pH 4.5 contra bacterias ácido tolerantes gram-negativas o levaduras. De igual forma las protegrinas naturales son activas a concentraciones micromolares. Por tal motivo es importante establecer sistemas para su producción, y la expresión de proteínas en cloroplasto es uno de los sistemas con ventajas prometedoras. La manipulación genética de plantas, ha sido posible desde hace varias décadas cuando el grupo del Dr. Montagu logró por vez primera introducir genes foráneos al genoma de las plantas (Herrera-Estrella y col., 1983). La producción heteróloga de proteínas en plantas ofrece ventajas con respecto a otros sistemas como: bajos costos de producción en comparación con biorreactores, ó animales transgénicos; la purificación de la proteína heteróloga es económica y a veces no es necesaria; se evita contaminación por toxinas o secuencias virales que pueden tener otros sistemas (Giddings, 2001). La introducción de material genético y expresión de proteínas en cloroplastos (Maliga, 1993), posee diversas ventajas con respecto a la transformación nuclear: (1) Contiene de 10-100 copias de genoma por plástido, (2) Los niveles de producción de proteína recombinante son altos (>15% PTS), (3) Es posible expresar genes en forma de operón, (4) No se ha reportado silenciamiento de genes. La lechuga como modelo de expresión, permite obtener plantas transgénicas en tiempos cortos, que se comen sin procesamiento térmico. Con base en lo anterior en el presente trabajo nos enfocamos a transformar el genoma de cloroplasto de lechuga con genes bicistrónicos, para sobreproducir tres protegrinas de origen porcino (PG1, PG3cc, PGIB367) mediante el uso de genes sintéticos optimizados para expresarse en el cloroplasto de lechuga.

Capítulo 4
MATERIAL Y EQUIPO

IV. MATERIAL Y EQUIPO

4.1 Material biológico

Material biológico	Fuente
<i>Escherichia coli</i> Top 10 F ⁺ : F ⁺ { <i>lacIq Tn10</i> (TetR)} <i>mcrA</i> .(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) F80 <i>lacZ</i> .M15 . <i>lac</i> ? 74 <i>recA1 deoR araD139</i> .(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>	Donadas por el Dr. Gerardo Argüello Astorga del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.
<i>Escherichia coli</i> DH5 α F ⁺ / <i>endA1 hsdR17</i> (<i>r_k⁻ m_k⁺</i>) <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA</i> (<i>NaI</i> ^r) <i>relA1 D</i> (<i>lacIZYA-argF</i>)U169 <i>deoR</i> (<i>j80dlacD(lacz)</i> M15)	Donadas por el Dr. S.S. Korman de la Universidad de Illinois en Urbana-Champaign, U.S.A.
Semillas de Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>) SR1 variedad Petite havana	Donadas por el Dr. S.S. Korman de la Universidad de Illinois en Urbana-Champaign, U.S.A.
Semillas de lechuga (<i>Lactuca sativa</i>). Variedad Green Wave	Donadas por el Dr. Maseru Nakano de la Universidad de Niigata de Japón

4.2 Vectores utilizados

Vector y características	Fuente
<p>pADCt-6: Vector para la transformación de cloroplastos de lechuga. Contienen sitios para recombinación entre los genes <i>trnA</i> y <i>trnI</i>, en la región de repetidos (IR), contienen un sitio único de clonación con la enzima <i>PvuII</i> que genera sitios romos.</p>	<p>Donado por el Dr. Amit Dhingra de Washington State University, U.S.A.</p>
<p>pKCZ: Vector para la transformación de cloroplastos de tabaco. Contiene sitios para recombinación entre los genes <i>trnR-ACG</i> y <i>trnN-GUU</i>, en la región de repetidos invertidos (IR), incluye un cassette de expresión del gen <i>aadA</i> bajo el promotor <i>Prrn</i> y el terminador <i>rbcL3'</i>.</p>	<p>Donado por el Dr. Hans-Ulrich Koop del Instituto de Botánica de la Universidad de Munich, Alemania, mediante el Dr. S.S. Korban de la Universidad de Illinois en Urbana Champaign, U.S.A.</p>

4.3 Reactivos y suplementos

Reactivo	Marca
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)	Phyto Tecnology Laboratory. U.S.A.
Ácido ascórbico	Sigma Chemical Company. U.S.A.
Ácido bórico	Sigma Chemical Company. U.S.A.
Ácido Indol Acético (AAI)	Phyto Tecnology Laboratory. U.S.A.
Ácido molíbdico	Sigma Chemical Company. U.S.A.
Ácido naftalenacético (ANA)	Sigma Chemical Company. U.S.A.
Ácido nicotínico	Sigma Chemical Company. U.S.A.
Acetato de potasio	Sigma Chemical Company. U.S.A.
Acido clorhídrico	Industrial Kem de León S.A. de C.V. México
Acido fosfórico	J.T. Baker. U.S.A.
Adenina	Phyto Technology Laboratory. U.S.A.
Agar grado bacteriológico	Invitrogen. U.S.A.
Agar grado micropropagación	Phyto Technology Laboratory. U.S.A.
Agarosa	Promega. U.S.A.
Albúmina de suero bovino	Sigma Chemical Company. U.S.A.
Alcohol isoamílico	Industrial Kem de León S.A. de C.V. México
Ampicilina	Sigma Chemical Company. U.S.A.
Bencilaminopurina	Sigma Chemical Company.
Bicarbonato de sodio	J.T. Baker. U.S.A.
Bromuro de etidio	Promega. U.S.A.
Buffer de reacción para PCR	Promega. U.S.A.

Carbonato de sodio	Sigma Chemical Company. U.S.A.
Caseína	Phyto Technology Laboratory U.S.A.
Cefotaxima	Laboratorios Kendrick. U.S.A.
Cinetina	Phyto Technology Laboratory. U.S.A.
Cloroformo	Industrial Kem de León S.A. de C.V. México
Cloruro de calcio	Riedel de Haen. U.S.A.
Cloruro de cobalto	PhytoTechnology Laboratory. U.S.A.
Cloruro de magnesio	Promega. U.S.A.
Cloruro de sodio	J.T. Baker. U.S.A.
Desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Promega. U.S.A.
Dodecil sulfato de sodio (SDS)	USB. U.S.A.
EDTA	Phyto Technology Laboratory. U.S.A.
Enzimas de restricción (<i>BamHI</i> , <i>NcoI</i> , <i>SacI</i> , <i>SpeI</i> , <i>BsaI</i> , <i>NheI</i> , <i>HindIII</i> , <i>EcoRI</i> , <i>EcoRV</i> , <i>Sall</i> , <i>XbaI</i> , <i>XhoI</i> , <i>PvuII</i> , <i>SmaI</i> , <i>NotI</i> , <i>PmlI</i>)	Promega, Roche y New England Biolabs. U.S.A.
Espectinomicina dihidrocloruro	Sigma Chemical Company. U.S.A.
Etanol	Industrial Kem de León S.A. de C.V. México
Extracto de levadura	Fluka. U.S.A.
Fenol	Invitrogen. U.S.A.
Fosfato de potasio	J.T. Baker. U.S.A.
Fosfato de sodio	Sigma Chemical Company. U.S.A.
Fosfato monobásico de potasio	J.T. Baker. U.S.A.
Glicerol	Sigma Chemical Company. U.S.A.
Glicina	Riedel de Haen. U.S.A.
Hidróxido de sodio	Industrial Kem de León S.A. de C.V. México
Higromicina B	Sigma. U.S.A.
Hipoclorito de sodio	Cloralex. México
Isopropanol	Industrial Kem de León S.A. de C.V. México

Kanamicina	GIBCO BRL. U.S.A.
Kit QIAEXII [®] gel extraction kit (purificación de ADN de fragmentos de agarosa) Cat No. 20021	Qiagen. U.S.A.
Kit Dig-Detection (Anti-digoxigenin) Cat No. 1 531 042	Roche Diagnostic. U.S.A.
Kit QIAquick [®] PCR purification Cat No. 28104	Qiagen. U.S.A.
Kit QIAprep [®] spin miniprep Cat No. 27106	Qiagen. U.S.A.
Kit Maxi Plasmid Qiagen [®] Cat No. 12162	Qiagen. U.S.A.
Kit Biolistic Optimization Bio-Rad Cat No. 1652278	Bio-Rad. U.S.A.
Kit Dura extendet duration sustrate trial Super Signal West Cat No. 37071	Pierce. U.S.A.
Kit Pico Green	Sigma Chemical Company. U.S.A.
Leupeptina	Sigma Chemical Company. U.S.A.
Manitol	Sigma Chemical Company. U.S.A.
Marcador de ADN de 1 kb	Invitrogen. U.S.A.
Microdín	Laboratorio Lacami S.A. de C.V. México
Myoinositol	Phyto Technology Lab. U.S.A.
Nitrato de amonio	Sigma Chemical Company. U.S.A.
Nitrato de potasio	Riedel de Haen. U.S.A.
Oligonucleótidos	Invitrogen. U.S.A.
Piridoxina	Sigma Chemical Co. U.S.A.
Plásmido pGem-T easy	Promega. U.S.A.
PMSF	Sigma Chemical Company. U.S.A.
p-Nitro fenil fosfato	Sigma Chemical Company. U.S.A.
RNAsa	Roche. U.S.A.
Sacarosa	Phyto Technology Laboratory. U.S.A.
Sulfato de cobre	Phyto Technology Laboratory. U.S.A.
Sulfato de magnesio	Sigma Chemical Company. U.S.A.
Sulfato de manganeso	Sigma Chemical Company. U.S.A.

Sulfato de zinc	Phyto Technology Laboratory. U.S.A.
Sulfato ferroso	Sigma Chemical Company. U.S.A.
SYBR [®] Green I para teñir geles 10,000 concentrado en DMSO	Molecular Probes. U.S.A.
T4 ADN Ligasa	Invitrogen, Promega. U.S.A.
Taq ADN Polimerasa	Roche. U.S.A.
Taq ADN Polimerasa	Producida en el laboratorio. México
Taq Platinum Pfx ADN Polimerasa	Invitrogen U.S.A.
Terrazole	Uniroyal Chemical Company. U.S.A.
Thidiazurón (TDZ)	Sigma Chemical Company. U.S.A.
Tiamina	Phyto Technology Laboratory. U.S.A.
Tierra Cosmopeat	COSMOCEL. México
Tris base	Promega. U.S.A.
Tween 20	Sigma Chemical Company. U.S.A.
Yoduro de potasio	Riedel de Haen. U.S. A.
Zeatina (E)-6-(4-hidroxy-3-methylbut-2-enylamino)purine)	Sigma. U.S.A.

4.4 Equipo

Equipo	Proveedor
Agitador magnético con placa de calentamiento	Corning, U.S.A.
Autoclave eléctrica Sterilmatic mod. STM-E tipo C	Market Forge, U.S.A.
Balanza analítica eléctrica mod. SA210D	Scientech, U.S.A.
Balanza granataria mod 1400	Ohaus, U.S.A.
Baño María digital mod. Isotemp 1025	Fisher Scientific, U.S.A.
Cámara bioclimática mod. Mac-510	Lumistell, México.
Cámara de electroforesis horizontal mod. Minisub-cell GT	Bio-Rad, Italia.
Cámara de Electroforesis	OWL Separation System, U.S.A.
Cámara fotográfica mod. DSCF717	Sony Cyber Shot, Japón.
Campana de extracción de humos mod. CS línea 2000	Fisher-Aldher, U.S.A.
Campana de flujo laminar	Fisher-Aldher, U.S.A.
Campana de flujo laminar	VECO S.A de C.V., México.
Centrífuga mod. RC 5C Plus	Sorvall, U.S.A.
Congelador mod. CVC15	Nieto, México.
Cuarto de incubación de cultivos vegetales	Lumistell, México.
Electroporador mod. ECM 630	BTX, Division of Genetronics, Inc, Alemania.
Electroporador GENE Pulser II	Bio-Rad, U.S.A.
Espectrofotómetro mod. DU 530	Beckman, E.U.A.
Fluorómetro mod. Genios	TECAN, Austria.
Fotodocumentador de geles mod. EpiChemi3 Darkroom	UVP, U.S.A.
Fuente de poder mod. EC105	Termo EC, U.S.A.
Fuente de poder mod. Power PAC300	Bio-Rad, E.U.A.
Microcentrífuga mod. mini Spin	Eppendorf, Alemania.
Microcentrífuga refrigerada mod. 5415	Eppendorf, Alemania.
Pistola para ensayos de biobalística PDS-1000/HE Bio-Rad, Life Science	Bio-Rad, Francia.
Placa de calentamiento mod. PC420	Corning, U.S.A.
Potenciómetro mod. 430	Corning, Inglaterra.
Refrigerador modelo R-14	Torrey, México.

Termociclador mod. Touchene Gradient	Techne, Inglaterra.
Termomezclador R mod. 22331	Eppendorf, Alemania.
Transiluminador mod. FBTIV-88	Fischer Scientific, U.S.A.
Untracongelador mod. UN-6613A35	Nuaire, E.U.A.
Vortex mod. Genie – 2	Fischer Scientific, E.U.A.

Capítulo 5
METODOLOGÍA

V. METODOLOGÍA

5.1 Preparación de soluciones y medios de cultivo

5.1.1 Medios de cultivo para plantas

El medio base que se utilizó fue el de Murashigue y Skoog (MS), 1962. Los compuestos para preparar el medio se enlistan en el Apéndice 10.1, los componentes se disolvieron en agua desionizada estéril y se almacenaron en alícuotas de 250 mL a 4°C. La mezcla V, fue almacenada a temperatura ambiente. Se preparó una mezcla de sales MS 2X concentrada, donde se agregaron 80 mL de cada una de las cinco soluciones (100X), se aforó a 4 L y se almacenó a 4°C.

En caso de contar con el medio MS premezclado en polvo, se preparó pesando 4.3 g de MS (Phytotechnology[®]) y se agregaron 800 mL de agua. Posteriormente se agregaron 30 g de sacarosa, los reguladores de crecimiento y las vitaminas necesarias, además de ajustar el pH a 5.7. El pH fue ajustado con hidróxido de sodio 1.0 ó 0.1 N y ácido clorhídrico 1.0 ó 0.1 N y se ajustó el volumen a 1 L.

Si no se contaba con las sales MS en polvo de Phytotechnology[®], se midieron 500 mL de la mezcla de sales MS 2X citada anteriormente, y se agregaron 300 mL de agua desionizada. Posteriormente se agregaron 30 g de sacarosa, los reguladores de crecimiento y las vitaminas necesarias, se ajustó el pH a 5.7 o 5.8. Finalmente se aforó a 1 L con agua destilada. Para los medios semisólidos se añadieron 7 gramos de fitoagar ó 2.5 gramos de gelán espolvoreándose poco a poco, y evitando que se hiciera grumos. Los medios se esterilizaron a 15 lb/pulgada² durante 15 minutos.

Cuando fue necesario, el antibiótico de selección previamente esterilizado por filtración, se añadió al medio de cultivo estéril, procurando que la temperatura del medio se encontrara alrededor de los 50°C, para evitar la formación de grumos en el medio cuando se encontraba muy frío y la inactivación del antibiótico, cuando el medio se encontraba muy caliente.

En el Apéndice 10.1 y 10.3 se presentan las Tablas en las cuales se describe la composición de los medios de cultivo, con los reguladores de crecimiento y vitaminas del sistema vegetal empleado.

5.1.2 Vitaminas para medios de cultivo

Se prepararon vitaminas concentradas, de acuerdo a los requerimientos necesarios para cada planta en particular. Las vitaminas preparadas para los sistemas vegetales de *Nicotiana tabacum* (tabaco), *Lactuca sativa* (lechuga), se describen en Tablas en el Apéndice 10.2.

5.1.3 Preparación de antibióticos, reguladores de crecimiento y agentes antioxidantes

El suministro de los reguladores de crecimiento y agentes antioxidantes en los medios de cultivo para plantas, son elementos importantes en el cultivo de tejidos ya que su proporción auxinas/ citocininas dictará el tipo de tejido a formarse y el uso de antioxidantes es requerido para evitar se muera el tejido por oxidación lo cual es común al dañar el explante. Los antibióticos se utilizaron para realizar la selección de plantas transgénicas ó para la selección de bacterias que contuvieran el ADN de interés.

5.1.3.1 Antibióticos

Kanamicina: Para un stock de 50 mg/mL, se disolvieron 5 gramos de sulfato de kanamicina en agua desionizada. Se aforó a 100 mL, se esterilizó por filtración (filtro Miller-GP, 0.2 μ m) y se almacenó a -20°C.

Espectinomicina: Para un stock de 50 mg/mL, se disolvieron 5 gramos de dihidrocloruro de espectinomicina en agua desionizada. Se aforó a 100 mL, se esterilizó por filtración (filtro Miller-GP, 0.2 μ m) y se almacenó a -20 °C.

Carbenicilina: Para un stock de 50 mg/mL, se disolvieron 5 gramos de Carbenicilina en agua desionizada. Se aforó a 100 mL, se esterilizó por filtración (filtro Miller-GP, 0.2 μ m) y se almacenó a -20 °C.

5.1.3.2 Reguladores de crecimiento

Ácido naftalenacético (ANA): Para un stock de 1.5 mg/mL, se disolvieron 150 mg de ANA en 1.0 mL de hidróxido de sodio 1N. Se aforó a 100 mL con agua desionizada estéril y se almacenó a -20 °C.

Benciladenina (BA): Para preparar un stock de 0.6 mg/mL, se pesaron 60 mg de BA y se disolvieron en 1.0 mL de ácido clorhídrico 1N, se aforó a 100 mL con agua desionizada estéril y se almacenó a -20°C.

Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D): Para un stock de 1.0 mg/mL, se pesaron 100 mg de 2,4-D y se disolvieron en 1.0 mL de hidróxido de sodio 1N, se aforó a 100 mL con agua desionizada estéril y se almacenó a -20°C.

5.1.3.3 Agentes antioxidantes

Ácido ascórbico: Para preparar un stock de 15 mg/mL se pesaron 750 mg de ácido ascórbico y se aforaron en 50 mL de agua desionizada estéril, y se almacenó a -20°C.

Adenina: Para preparar un stock de 10 mg/mL se pesaron 500 mg de adenina y se aforaron en 50 mL de agua desionizada estéril, y se almacenó a -20°C.

5.1.4 Preparación de medios de cultivo para bacterias

Medio de cultivo LB: Para preparar un litro de medio LB se pesaron 20 g de base para medio de cultivo LB, se disolvió, se aforó a 1 L con agua desionizada y se esterilizó en autoclave a 15 lb/pulgada² durante 15 minutos. Cuando fue necesario se agregaron 10 g de agar grado bacteriológico. Se aforó con agua destilada y se esterilizó de igual forma.

Medio de cultivo Mueller Hinton (M-H): Para preparar un litro de medio, se pesaron 38 g del polvo, se disolvió en agua destilada y se aforó a un litro. Se esterilizó a 15 lb/pulgada² durante 15 minutos en autoclave.

Medio de cultivo Trypticase de Soya (TSA): Para preparar un litro de medio, se pesaron 30 g del polvo, se disolvió en agua destilada y se aforó a un litro. Se esterilizaron a 15 lb/pulgada² durante 15 minutos en autoclave.

5.1.5 Preparación de soluciones

Las soluciones empleadas en la mayoría de los experimentos se prepararon de acuerdo a las instrucciones del manual de Sambrook y col., (1989).

TAE 50X: 242 g de Tris base, 57.1 mL de ácido acético glacial, 100 mL de EDTA 0.5 M pH 8, se aforó a un litro con agua destilada, se esterilizó y se almacenó a temperatura ambiente.

Agarosa: Se preparó de acuerdo al porcentaje a utilizar, por ejemplo, si se desea preparar al 1% en 100 mL, se añadió un gramo de agarosa y se aforó a 100 mL con TAE 1X, se calentó en microondas hasta disolver y la agarosa no utilizada, se almacenó a temperatura ambiente.

5.2 Soluciones Bradford para cuantificación de proteínas

Solución A: Para preparar la solución A se mezclaron 25 mL de etanol al 95%, 50 mL de ácido fosfórico al 85% y 87.5 mg de azul de Coomassie, se agitó hasta disolver completamente, se filtró con papel filtro y se almacenó a 4°C.

Solución B: La solución B se preparó mezclando 7.5 mL de etanol al 95%, 15 mL de ácido fosfórico y 15 mL de la solución A. Se aforó a 250 mL con agua destilada estéril y se almacenó a 4°C.

Buffer salino de fosfatos (PBS): Para preparar un litro se pesaron 1.42 g de fosfato de sodio, 408 mg de fosfato de monobásico de potasio y 5.85 g de cloruro de sodio, se disolvieron en agua destilada estéril, se ajustó el pH a 7.4 con ácido clorhídrico 1 N/hidróxido de sodio 1.0 N, se aforó a un litro con agua desionizada.

5.3 Aislamiento y purificación de ADN

5.3.1 Extracción de ADN plasmídico de *E.coli*

Para la extracción de ADN plasmídico se utilizaron dos metodologías, una fue utilizando el Kit QIAprep[®], en el cual se siguieron las instrucciones del fabricante. La otra fue el método alternativo se describe a continuación:

Miniprep método de lisis alcalina de Birbioim (BD) Sambrook y col. (1989).

Solución I	Solución II (Se prepara al momento de usarla)	Solución III
EDTA 10mM pH 8.0	NaOH 0.2N	Acetato de Potasio 3M
Tris-HCl 25mM pH8	SDS 1%	Ácido acético glacial
Glucosa 2M		5.75ml

Se tomaron 1.5 mL de cultivo bacteriano crecido en el medio de selección apropiado durante 12 horas. Se centrifugó a 13000 rpm por 5 minutos, para posteriormente eliminar el sobrenadante. Enseguida se añadió 150 µL de la solución I de Birbioim (BD) y se resuspendió la pastilla con vórtex. Inmediatamente se agregaron 300 µL de la solución II de BD recién preparada, la muestra se agitó por inversión 5 veces, hasta observar como la solución tiende a verse ligeramente transparente. Se añadieron 225 µL de la solución III de BD, se mezcló por inversión y se colocaron los tubos por 5 minutos en hielo, se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos y finalmente se recuperó la fase acuosa.

Cuando fue necesario al notar la fase acuosa turbia se agregó un volumen de fenol-cloroformo (50:50), se mezcló suavemente y se centrifugó 5 minutos a 10000 rpm de lo contrario se precipitó el ADN recuperando el sobrenadante y se adicionó un volumen de isopropanol frío, se mezcló por inversión, se precipitó a -20°C por 30 minutos, se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 500 µL de etanol al 70 %, se centrifugó por 5 minutos a 12000 rpm, se desechó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla por un periodo de aproximadamente 10 minutos. Se agregó RNAsa (20 µg/mL), y se incubó a 37°C por 30 minutos, nuevamente se agregó fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y se precipitó el ADN un volumen de isopropanol frío, se lavó la pastilla con etanol al 70%, se centrifugó 5 minutos a 12000 rpm y se secó la pastilla a 50-60 °C, finalmente se resuspendió en 20 µL de agua milli “Q”.

5.3.2 Extracción de ADN plasmídico de *E.coli* en grandes cantidades (Maxiprep)

Cuando era necesario obtener grandes cantidades de ADN, fue necesario partir de cultivos celulares crecidos en un volumen mayor de medio, y se recurrió a la técnica de maxiprep. Al igual que en el miniprep, para la extracción de ADN plasmídico se utilizaron dos metodologías, una fue utilizando el Kit Maxi Plasmid Qiagen[®], en el cual se siguieron las instrucciones del fabricante, y la otra metodología se describe a continuación:

5.3.2.1 Maxiprep modificado de Sambrook y col. (1989)

Se inocularon 2 mL de un cultivo bacteriano fresco en un matraz con 200 mL de LB con el antibiótico necesario y se incubó durante la noche a 37°C, con agitación vigorosa a 300 rpm. Se centrifugó el cultivo bacteriano a 8000 rpm a 4°C durante 10 minutos.

Se añadieron 5 mL de la solución I (BD) y se resuspendió la pastilla de bacterias utilizando la fuerza mecánica del vórtex, posteriormente se agregaron 10 mL de la solución II (BD), recién preparada y se mezcló por inversión 6 veces, hasta ver como se tornaba ligeramente transparente la mezcla, se dejó reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente y se agregan 7.5 mL de la solución III (BD), se mezcla utilizando el vórtex y se incuba en hielo durante 10 minutos.

Se centrifuga durante 15 minutos a 13000 rpm a 4°C. Al sobrenadante se le agrega un volumen de isopropanol frío y se incuba a -20°C durante 30 minutos. Se centrifuga durante 15 minutos a 13,000 rpm, se tira el sobrenadante y la pastilla recuperada se lava con etanol a 70%. Se deja la pastilla secando y se resuspende en 1 mL de TE1X ó agua destilada estéril, para posteriormente agregar 4µL de RNasa (20 µg/mL). Se incuba durante 1 hora a 37°C y se agrega un volumen de fenol-cloroformo (50:50), se centrifuga 10 minutos a 5000 rpm en una microcentrífuga, se recupera la fase acuosa y se repite este lavado por segunda ocasión. Se recupera el sobrenadante y se agrega un volumen de isopropanol frío. Se incuba durante 1 hora a -20 C y se centrifuga durante 15 minutos a 13000 rpm. Se elimina el sobrenadante y se lava la pastilla con etanol al 70%, se seca la pastilla y se resuspende el ADN en agua desionizada estéril ó en TE1X.

5.3.4 Extracción de ADN de plantas

Buffer de extracción*

Tris 100 mM pH 8

NaCl 500 mM

EDTA 50 mM

*Se esterilizan los componentes y se añade 2% de polivinilpirrolidona y 2% de Cetil trimetilamonio bromidido (CTAB) inmediatamente antes de usarse.

Para la extracción del ADN de plantas y callos se utilizó el protocolo descrito por Dellaporta (1983). Se congelaron 50 mg de tejido vegetal en nitrógeno líquido, se trituraron en un tubo Eppendorf® con un pistilo de plástico y se adicionaron 480 µL de buffer de extracción, posteriormente se adicionaron 37.5 µL de SDS 20% y se mezcló con el pistilo. Se incubaron las muestras a 60 °C por 10 minutos mezclando ocasionalmente para evitar agregaciones en el homogenizado. Se añadieron 94 µL de acetato de potasio 5 M sobre el extracto, se mezcló invirtiendo los tubos y se incubó a 4°C por 5 minutos. Posteriormente se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos. La fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo para realizar un lavado con 600 µL de cloroformo, posteriormente se centrifuga a 13000 rpm durante 5 minutos y se transfiere la fase acuosa a un tubo nuevo. Se agrega 4 µL de RNAsa (20 µg/mL) y se incuba a 37°C durante 1 hora. Después de la incubación se mezcló con un volumen de isopropanol frío, y se incubó a -20°C durante 30 minutos. Se centrifugó a 13,000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo y se añadieron 400 µL de etanol al 70%. Se centrifugó a 13000 rpm por 3 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se secó la pastilla al aire, se resuspendió la pastilla en 50 µL buffer TE1X o agua milli "Q". El ADN se almacenó a -20°C.

5.4 Métodos de cuantificación de ADN

Espectrofotetría: La cuantificación se realiza utilizando un espectrofotómetro (Beckman®). La muestra se prepara haciendo una dilución 1:200 con 5 µL del ADN en 995 µL de agua destilada. Se utiliza una celdilla de cuarzo para hacer la lectura a una longitud

de onda de 260 nm. El equipo ya tiene la fórmula para hacer la conversión de absorbancias a concentración de ADN en ng/ μ L tomando en cuenta el factor de dilución.

Fluorometría: Para la cuantificación de ADN se empleó un fluorómetro Tecan modelo genios, empleando el kit Pico Green[®]. Se preparó una dilución del estándar de Pico Green 1:400 en TE 1X y se colocaron 198 μ L de esta solución en placas de 96 pozos. Se añadieron 2 μ L de la solución problema y se realizó la medición de fluorescencia (a 485 nm excitación/535 nm emisión). Para la curva de calibración se emplearon estándares de 1, 10 y 50 ng/ μ L y los datos fueron analizados en el software Magellan 4[®]. Este es el método mas recomendado aunque mas costoso que el anterior por el uso de estándares.

Gel de calidad de ADN: El método de gel de calidad consiste en preparar agarosa al 1% y se corren las muestras a la par de un Marcador de peso molecular de 1 kb, para observar si no hay degradación del ADN. Se pueden correr muestras de ADN en las que se conozca la concentración ó marcadores de concentración conocida y el cálculo de la concentración de ADN de nuestra muestra se hace por apreciación visual o uso de un software que relaciona pixeles con concentración, lo cual no la hace tan confiable como las anteriores, pero es muy útil cuando se desea saber si el ADN no se encuentra degradado.

5.5 Amplificación de ADN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Los componentes para las reacciones de PCR (la mezcla maestra) se prepararon con anterioridad. Los oligonucleótidos se resuspenden a una concentración de 100 μ M y se prepararon stocks a 10 μ M. Los dNTPs a una concentración de 10 mM fueron preparados a partir de un stock de 100 mM, proporcionados por Promega.

Las reacciones de amplificación de genes mediante PCR fueron aplicadas en diferentes experimentos de este trabajo. A continuación se presenta en la Tabla 4 los parámetros utilizados para la PCR.

Tabla 4. Condiciones para la amplificación mediante PCR

Componentes	Identificación de plantas transgénicas ó transplastómicas	Conc. Final
Oligo F (10 μ M)	0.25 μ L	0.3 μ M
Oligo R (10 μ M)	0.25 μ L	0.3 μ M
dNTP's (10mM)	0.5 μ L	0.3 mM
MgCl ₂ (50mM)	1.5 μ L	1 mM
Buffer 10X <i>Taq</i> DNA polimerasa*	2.5 μ L	1X
<i>Taq</i> DNA polimerasa*	2.5 μ L	--
H ₂ O Milli Q	16.5 μ L	--
ADN Plantas (50ng-200ng/ μ L) ó ADN plasmídico dil (~ 20ng/ μ L)	1 μ L	--
Volumen Final	25 μ L	--

* *Taq* Polimerasa producida y purificada en el laboratorio de Biología Molecular de Plantas del IPICYT

Se llevaron a cabo las reacciones de PCR bajo condiciones controladas de temperatura de desnaturalización, alineación de oligos y amplificación. Se utilizó el equipo TouchGene[®] (Techne).

Tabla 5. Temperaturas utilizadas en la PCR

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Evento
1	94	3	<i>Desnaturalización inicial</i>
2	94	0.5	<i>Desnaturalización</i>
3	56 (Según los oligos)	0.5	<i>Alineamiento</i>
4	72	3	<i>Extensión</i>
5		30 ciclos al paso 2	
6	72	7	<i>Extensión prolongada</i>

5.6 Manipulación enzimática del ADN

5.6.1 Reacciones de digestión y purificación de ADN

5.6.1.1 Digestión para caracterización de clonas positivas

Para la caracterización de clonas, mediante digestión con enzimas de restricción, se utilizaron aproximadamente 2 µg de ADN plasmídico, el buffer de reacción 10X sugerido por el fabricante, en un volumen de reacción de 20 µL, con 0.2 U de enzima de restricción. La mezcla de reacción se dejó incubando durante 2 h a 37°C o a la temperatura sugerida por el fabricante.

5.6.1.2 Purificación de fragmentos de ADN, a partir de un producto de digestión

Se realizaron digestiones utilizando aproximadamente de 1 a 5 µg de ADN, con la enzima de restricción deseada en presencia del Buffer de reacción recomendado por la compañía y agua estéril en un volumen total de 50 µL de reacción. Se incubaron las digestiones a la temperatura adecuada por espacio de 4 horas o durante toda la noche según lo sugerido por el proveedor. Posteriormente el producto de la digestión fue separado en geles de agarosa del 1-2% dependiendo del tamaño de la banda de interés, fue cortada utilizando un bisturí limpio, la cual fue observada brevemente con intensidad baja de luz UV, finalmente se utilizó el QIAquick® Gel Extraction kit de Qiagen, y siguiendo las instrucciones del proveedor, se purificó el ADN.

5.6.2 Reacciones para generar extremos romos

El procedimiento para generar extremos romos con el fragmento Klenow de la Polimerasa fue el sugerido de acuerdo a las recomendaciones del fabricante: aproximadamente 800 ng de ADN con extremos cohesivos 5', se agregaron a 2 µL de Buffer 10X, 1 µL de dNTP's 10 mM, 1 µL de Klenow (2 U/µL) y agua desionizada estéril para 20 µL de volumen de reacción, y se incubó 20 min a 37 °C. Debido a que la enzima Klenow tienen actividad de endonucleasa para rellenar y exonucleasa para rasurar, también se usó para generar extremos romos al rasurar los extremos 3', lo cual se realizó de la

misma forma que para rellenar, solo que no se usaron dNTP's para favorecer su actividad de exonucleasa.

5.6.3 Reacciones de ligación y purificación

Se siguieron las instrucciones del fabricante para la ligación, usando un rango molar 1:1 o 3:1 inserto-vector. Se agregó T4 DNA ligasa comercial (Promega®) y se agregó el Buffer de reacción 10X, en un volumen total de 20 μ L de reacción.

Ejemplo de reacción común:	
Inserto	x μ L
Vector	y μ L
10X Bufer de ligación	2 μ L
H ₂ O destilada	(17-x-y) μ L
T ₄ DNA ligasa	(1U/ μ L) 1 μ L
Volumen final	20 μ L

La reacción de ligación se incubó durante toda la noche a 4 °C.

5.7 Transformación de *E. coli* con los plásmidos recombinantes

5.7.1 Preparación de células calcio competentes

Se prepararon células competentes a partir de un cultivo de *E. coli* Top 10 F' ó DH5a de 24 horas, crecido en caldo LB a 37 °C. De este preinóculo se tomaron 500 μ L y se añadieron a 50 mL de caldo LB, se incubó por 90 minutos a 37°C y agitación de 150 rpm. El cultivo se enfrió en baño de hielo y se centrifugó 7 minutos a 8000 rpm, se descartó rápidamente el sobrenadante y se mantuvieron las bacterias en hielo todo el tiempo. La pastilla se lavó con 7.7 mL de una solución fría de cloruro de calcio 0.1 M y glicerol al 15%, y se volvió a empacar por centrifugación. Finalmente las células se resuspendieron en 1.27 mL de cloruro de calcio 0.1 M + 15% glicerol y se almacenaron a -70 °C en alícuotas de 30 μ L.

5.7.2 Método de transformación mediante choque térmico

Para realizar la transformación, las células calcio competentes se descongelaron sobre hielo y se añadió 3.0 μ L del ADN a introducir en ellas, se mezcló y se incubaron en hielo por 15 minutos. Los tubos se llevaron a un baño a 43°C por 1 minuto y se regresaron inmediatamente al hielo por 10 minutos. Se añadió 1 mL de medio de cultivo LB y se incubó 40 minutos a 37°C y 150 rpm. Después, 100 μ L del cultivo se inocularon en agar LB con 100 mg/L del antibiótico adecuado según fuera el caso.

5.8 Ensayos de detección de péptidos recombinantes en *E.coli*

5.8.1 Extracción de proteínas

Buffer de extracción de proteínas:

Tris 20 mM pH=7.9

NaCl 0.5 mM

10% Glicerol

PMSF 1mM

Cóctel de inhibidor de proteasas 200 μ L (AEBSF, Bestatina, E-64, EDTA y Pepstatina SIGMA®).

El preinóculo crecido durante 12 h a 37°C con el antibiótico adecuado, se centrifuga a 4000 rpm durante 5 minutos a 4°C, la pastilla de células se lava dos veces con 500 μ L una solución de NaCl al 0.9%, las células se resuspenden con vortex y se centrifuga nuevamente a 4000 rpm durante 5 minutos. A la pastilla se le agregan 500 μ L del buffer de extracción de proteínas y 40 μ L de cóctel de inhibidor de proteasas. Se sonicán las muestras en hielo con 5 pulsos de 10 segundos. Se centrifuga la muestra a 13000 rpm durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante constituye la fracción de proteínas solubles y la pastilla se resuspende en 200 μ L del buffer de extracción y corresponde a la fracción insoluble de proteínas.

5.8.2 Análisis electroforético en geles de SDS-poliacrilamida de las proteínas totales solubles

Las muestras fueron cuantificadas por el método de Bradford y posteriormente analizadas por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (Laemmli, 1970). Los geles se prepararon en placas de vidrio empleando un equipo de electroforesis en placa vertical Bio-Rad modelo Mini-PROTEAN[®] 3 System. Se preparó el gel separador al 16% y el gel concentrador al 8%. Se analizaron alícuotas de 15-20 μ L del material proteico extraído de *E. coli*, como se describió anteriormente. Las muestras se corrieron en paralelo con estándares preteñidos de peso molecular conocido.

Preparación de las soluciones empleadas:

a).- Acrilamida-bisacrilamida (30%). Se pesaron 29.4 g de acrilamida y 0.6 g de bisacrilamida usando protección de vías respiratorias y colocándose en un vaso de precipitado de 250 mL y se disolvieron en agitación constante. Una vez disueltos se aforó el volumen a 100 mL con agua desionizada.

b).- Tampón A. (separador). Se disolvieron 9.0855 g de Tris en 25 mL de agua desionizada. Posteriormente se añadieron 2 g de SDS y se ajustó a un pH de 8.8 con HCl (1:1), la solución se aforó a 50 mL con agua desionizada.

c).- Tampón B (concentrador). Se disolvieron 3.0285 g de Tris en 25 mL de agua desionizada. Se agregaron 2 g de SDS y se ajustó el pH a 6.8 con HCL (1:1), la solución se aforó a 50 mL con agua desionizada.

d).- Persulfato de amonio. Se pesaron 0.02 g de persulfato de amonio y se disolvieron en 50 μ L de agua desionizada, agitando en un vortex (se prepara en el momento de su uso).

e).- Tampón de corrida (Buffer de corrida). Se añadieron 11.5307 g de glicina y 2.4228 g de Tris en un vaso de precipitado de 400 mL y se disolvieron con aproximadamente 300 mL de agua desionizada. Posteriormente se agregaron 2 mL de SDS al 20 %. La solución se aforó a 400 mL con agua desionizada.

f).- Solución solubilizadora. Se añadieron 5.7 g de SDS, 25 mg de azul de bromofenol, 25 mL de Tris 1M pH 8.0, 28.6 mL de glicerol y agua c.b.p. 100 mL. Al momento de utilizarse se adicionó 1 μ L de 2-mercaptoetanol por cada mL de tampón de

muestra.

Para la preparación del gel separador al 14% y el gel concentrador al 6% se tomaron las siguientes cantidades:

Gel separador 16%		Gel concentrador 6%	
Acrilamida	5.36 mL	Acrilamida	1.072 μ L
Tampón A	3.75 mL	Tampón B	1.6 μ L
Agua destilada	0.81 mL	Agua destilada	1.275 mL
Persulfato de amonio	75 μ L	Persulfato de amonio	48 μ L
Temed	5 μ L	Temed	5 μ L

5.8.3 Condiciones de electroforesis

Las proteínas a analizarse se corrieron paralelamente con los estándares preteñidos de peso molecular conocido. La electroforesis se realizó a voltaje constante empleando para el gel concentrador una corriente eléctrica de 50 milivolts durante 30 min y para el gel separador 100 milivolts por 2.5 h, o hasta que la marca de azul de bromofenol estuvo a una distancia aproximada de 1-2 mm del extremo inferior de la placa.

5.8.4 Tinción de los geles con azul de Coomassie

Finalizada la electroforesis, los geles se tiñeron durante 1 h por inmersión en una solución de azul de Coomassie al 0.5% (p/v) en alcohol isopropílico al 25% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v), con agitación suave a temperatura ambiente. La decoloración de los geles se realizó mediante cuatro pasos sucesivos de 2 h cada uno en una solución de alcohol isopropílico al 20% y ácido acético a 10% en agua destilada, a temperatura ambiente y con agitación suave. Los geles obtenidos previamente teñidos, fueron fotografiados y se analizó el patrón de bandas con el programa LabWorks[®].

5.9 Métodos de transformación en plantas

5.9.1 Esterilización y germinación de semillas

En los dos sistemas vegetales utilizados, se empleó un método general para desinfectar las semillas. Se contaron las semillas que se deseaba germinar y se colocaron en pequeñas bolsitas de gasa, cerrándolas, posteriormente en la campana de flujo laminar, se esterilizaron siguiendo los pasos que a continuación se describen: Se colocan las semillas en un vaso de precipitado estéril con alcohol al 70% durante 10 min. Se enjuagaron las semillas con agua desionizada estéril tres veces en lapsos de 2-3 min cada lavado. Se pasaron por una solución de hipoclorito de sodio (blanqueador comercial con 6% de ingrediente activo al 50%) (v/v) más 5 gotas de tween 20 (surfactante) y 15 gotas de microdin[®] (solución de plata coloidal), en esta solución se mantienen en agitación durante 15 min. Se enjuagaron las semillas con agua destilada estéril tres veces, cada enjuague de 4 a 5 min. Las semillas se pusieron a germinar en medio MS para utilizar los explantes dependiendo de la planta.

5.9.2 Transformación de cloroplastos de tabaco y lechuga mediante biobalística

5.9.3 Preparación de la suspensión de micropartículas de oro

Protocolo de Daniel y col. (2005):

Se pesan 55 mg de partículas de Oro 0.6 μ (Bio-Rad) en un tubo tipo Eppendorf[®] de 1.5 mL. Se agregó 1 mL de etanol 100% y se mezclaron por 3 min con vórtex, se centrifugó a 13,000 rpm durante 2-5 min. Se descartó el sobrenadante y se agregó 1 mL de etanol 70% (recién preparado) y se mezcló con vórtex de 1-2 min. Se incubó a temperatura ambiente por 15 min, agitando cada 3 min. Se centrifugó 3 min a 13,000 rpm durante 2-5 min, y se descartó el sobrenadante. Se agregó 1 mL de agua estéril, y se mezcló con vórtex vigorosamente durante 1 min. Se dejó a temperatura ambiente durante 1 min para permitir que las partículas se fueran hacia el fondo. Se centrifugó durante 2 min a 13,000 rpm, y se descartó el sobrenadante. Estos lavados se repitieron dos veces, para finalmente agregar 950 μ L de glicerol al 50%.

5.9.4 Preparación de material para el bombardeo

Se ensamblaron el sujetador del macroacarreador junto al macroacarreador, se envolvieron en aluminio y se esterilizaron en autoclave. Las mallas de retención fueron esterilizadas en autoclave o por inmersión en etanol al 70% y posteriormente se secaron en ambiente estéril. Los discos de ruptura se sumergieron durante 5 minutos en etanol al 70% y se dejaron secar en ambiente estéril.

5.9.5 Cobertura de microacarreadores con ADN

Se usaron 50 μL de microacarreadores preparados previamente en glicerol 50%. Se mezclaron con vórtex las partículas de oro, hasta que se encontraban completamente resuspendidas. En el siguiente orden se fueron agregando los componentes necesarios para unir el ADN a las micropartículas de oro. Todo el tiempo las partículas se estuvieron mezclando con vórtex durante 5 segundos entre cada componente:

- 1.- Se agregaron 10 μL de ADN (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$),
- 2.- 50 μL de CaCl_2 2.5M, (recién preparado),
- 3.- 20 μL de espermidina 0.1M.

Se mezcló con vórtex durante 20 min a 4°C. Se agregaron 200 μL de etanol absoluto a temperatura ambiente y se aplicó vortex, durante 5 segundos, la mezcla fue centrifugada durante 30 segundos a 8,000 rpm. Se desechó el sobrenadante y se repitieron los lavados con etanol durante al menos 4 veces, hasta que las partículas de oro eran fácilmente resuspendidas. El paso final fue resuspender las partículas en 35 μL de etanol al 100% y se dejan en hielo hasta su uso. Este material se utilizó para 5 bombardeos.

5.9.6 Preparación del material biológico

Se utilizaron hojas y callos de lechuga para bombardeo. En el caso de tabaco solamente hojas.

Se utilizaron hojas provenientes de plantas de tabaco de 6 semanas (var Petit habana, SR1) así como hojas de lechuga de 4 semanas (var Green Wave) crecidas en MS en condiciones de esterilidad. Las hojas debían ser uniformemente verdes y carnosas, y no debían ser mayor a 2.5 cm de largo por 4 cm ancho. Las hojas de tabaco fueron puestas sobre medio RMOP y las de lechuga en medio MSJ, en cajas de Petri con la cara abaxial hacia arriba para realizar el bombardeo. Los callos de lechuga fueron obtenidos al colocar hojas de lechuga en medio MSJ durante 6-8 semanas el callo fue sembrado continuamente cada semana para propagarlo y se utilizó para los experimentos de biobalística.

5.9.7 Bombardeo del material biológico de tabaco y lechuga

Se utilizó una pistola Bio-Rad con gas Helio para el disparo. Se asegura que la campana de flujo laminar al igual que la pistola se hayan esterilizado con etanol al 100%, al menos 15 minutos antes de iniciar, así como la desinfección con la lámpara de luz UV por 1 h por lo menos 10 minutos antes de prender la campana.

A continuación se describe el procedimiento para realizar el bombardeo de tabaco y lechuga, con el objetivo de introducir ADN a los cloroplastos. Se abrió la válvula del tanque de helio, se ajustó la presión del manómetro de salida a 1400 psi (lb/in²). Es importante que la presión de salida sea superior a la resistencia del disco de ruptura. Se encendió la bomba de vacío y la cámara de vacío para realizar los disparos. Se colocaron los discos de ruptura de 1100 psi para tabaco, y de 900 psi para lechuga (callo y hoja).

La suspensión de micropartículas con ADN se depositó en los macroacarreadores a razón de 10 µL por disparo. Se colocó la caja petri con la hoja o callo, a 9 cm de distancia y se cerró la cámara de vacío. Se generó vacío hasta que el indicador marcó 28 Hg (mm de mercurio). Se mantuvo el vacío y se realizó el disparo de las micropartículas con el ADN. Se retiró la placa de petri con la hoja o callo y se le colocó la tapa. Las hojas y callos

bombardeados se incubaron en medio MS0 durante 48 h a 27 °C en la obscuridad. Después de este periodo, cada hoja se cortó en piezas de alrededor de 2 mm² y las hojas de tabaco se depositaron en medio RMOP con espectinomicina 500 mg/L, mientras que las hojas y callos de lechuga se colocaron en medio MSJ con espectinomicina 50 mg/L y 100 mg/L respectivamente, para inducir la selección de las plantas transplásticas. Se utilizaron aproximadamente de 15 a 20 hojas por disparo, así como de 25-30 callos por disparo, y se bombardearon las seis construcciones bicistrónicas generadas, tanto para lechuga y tabaco.

5.10 Ensayos de actividad biológica de plantas transgénicas

5.10.1 Extracción de proteína total soluble de tejidos vegetales

Buffer de extracción de Proteínas

Fosfato de sodio 25 mM
Cloruro de Sodio 100 mM
Tritón 100X 0.5%

PBS

Buffer de Fosfatos PBS pH 7.4 con
Leupeptina 10 µg/mL

Se congelaron 100 mg de tejido vegetal utilizando nitrógeno líquido, se agregaron 500 µL de buffer de extracción de proteínas vegetales ó PBS con Leupeptina y se homogenizó la mezcla. El homogenado se centrifugó a 10,000 rpm por 5 minutos a 4°C, y se recuperó el sobrenadante. La cantidad de proteína se determinó mediante el método de Bradford (1968). Se colocaron 10 µL de la solución problema en tubos de ensayo, se añadió 1 mL del reactivo de Bradford y se midió la absorbancia a 595 nm. Se empleó albumina de suero de bovino como estándar (5-20 ng/µL).

5.10.2 Ensayos de inhibición bacteriana en placa

Se realizaron ensayos de actividad antimicrobiana con diferentes cepas bacterianas patógenas de humanos. La preparación de los medios de cultivo en los que se crecieron, se describe en el apartado 5.1.4 de la metodología.

5.10.2.1 Método de antibiograma

El método de antibiograma estima la concentración de antibiótico necesaria para inhibir el crecimiento de una cepa bacteriana (Herrera-Díaz, 2005). La bacteria se siembra homogéneamente en una placa de medio Mueller Hinton® (M-H) y sobre ella se depositan discos de papel filtro de 6 mm de diámetro impregnados con una cantidad conocida de antibiótico. El tamaño del halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar, indica la eficiencia del antibiótico. El procedimiento empleado fué el siguiente:

5.10.2.2 Preparación del inóculo

Al menos 3 a 5 colonias bien aisladas y del mismo tipo de morfología se seleccionaron de un agar de cultivo. Con un asa fueron tomadas las colonias y se transfirieron a un tubo con 4 a 5 mL de caldo tripticasa de soya (TSA). El caldo de cultivo fue incubado a 37°C hasta que alcanzó o excedió la turbidez del estándar de 0.5 de McFarland (Barrett, 1975), es decir una OD a 625 nm de entre 0.08 a 0.1 (usualmente de 2 a 6 horas). En un lapso de tiempo óptimo de 15 minutos después de ajustar la turbidez del inóculo, un hisopo se sumergió en ella y la tórula de algodón fue rotada varias veces y presionada firmemente contra la pared interna del tubo sobre el nivel de líquido. Esto remueve el exceso de inóculo. Se inocula la superficie de una placa de TSA preparada con agarosa de bajo grado de electroendosmosis al 1% (Sigma). La técnica consistió en un rayado con la tórula sobre toda la superficie, este procedimiento es repetido rayando dos o más veces, rotando la placa aproximadamente 60 °C cada vez para asegurar una distribución uniforme del inóculo. Como paso final se pasa sobre los bordes del agar, es decir en la orilla de la placa. Las tapas de la placa pueden quedar entreabiertas por 3 a 5 minutos, pero no más de 15 min, para permitir que un exceso de humedad de la superficie se absorba antes de aplicar el disco con el péptido o el antibiótico impregnado. Se evitaron excesos en la densidad del inóculo y se utilizó cultivo fresco.

5.10.2.3 Aplicación de los discos a las placa inoculadas

Los sensidiscos consistieron en discos de papel filtro de 6 mm de diámetro estériles impregnados con 5 μ L de antibiótico ó del péptido a analizar (previamente ajustando la concentración de proteína (200 μ g)). Los sensidiscos se dispensaron por caja petri sobre la superficie del agar. Cada disco fue presionado para asegurar contacto pleno con la superficie del agar. Las placas fueron invertidas, y se dejaron en reposo en aproximadamente 15 minutos para ser incubadas a 37°C.

5.10.2.4 Lectura de las placas e interpretación de los resultados

Después de 16 a 18 horas de incubación, cada placa fue examinada. Las zonas de inhibición resultantes debían ser uniformemente circulares en una capa homogénea de crecimiento. Los diámetros de la zona de inhibición fueron medidos en milímetros, pasando por el centro del disco. En todos los experimentos se utilizó carbenicilina como control positivo a una concentración de 10 μ M.

Capítulo 6
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Análisis de los genes antimicrobianos

En el presente trabajo se realizaron las construcciones bicistrónicas para la expresión de protegrinas de origen porcino en cloroplastos de tabaco y lechuga.

Originalmente los genes se encontraban en forma monocistrónica para co-bombardeo, en el vector pKCZ que contienen los sitios de recombinación homóloga para cloroplastos de tabaco (Herrera-Díaz, 2005). Por lo que se realizó un análisis de las secuencias de los genes para comenzar a realizar las construcciones necesarias.

Según el trabajo previo realizado por Herrera-Díaz (2005), se seleccionaron tres péptidos antimicrobianos de Protegrinas de origen porcino en base a la eficiencia, y el amplio rango de acción. El primer péptido seleccionado, fue la Protegrina 1 (PG1), descubierta en cerdos (Kokryakov y col. 1993). La PG1 es la más ampliamente caracterizada (Shi y col., 1998; Bellm y col., 2000; Chen y col., 2000; Mosca y col., 2000), sin embargo debido a que la Protegrina 1 puede tener actividad hemolítica, se seleccionaron dos Protegrinas sintéticas que no poseen dicha característica. La Protegrina IB367 (PG-IB237) que ya ha sido utilizada en pacientes con fibrosis quística y en pacientes con mucositis, además de que se encuentra en fase III de desarrollo (Chen y col., 2000) y finalmente en base a la selectividad antimicrobiana (activa solo contra microorganismos) se eligió la Protegrina cíclica con tres cisteínas (PG3cc) sintetizada por Tam y col. (2000). En la Figura 6 se muestra la homología entre las tres protegrinas usadas en el presente trabajo.

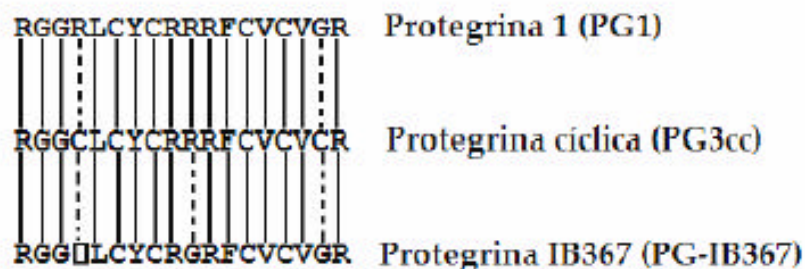


Figura 6. Homología entre las tres protegrinas seleccionadas (PG1, PG3cc y PG-IB367)

Una de las principales características de las protegrinas es que poseen dos puentes disulfuro, los cuales son de vital importancia para su actividad antimicrobiana (Zhao y col., 1995; Mangoni y col., 1996). Debido a lo anterior fue necesario conocer si es posible la formación de puentes disulfuro en el cloroplasto. En el 2000 fue posible producir en cloroplastos de tabaco una proteína que al igual que las protegrinas, al momento de la traducción iniciaba con un aminoácido diferente a metionina (fenilalanina), y que de igual forma requiere de la formación de puentes disulfuro para conservar su actividad (Staub y col., 2000). Debido a que en cloroplastos de forma natural no se sintetizan proteínas con puentes disulfuro, la estrategia que se utilizó en el trabajo de Staub y col. (2000) consistió en fusionar el gen de la Ubiquitina al gen de interés (somatotropina), aún y cuando no se conocen ubiquitin-proteasas en cloroplastos, el procesamiento de la somatotropina fue exitoso, por lo que obtuvieron un péptido con un aminoácido diferente a metionina en la parte amino terminal, sugiriendo que además de procesar el propéptido, la Ubiquitina funcionó como chaperona para formar los puentes disulfuro, lo que les permitió obtener una proteína biológicamente activa. De igual forma la suma de la Ubiquitina a la construcción del gen de la protegrina puede ayudar a que el antimicrobiano no sea efectivo ante *E. coli*, donde se realizan todas las construcciones (Staub y col., 1995).

En base a los resultados obtenidos por Staub y col., (2000), en el presente trabajo se utilizaron los genes de protegrinas fusionados a Ubiquitina, los cuales fueron diseñados por Herrera-Díaz (2005), con la finalidad de obtener protegrinas con puentes disulfuro y que iniciaran con arginina en la parte amino terminal.

Debido a que la degradación del mRNA en cloroplasto, es iniciada por el reconocimiento de ciertas regiones en el ARN por enzimas con actividad de endonucleasas, seguida por la poliadenilación y la degradación subsiguiente del mRNA, es necesario generar construcciones que sean estables para la expresión en cloroplastos. La mayoría de las secuencias de reconocimiento de las enzimas endonucleasas se localizan en la región del marco de lectura y muy cerca del comienzo del 3'UTR, es por eso la importancia de generar un extremo 3'UTR que no sea degradado por las endonucleasas presentes en cloroplasto. Por tal motivo a los genes utilizados en el presente trabajo se les adicionó una región 3'UTR del gen de *rbcL*, la cual en contraste con las regiones 3'UTR de los genes: *TpsbA* y *Trps16*, posee una gran estabilidad y relativamente baja degradación. Además en

la región 5'UTR se les adicionó una secuencia de unión a ribosomas que facilita y potencia la traducción (Kuroda y Maliga, 2002).

Los genes para las protegrinas, originalmente se encontraban bajo el promotor constitutivo de cloroplasto *Prrn* en el vector pKCZ-P5'UTR-UbPG, para la transformación de cloroplastos de tabaco, que contenía una secuencia 3'UTR y una secuencia 5'UTR, el cual corresponde a la región del gen T7g10. De igual forma el gen de selección a espectinomicina (*aadA*) se encontraba bajo el mismo promotor con una secuencia 3'UTR en el vector pKCZ-P5'UTR-*aadA*.

Los genes de las protegrinas se sintetizaron optimizando el uso de codones para su expresión en cloroplasto en la compañía Entelechon® (Alemania). El gen de la Ubiquitina fusionado con el de las protegrinas tiene un tamaño aproximado de 295 pb, y el gen de selección a espectinomicina (*aadA*) de 795 pb, y se obtuvo del vector pKCZ original. Todos los genes se encuentran en el mismo vector (pKCZ) y se conocen las enzimas de restricción que flanquean las secuencias, para poder realizar las construcciones bicistrónicas.

Los genes monocistrónicos para co-bombardío se mandaron secuenciar al CINVESTAV Unidad Irapuato, por lo que fue necesario diseñar oligos que flanquearan todo el cassette de expresión, desde el promotor hasta el terminador Fig. 7.

pKCZ-F
5'-TAGCTCCCCCGCCGTCGTTCAATGA-3'

pKCZ-R
5'-AGCACGTGGCTACGAACCACGGTGT-3'

Figura 7. Oligos para la secuenciación de los genes monocistrónicos

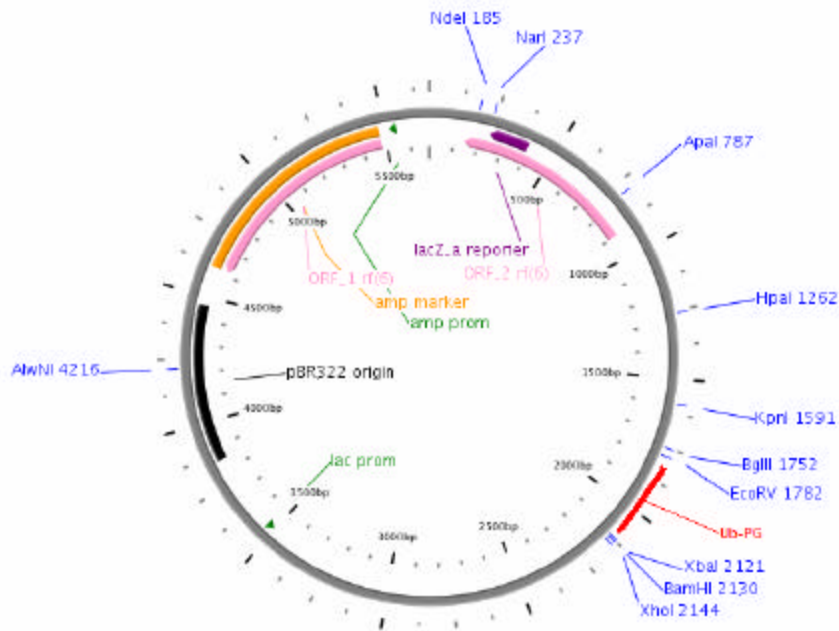
Se mando secuenciar un fragmento aproximado de 1000 pb con el oligo pKCZ-F. El análisis de secuenciación mostró que los genes de las protegrinas y del gen de selección a espectinomicina se encontraban sin mutaciones y en fase de lectura, listos para ser subclonados y generar las siguientes construcciones (Datos no mostrados).

6.2 Construcción de vectores bicistrónicos para bombardeo de tabaco

El uso de vectores bicistrónicos para la transformación de cloroplastos presenta varias ventajas sobre el co-bombardeo de genes, dentro de las cuales destaca que la expresión de ambos genes se da de forma paralela ya que se encuentran regulados por un mismo promotor, de esta manera las células capaces de crecer en medio selectivo, son capaces de expresar el gen de selección y por lo tanto el gen de interés.

Los vectores bicistrónicos se generaron a partir de cada uno de los genes individuales contenidos en el vector pKCZ. El gen de selección se encontraba en el vector: pKCZ-P5'UTR-*aadA*, y los genes de las protegrinas se encontraban en los vectores: pKCZ-P5'UTR-UbPG1, pKCZ-P5'UTR-UbPG3cc y pKCZ-P5'UTR-UbIB367. En la Figura 8 se muestran los vectores usados para la construcción de vectores bicistrónicos.

A)



B)

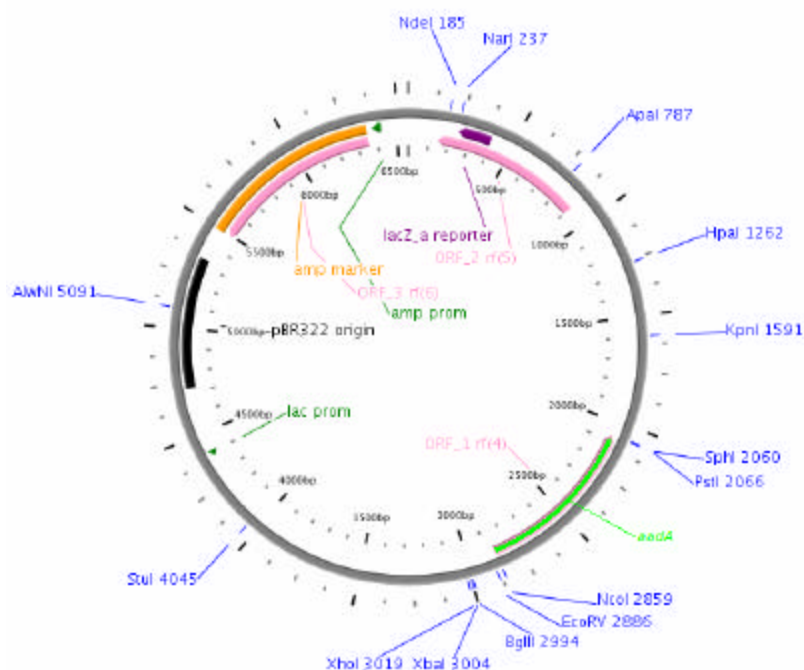


Figura 8. Vectores monocistrónicos para co-bombardeo de tabaco: A) pKCZ-Ub-PG (PG1, PG3cc, PGIB367), B) pKCZ-P5'UTR-*aadA*. En el mapa de restricción solo se observan las enzimas que solo tienen un sitio de corte.

Para generar los vectores bicistrónicos se digirió el vector pKCZ-P5'UTR-*aadA* con las enzimas *EcoRI* y *KpnI*, se purificó un fragmento de 1295 pb el cual contenía el gen de selección y se incubó con la enzima Klenow (en ausencia de nucleótidos), para eliminar el extremo 3' de cadena sencilla generado por *KpnI*. Por otro lado el vector monocistrónico se digirió con la enzima *PmlI* y el fragmento de aproximadamente 5680 pb (el cual contiene el gen de la protegrina) se purificó y se incubó con fosfatasa alcalina de camarón (SAP) para eliminar los fosfatos 5' y evitar la religación del vector. Una vez purificado el inserto y el vector se realizó una ligación utilizando la T4 DNA ligasa, para posteriormente transformar *E. coli* con la ligación. El vector pKCZ contiene el gen de resistencia a ampicilina, por lo que se utilizó ampicilina o carbenicilina para seleccionar las bacterias transformantes. A las colonias obtenidas se les realizó una PCR utilizando oligonucleótidos que amplifican el gen *aadA* (*aadA-F* + *aadA-R*, Fig. 10) de aproximadamente 795 pb.

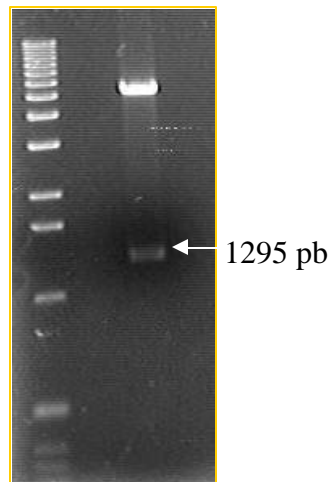


Figura 9. Digestión del vector pKCZ-P5'UTR-*aadA* con *EcoRI* y *KpnI*, para dar un fragmento de 1295 pb.

El procedimiento para la generación del vector bicistrónico fue el mismo para las tres protegrinas: PG1, PG3cc y PG IB367. A continuación se muestran los resultados de las PCR de colonia (Fig. 11, 13 y 15) así como el análisis de restricción de cada una de las construcciones bicistrónicas obtenidas para las tres protegrinas (Fig. 12, 14 y 16).



Figura 10. Oligonucleótidos para la amplificación del gen de selección a espectinomicina (*aadA*).

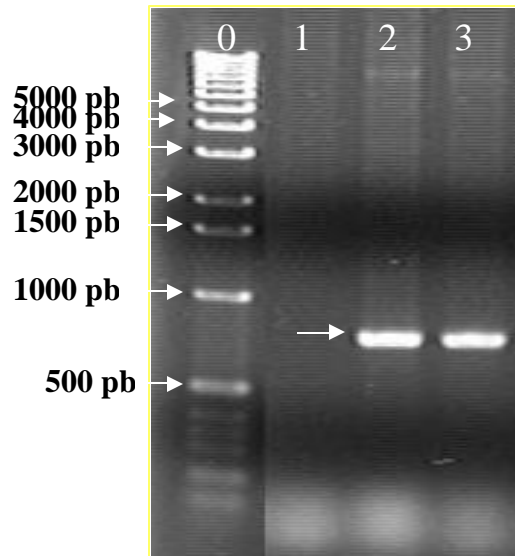


Figura 11. PCR de colonia para el vector pKCZ-UbPG1 bic. Carril 0, Marcador de 1 kb; carril 1, clona 1; carril 2, clona 2; carril 3, control + (pKCZ-*aadA*). Se usaron los oligonucleótidos *aadA*-F+ *aadA*-R.

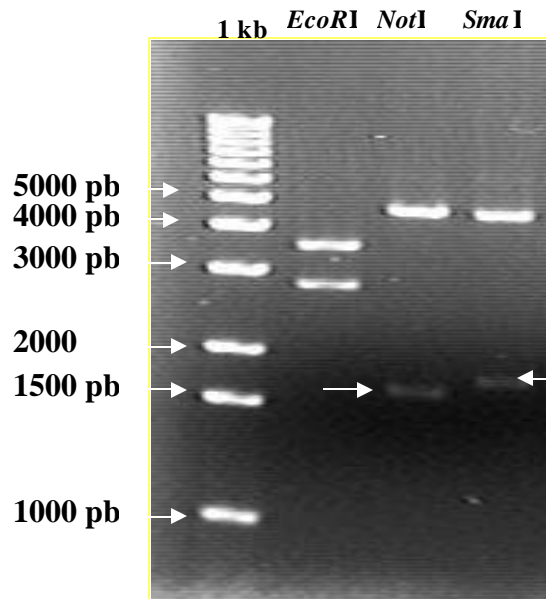


Figura 12. Análisis de restricción del vector bicistrónico pKCZ-UbPG1 bic, digerido con distintas enzimas de restricción para verificar la construcción generada. *EcoRI* (3542 pb, 2885 pb), *NotI* (4623 pb, 1817 pb), *SmaI* (1917 pb, 4523 pb).

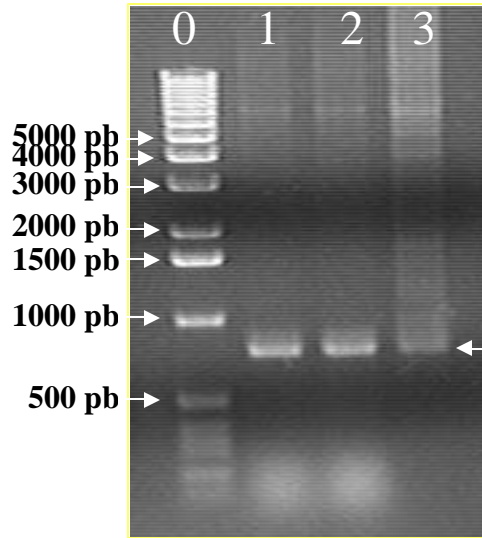


Figura 13. PCR de colonia para el vector bicistrónico pKCZ-UbPG3cc bic. Carril 0, Marcador de 1 kb; carril 1,.clona 1; carril 2,.clona 2; carril 3, control + (pKCZ-*aadA*). Se usaron los oligonucleótidos *aadA*-F+ *aadA*-R.

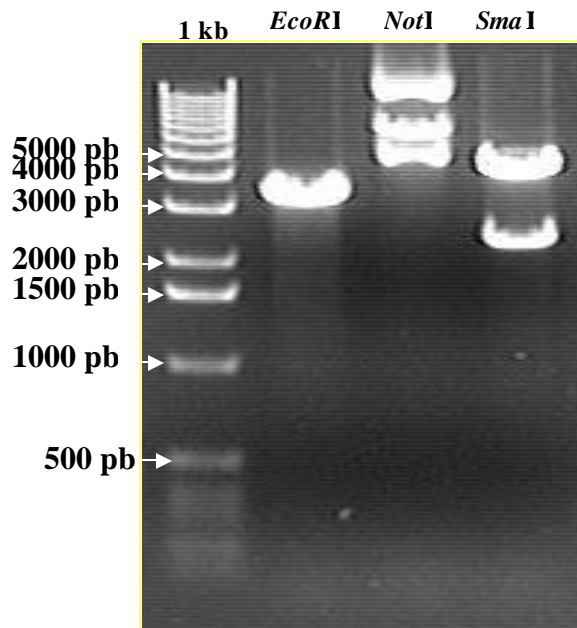


Figura 14. Análisis de restricción del vector bicistrónico pKCZ-UbPG3cc bic, digerido con distintas enzimas de restricción para verificar la construcción generada. *EcoRI* (3542 pb, 2885 pb), *NotI* (4623 pb), *SmaI* (2200 pb, 4240 pb).

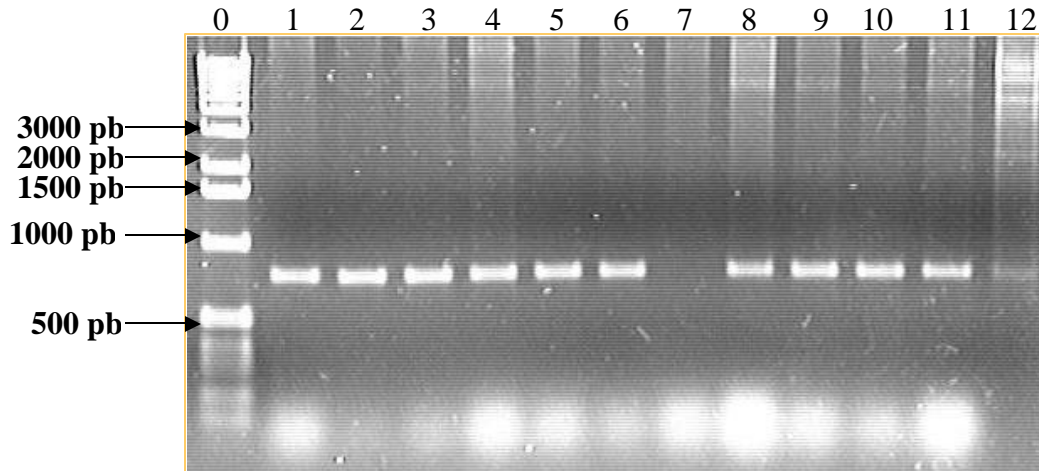


Figura 15. PCR de colonia para el vector pKCZ-UbIB367 bic. (0) Marcador de 1 kb; carriles 1-11, clonas transformantes; carril 12, control + (pKCZ-*aadA*). Se emplearon los oligonucleótidos *aadA*-F+ *aadA*-R.

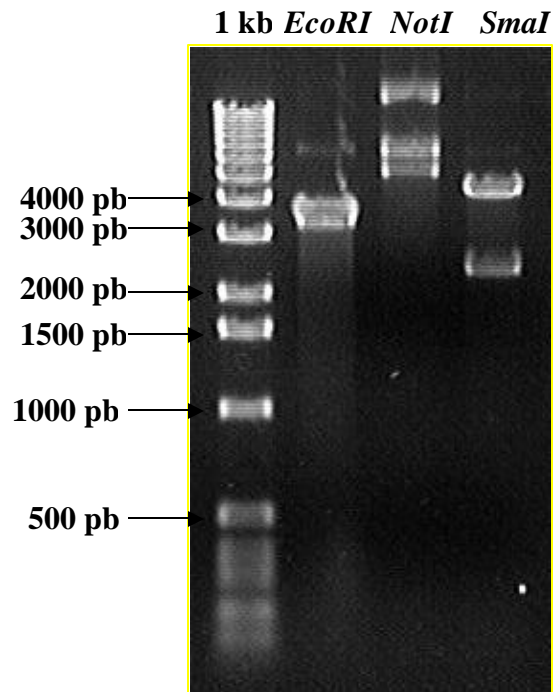


Figura 16. Análisis de restricción del vector bicistrónico pKCZ-UbIB367 bic, digerido con distintas enzimas de restricción para verificar la construcción generada. *EcoRI* (3542 pb, 2885 pb), *NotI* (4623 pb), *SmaI* (2200 pb, 4240 pb).

De esta forma se lograron realizar tres construcciones bicistrónicas de cada una de las protegrinas, cuyos nombres fueron: pKCZ-UbPG1 bic, pKCZ-UbPG3cc bic, pKCZ-UbIB367 bic. Una vez construidos los vectores bicistrónicos en el vector pKCZ se transformaron en *E. coli* TOP 10F' y se obtuvieron suficientes colonias para la obtención de plásmidos por miniprep. En la Figura 17 se muestra el mapa general del vector bicistrónico generado.

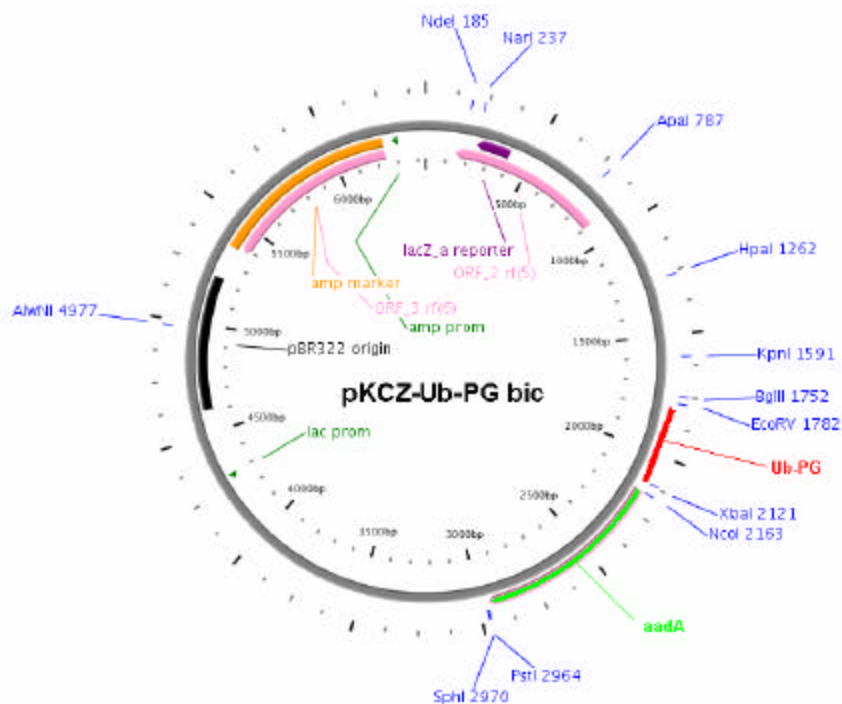


Figura 17. Mapa de restricción del vector bicistrónico.pKCZ-UbPG.

La inserción del gen *aadA* (espectinomicina) en los vectores con las protegrinas se diseñó de forma que el gen de selección fuera el segundo gen después de la protegrina, lo anterior conlleva a que los brotes transformantes que sean capaces de expresar el gen *aadA* en medio selectivo con espectinomicina, son capaces de producir la protegrina. En la Figura 18 se muestra un diagrama general de los genes bicistrónicos construidos y obtenidos.

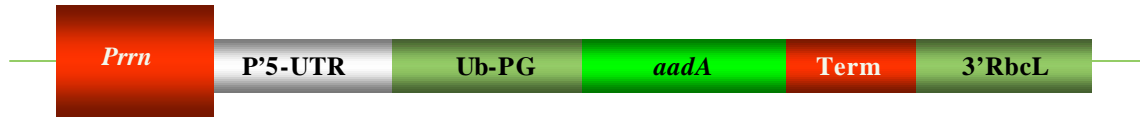


Figura 18. Construcción bicistrónica de las protegrinas. Como se observa, el primer gen en traducirse es el de la protegrina, y el segundo es el gen de selección a espectinomicina (*aadA*).

El vector pKCZ posee sitios de recombinación homóloga para tabaco (*trnR-ACG* y *trnN-GUU*), dicha característica le confiere la particularidad de poder recombinar con sitios específicos del genoma de cloroplasto de tabaco y de esta forma insertar el cassette de expresión en el genoma. Una característica en particular del vector pKCZ es que ambos sitios de recombinación homóloga fueron sintetizados de forma independiente y a su vez subclonados para formar finalmente el vector pKCZ (Zhurong, 2001). De esta forma la transformación de cloroplastos con el vector pKCZ resulta en una doble recombinación homóloga para insertar el cassette de expresión. Los múltiples eventos de recombinación que se llevan a cabo al transformar el genoma de cloroplasto con el vector pKCZ, origina la pérdida de las regiones intergénicas entre los sitios de *trnR* y *trnN*, sin embargo esto no tiene repercusión en el funcionamiento normal del cloroplasto (Griffiths y col., 1998). Es conveniente notar que la inserción de un transgén, bajo la regulación del promotor *Prn*, en el vector pKCZ, puede ocasionar la pérdida del mismo por eventos de recombinación que pueden sucederse con el promotor *Prn* propio del pKCZ que controla la expresión del gen de selección (comunicación personal Dr. Koop). Por tal motivo es importante generar construcciones con un solo promotor *Prn* que controle tanto el transgén como el gen de selección.

6.3 Construcción de vectores bicistrónicos de recombinación homóloga para la transformación de lechuga por biobalística

El genoma de cloroplasto de todas las especies está muy conservado (Palmer, 1985). Esto representa una ventaja desde el punto de vista de la transplantómica ya que es posible transformar distintas especies con un mismo vector diseñado para una sola especie. Por lo

tanto es posible utilizar los vectores aquí construidos para transformar y expresar los genes de protegrinas en otras especies vegetales. Sin embargo, de acuerdo con lo descrito por Dhingra (2005), lo más preciso para la transformación de cloroplastos es usar un vector específico de especie, ya que en teoría se podrían obtener una mayor cantidad de brotes transformantes. Por tal motivo, decidimos construir un vector específico para la transplantómica de lechuga.

La estrategia que se siguió para la construcción de vectores recombinantes bicistrónicos específicos para lechuga fue la subclonación de las construcciones bicistrónicas ya generadas en el vector pKCZ, dentro del vector pADCt-6 donado por el Dr. Amit Dhingra (Dhingra, 2005) que porta secuencias de recombinación homóloga para lechuga (*trnA* y *trnI*). Las construcciones bicistrónicas generadas en el vector pKCZ se diseñaron de forma que fuera posible obtener el cassette de expresión completo con la enzima *SmaI*, y poderlo clonar en el sitio único de clonación *PvuII* del vector pADCt-6. En la Figura 19 se muestra la estrategia que se siguió para la generación de las construcciones correspondientes para la transformación de cloroplastos de lechuga.

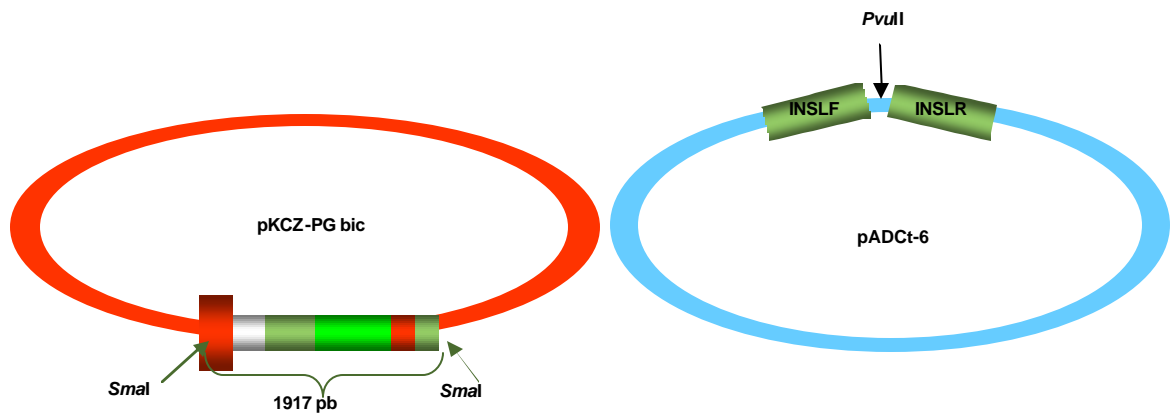


Figura 19. Estrategia para la generación de vectores para recombinación homóloga conteniendo las construcciones bicistrónicas para la transformación de cloroplastos de lechuga.

Por lo tanto, para realizar las construcciones, los vectores bicistrónicos se digirieron con la enzima *SmaI* y se purificó el cassette de aproximadamente 1917 pb. Al mismo tiempo el vector pADCt-6 se digirió con la enzima *PvuII*, se purificó y se incubó con la

enzima fosfatasa alcalina para eliminar el fosfato 5' y evitar la religación del vector. Después de la purificación del inserto y vector, se realizó la ligación y finalmente la transformación. Las clonas transformantes obtenidas se analizaron por una PCR de colonia usando los oligonucleótidos que amplifican el gen de selección *aadA*.

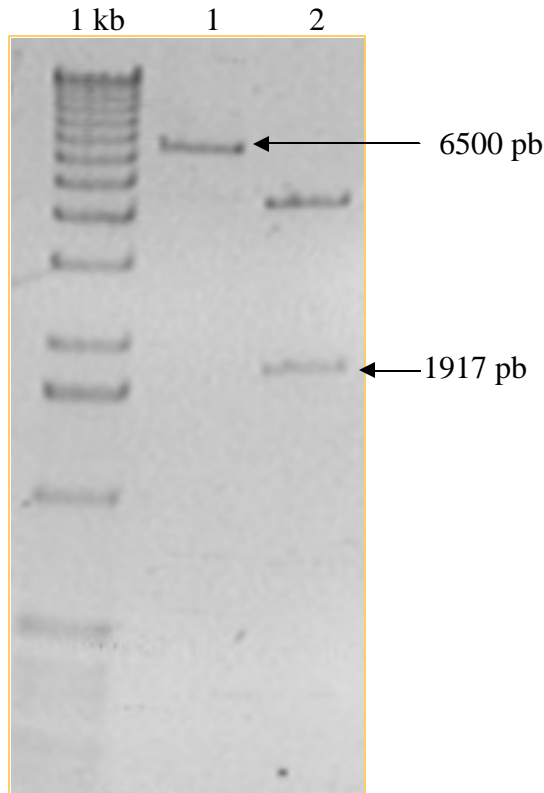


Figura 20. Generación de la construcción bicistrónica en el vector pADcT-6. 1) pADcT-6 (*PvuII*); 2) pKCZ-PG1 bic (*SmaI*).

Las tres construcciones bicistrónicas previamente obtenidas en el vector pKCZ fueron subclonadas en el vector pADcT, por lo tanto se obtuvieron otras tres construcciones para bombardear lechuga, las cuales corresponden a los siguientes plásmidos: pADcT-PG1 bic, pADcT-PG3cc bic, y pADcT-PGIB367 bic.

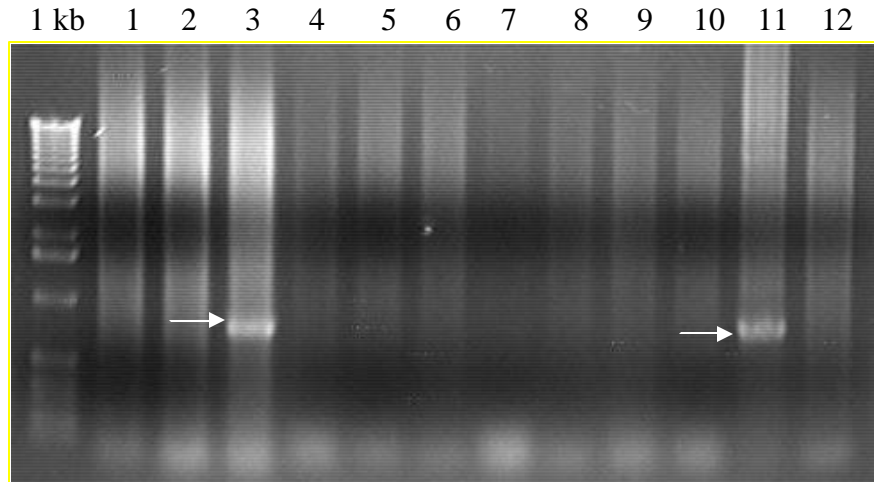


Figura 21. PCR de colonia para el vector pADCt-PG1 bic. Carriles 1-10, posibles donas transformantes; carril 11, Control (+) pKCZ-PG1 bic; carril 12, control negativo. Se utilizaron los oligonucleótidos *aadA-F* + *aadA-R*. En el gel se indican con flechas los productos de PCR de clonas positivas.

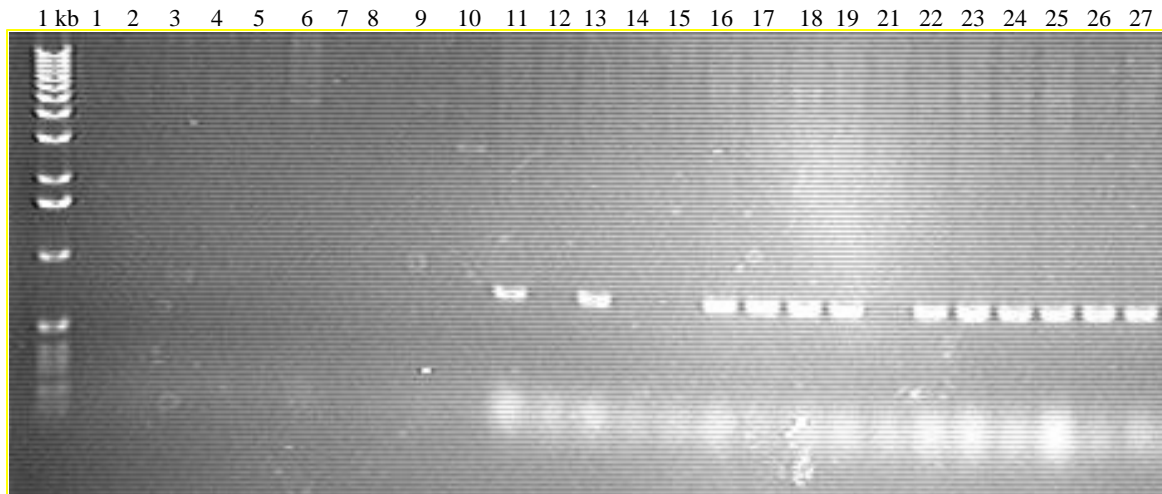


Figura 22. PCR de colonia para el vector pADCt-PG3cc bic. Carriles 1-26, posibles clonas transformantes; carril 27, Control (+) pKCZ-PG3cc bic. Se utilizaron los oligonucleótidos *aadA-F* + *aadA-R*.

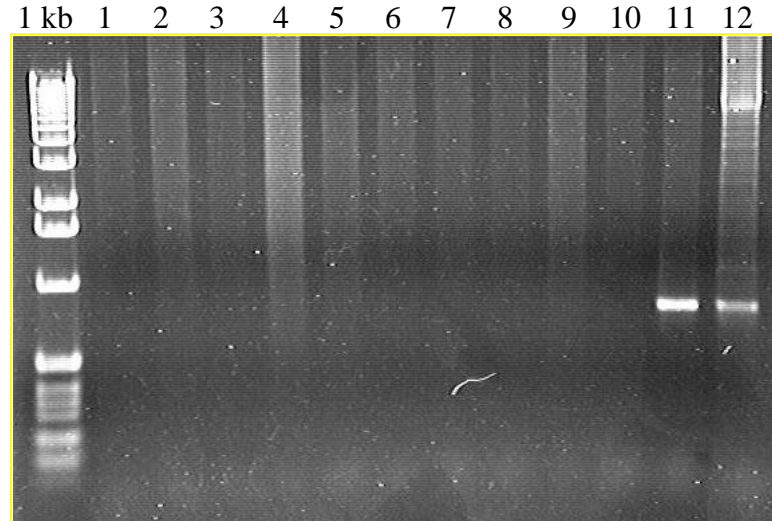


Figura 23. PCR de colonia para el vector pADcT-PGIB367 bic. Carriles 1-11, posibles clonas transformantes; carril 12, control (+) pKCZ-PGIB367 bic. Se utilizaron los oligonucleótidos *aadA-F* + *aadA-R*.

Las construcciones realizadas para la transformación de lechuga (al igual que las construcciones para tabaco), se caracterizan por tener sitios de recombinación homóloga específicos de especie. Los sitios se encuentran en las regiones de repetidos invertidos, específicamente en la región 16S-*trnI* y *trnA-23S* del genoma de cloroplasto.

El vector pADcT a diferencia del vector pKCZ tiene la característica de que la región de recombinación fue amplificada en una sola reacción de PCR partiendo del ADN de lechuga usando los oligonucleótidos de la Figura 24. El amplicón se clonó en el vector pBluescript (+), y de esta forma se obtuvo pADcT. Para el caso de pKCZ se usaron dos regiones de recombinación homóloga amplificadas por separado. La parte que ingresa al genoma del cloroplasto de tabaco al realizarse la doble recombinación homóloga es diferente a la existente en el genoma del cloroplasto pero no afecta la función del mismo, por otro lado la parte que ingresa al recombinar el vector pADcT (16S-*trnI* y *trnA-23S*) es la misma que hay en lechuga.



Figura 24. Oligonucleótidos usados para la amplificación de las regiones 16S-*trnI*-*trnA*-23S del genoma de cloroplasto de lechuga.

Lo anterior constituye una importante mejora en el diseño del vector debido a que las manipulaciones para la subclonación de genes en el sitio único de clonación son menores, y se introduce una región propia del genoma de lechuga.

6.4 Análisis de la orientación de las clonas transformantes para el vector pADCT

Debido a que los sitios de restricción para la subclonación en el vector pADCT, son sitios romos, puede existir la posibilidad de que la integración del cassette de expresión se de en dos sentidos, y según lo reportado por Dhingra (2005) la orientación en la cual se clone el promotor es de vital importancia para la expresión del transgén en cloroplasto. Esto es debido a que el promotor *Prn* es un promotor endógeno de cloroplasto, por lo que al transformar el plástido y si ambos promotores llegaran a quedar en la misma orientación, podría ocasionar una delección y por ende pérdida del cassette de expresión por un evento de recombinación entre ambos promotores. Por tal motivo para evitar dicha pérdida, es importante verificar la orientación del cassette de expresión en el vector pADCT. En la Figura 25 se muestra la orientación correcta que debe tener el cassette de expresión.

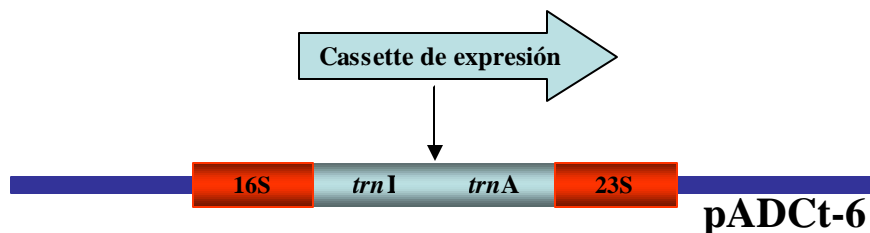


Figura 25. Orientación correcta del cassette de expresión para el vector pADCT-6.

El análisis de orientación de las clonas transformantes puede realizarse por medio de una PCR usando un oligonucleótido que hibride en el cassette de expresión y otro en el vector. De esta forma al realizar la correcta combinación de oligonucleótidos se puede comprobar la orientación del cassette de expresión en el vector. En la Figura 26 se muestran los oligonucleótidos que se pueden usar para conocer la orientación del inserto, unos situados en el cassette de expresión y otros en el vector pADCT.

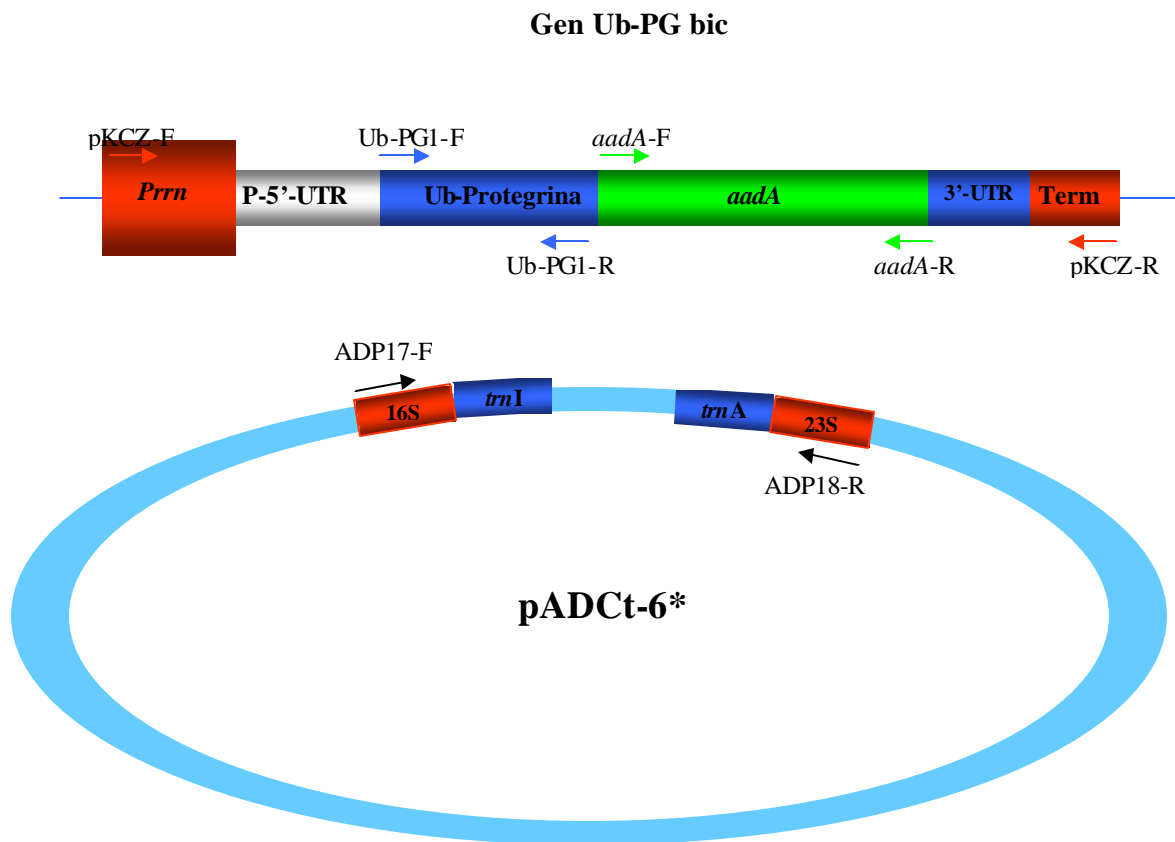
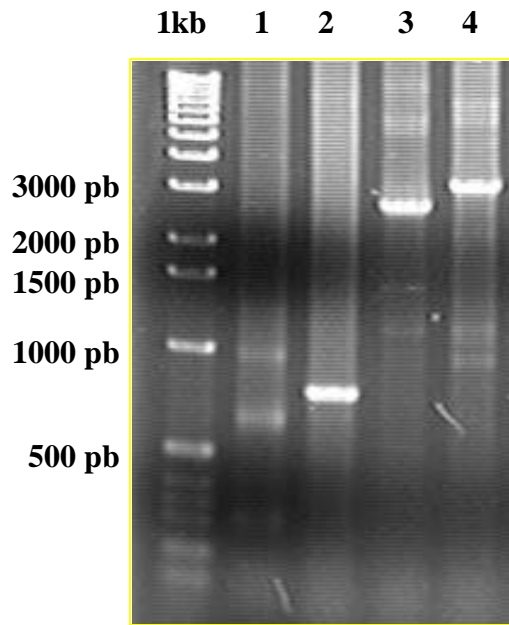


Figura 26. Diagrama de ubicación de oligonucleótidos para realizar el análisis de orientación de la inserción del cassette de expresión.

Los oligonucleótidos que se seleccionaron para el análisis de orientación fueron los que se hibridan con el gen de selección (*aadA-F* y *aadA-R*), así como los genes que amplifican las regiones de recombinación *ADP17-F* y *ADP18-R*. En la Figura 27 se muestra el análisis de orientación para la construcción de la protegrina 1bic.



Carril 1: Control UbPG1 (292 pb)

Carril 2. Control *aadA* (796 pb)

Tamaños esperados en el análisis de orientación			
	Oligonucleótidos usados	Correcto	Incorrecto
Carril 3	ADP17-F+PG1 -R	2858 pb	NA
Carril 4	<i>aadA</i> -F+ADP18-R	3284 pb	NA

Figura 27. Análisis de orientación de la construcción con la protegrina 1 mediante PCR. NA = no amplificación.

En la Fig. 27 se muestran clonas que tienen la orientación correcta analizadas por PCR usando los oligonucleótidos ADP17-F y el PG1-R dando una banda de 2858 pb (Fig.27, carril 3). Además se verificó con el par de oligonucleótidos *aadA*-F y ADP18-R, dando una banda de 3284 pb (Fig.27, carril 4). En la Figura 28 se muestra el análisis de orientación de las tres construcciones para protegrinas.

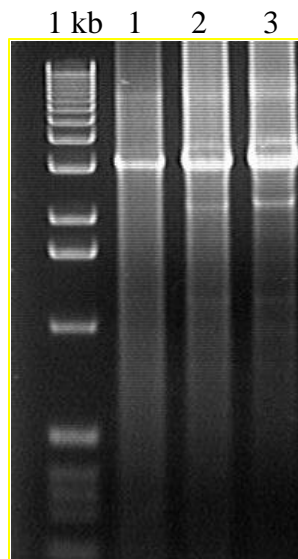


Figura 28. Análisis de orientación de las construcciones de protegrinas en pADCt. (1) pADCt-PG1 bic; (2) pADCt-PG3 cc bic; (3) pADCt-PGIB367 bic. Oligonucleótidos usados *aadA*-F + ADP18-R

Una vez analizadas y verificadas las construcciones se procedió a realizar el bombardeo de lechuga y tabaco. En total se realizaron 6 construcciones bicistrónicas de las cuales tres fueron en el vector pKCZ y tres en el vector pADCt. Cada uno de ellos se purificó adecuadamente para realizar los experimentos de biobalística, así como las pruebas del análisis de la funcionalidad de las construcciones en *E. coli*. En la Figura 29 se muestra el mapa general de los plásmidos pADCt-UbPG bic.

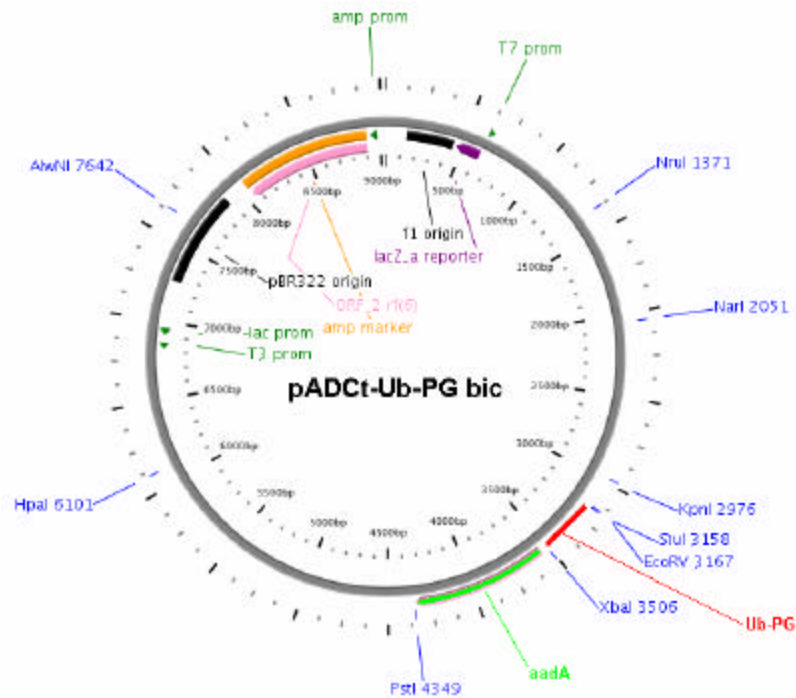


Figura 29. Mapa de restricción del vector pADCT-PG bic para la transformación de cloroplastos de lechuga.

6.5 Análisis del funcionamiento de las construcciones en *E. coli*

Las pruebas preliminares en *Escherichia coli* son muy útiles debido a que es posible comprobar la funcionalidad de algunas construcciones en un tiempo muy corto. Lo anterior es posible debido a que los eventos de transcripción y traducción son muy similares en algunos organismos procariotes y en cloroplastos (Elis, 1970). Según la teoría del origen de los cloroplastos, en una etapa de la evolución de las células vegetales, formaron una relación simbiótica con una célula procariote primitiva, la cual le permitía realizar ciertos procesos bioquímicos de asimilación de nutrientes y obtención de energía (Buchanan y col., 2000). Debido a lo anterior es posible probar la funcionalidad de las construcciones para la transformación de cloroplasto en *E. coli*.

Concernientemente se ha demostrado que el promotor *Prrn*, así como la región 5'UTR de la proteína 10 del fago T7, son funcionales en *E. coli* y por lo tanto se utiliza para demostrar la funcionalidad de las construcciones, como por ejemplo la detección de la proteína VP6 de rotavirus (Kuroda y Maliga, 2002; Chin y col., 2003; Fernández-San Millan y col., 2003). Aun y cuando existe un reporte en el que se sugiere que las pruebas

preliminares en *E. coli* no son confiables (Magee y col., 2004), el hecho de que las construcciones génicas funcionen en bacterias es muy prometedor y dan confianza para proceder con las pruebas de transformación. Por tal motivo, en el presente trabajo se realizaron pruebas para demostrar la funcionalidad de las construcciones bicistrónicas en *E. coli*.

6.5.1 Funcionalidad del gen de selección a espectinomicina (*aadA*) en *E. coli*

Como se mencionó anteriormente, las construcciones bicistrónicas están reguladas por el promotor constitutivo *Prrn*, seguido de la expresión del gen de la ubiquitina-protegrina, y finalmente el gen de selección a espectinomicina (*aadA*). De esta forma si demostramos que se expresa el gen de selección a espectinomicina, podemos inferir que el gen de interés también se está expresando. Por lo tanto se realizó un ensayo de transformación para resistencia al antibiótico. Se transformó *E. coli* con las diferentes construcciones y se creció en un medio con espectinomicina (50 mg/L). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 30.

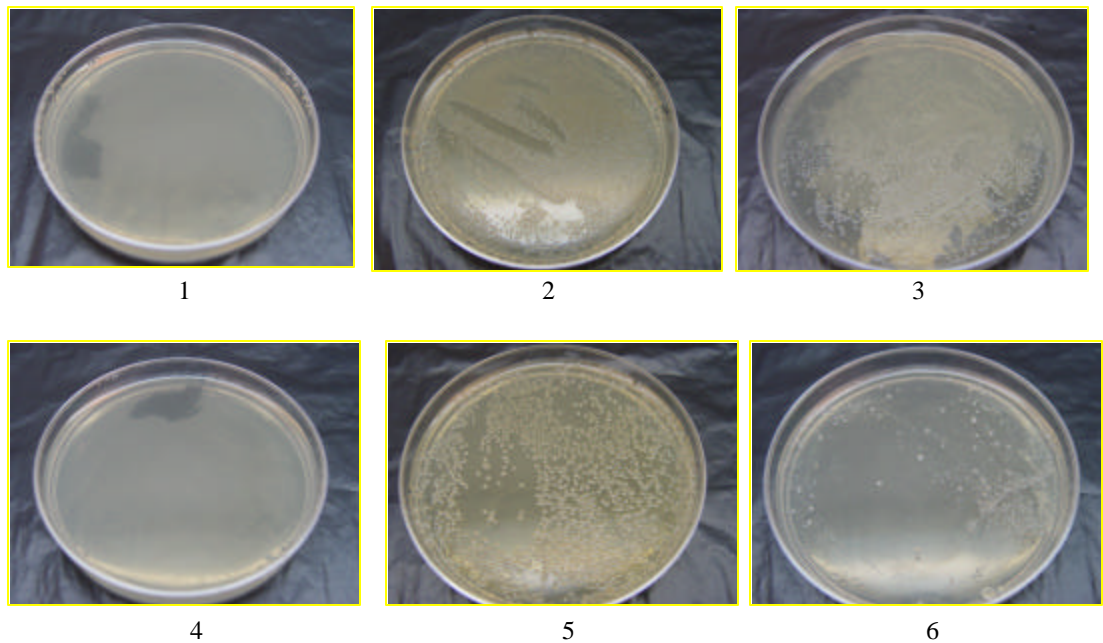


Figura 30. Análisis de la expresión del gen *aadA* en *E. coli*. (1) Control negativo (-): *E. coli* TOP 10; (2) Control positivo (+): *E. coli* (pKCZ orig); (3) *E. coli* con pKCZ-P5'UTR; (4) *E. coli* con pKCZ-P'5UTR-UbPG1; (5) *E. coli* con pKCZ-PG1 bic; (6) *E. coli* con pADct-PG1 bic.

Los resultados indican que las construcciones bicistrónicas son funcionales para el gen de selección (*aadA*) (Fig. 30, placas 5 y 6). La diferencia en el crecimiento puede ser debida al tamaño del plásmido, ya que el vector pKCZ bicistrónico mide aproximadamente 6440 pb (placa 5), en cambio el vector pADCt bicistrónico (placa 6) mide aproximadamente 9500 pb, por lo que es más fácil la transformación de plásmidos pequeños. Las cepas de *E. coli* transformadas con las construcciones monocistrónicas de las protegrinas, no fueron capaces de crecer en medio selectivo (Fig. 30, placa 4). El control (+) y la construcción monocistrónica del gen *aadA*, si fueron capaces de crecer en medio de selección con espectinomicina (Fig. 30, placas 2 y 3).

Los resultados del experimento anterior indican que los cassettes de expresión para protegrinas funcionan en un ambiente procariótica y por lo tanto podemos inferir que deberán expresarse adecuadamente en el cloroplasto. En este trabajo las protegrinas se expresan fusionadas a la ubiquitina y esto hace que no afecte a *E. coli*, sin embargo al producirse en la planta se esperaría que se procesen y se libere la protegrina madura con actividad antimicrobiana.

6.5.2 Análisis electroforético de las proteínas producidas por los vectores bicistrónicos en *E. coli*

Una vez probada la funcionalidad del promotor y gen de selección en *E. coli* se decidió determinar si era posible observar los productos proteicos codificados por las construcciones bicistrónicas en esta bacteria. Para esto realizamos un análisis electroforético de las proteínas totales de las bacterias recombinantes capaces de crecer en medio de selección, por lo cual se esperaba observar la proteína que confiere la resistencia a espectinomicina (aminoglicósido 3'-adeniltransferasa), así como la proteína de la protegrina fusionada con la ubiquitina las cuales no están presentes en *E. coli* TOP 10 F'. Las cepas de *E. coli* transformadas con los vectores: pKCZ original, pKCZ-PG1 bic y pADCt-PG1 bic, se crecieron en medio líquido con espectinomicina (50 mg/mL). Además como control se creció *E. coli* sin antibiótico. A todos los cultivos se les realizó una extracción de proteínas totales y se analizaron en un gel de poliacrilamida al 16%. Los resultados se observan en la Figura 31.

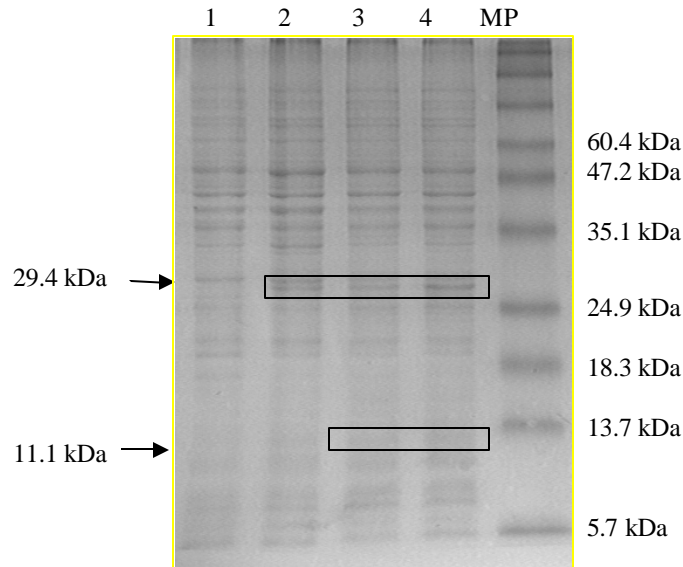


Figura 31. Fracción soluble de proteínas totales de *E. coli*. (1) Control negativo *E. coli* TOP 10; (2) *E. coli* transformada con pKCZ; (3) *E. coli* transformada con pKCZ-Ub-PG1 bic; (4) *E. coli* transformada con pADCt-Ub-PG1 bic.

A pesar de no contar con anticuerpos ya que no existen en el mercado, podemos inferir que se están produciendo ambas proteínas recombinantes basados en el tamaño esperado de 29.4 kDa para el agente de selección y 11.1 kDa para la Ubiquitina-Protegrina, según lo observado en la Figura 31. La banda de 29.4 kDa es más fácilmente distinguible respecto a la *E. coli* no transformada donde a esa altura se observa solo una banda, mientras que en los carriles 2, 3 y 4 se observan dos. La banda de 11.1 kDa de la protegrina se observa difusa.

Los resultados sugieren la presencia de proteínas que no se detectan en la bacteria sin transformar y que son del tamaño esperado para nuestras proteínas recombinantes sin embargo solo una prueba de antagonismo nos podrá dar mayor certeza de esto. Los resultados de las secciones 6.5.1 y 6.5.2 nos dieron confianza para realizar las transformaciones por biobalística con los vectores generados.

6.6 Transformación de cloroplastos de lechugas y tabaco por el método de bombardeo de partículas (biobalística)

La transformación por el método de bombardeo de partículas es uno de los más utilizados para la transformación de cloroplastos (Kanamoto y col., 2006). En el presente trabajo se bombardearon hojas de tabaco ya que se tenían reportes de transformación de cloroplastos de tabaco usando este tipo de explante (Tregoning, y col., 2003), así como hojas y callos de lechuga ya que al iniciar este experimento no sabíamos cual tipo de explante sería mejor. En ambos casos se dispararon los genes bicistrónicos diseñados para ambas especies (pKCZ y pADCt), con el objetivo de comparar la eficiencia de transformación con vectores específicos de especie. Cabe destacar que los resultados de la transformación de las hojas de tabaco no se muestran, debido a que continúan en medio selectivo, y solo se muestran los resultados de los disparos realizados a las hojas y callos de lechuga. Las condiciones del disparo así como las características técnicas del mismo se describen en la sección de materiales y métodos.

6.6.1 Selección de brotes transplastómicos

Una de las características de vital importancia para que se lleve a cabo una correcta transformación de cloroplastos en cualquier sistema vegetal, es que se tenga un eficiente sistema de regeneración, así como controlar de forma adecuada los parámetros cruciales de temperatura y nutrientes, para que se lleve a cabo la selección de los brotes capaces de crecer en medio selectivo.

Los callos de lechuga, después del bombardeo fueron colocados en medio MSJ con espectinomicina a 100 mg/L, ya que a esta concentración de antibiótico es posible seleccionar brotes transformantes de lechuga (Martínez-González, 2005). Además, el medio posee reguladores de crecimiento con la característica de promover la división celular de tal forma que se obtiene una gran cantidad de callo en poco tiempo. Los callos tardaron aproximadamente 45-50 días en comenzar a tornarse de un color amarillo claro, para posteriormente dar brotes verdes en un promedio de 2.5-3 meses. En este periodo de tiempo los callos fueron subcultivados cada 7 días y pasados a nuevos medios de cultivo cada 15

días, por lo tanto se obtienen callos transformantes aproximadamente en un periodo de 3-4 subcultivos. En cuanto a la eficiencia de transformación, para los callos se obtuvieron entre 5 a 10 brotes por disparo, lo cual corresponde aproximadamente al 30% de los callos disparados, y de los cuales solo uno fue transplastómico, por lo tanto se obtuvo una eficiencia del 4%. En la Figura 32 se muestran los brotes obtenidos de callos, las flechas muestran los brotes verdes.

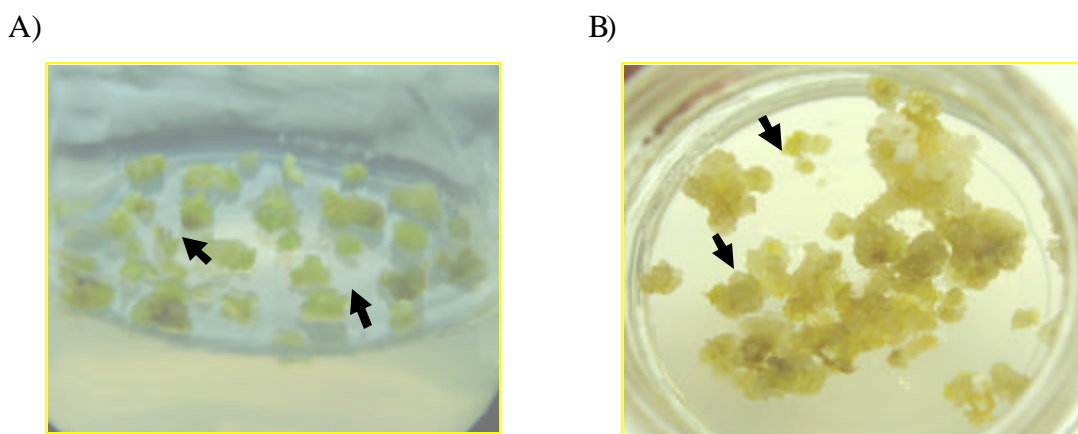


Figura 32. Brotes obtenidos de callos de lechuga. (A) Disparo con pKCZ-Ub-PG3 bic; (B) Disparo con pADCt-Ub-PG1 bic.

Las hojas de lechuga, después del bombardeo se colocaron en medio de selección MSJ (50 mg/L de espectinomicina), donde se incubaron durante 3 días para posteriormente cortarlas en fragmentos de 1 mm x 1 mm, e incubados nuevamente en el medio MSJ con antibiótico. Los fragmentos de hoja a los 7 días después de colocados en el medio de selección se tornaron a una coloración amarilla, además presentaron un engrosamiento que comenzaba a dar el aspecto de callo, y los primeros callos verdes fueron observados aproximadamente a 2-2.5 meses. La eficiencia de regeneración para las hojas fue menor que para los callos, ya que se obtuvieron solamente de 1-3 brotes verdes por disparo, lo cual corresponde aproximadamente solo al 1% de eficiencia de regeneración. Los brotes transformantes fueron completamente evidentes debido a que la hoja se tornaba de un color oscuro y los brotes se tornaban de un color verde-amarillo, como se observa en la Figura 33.

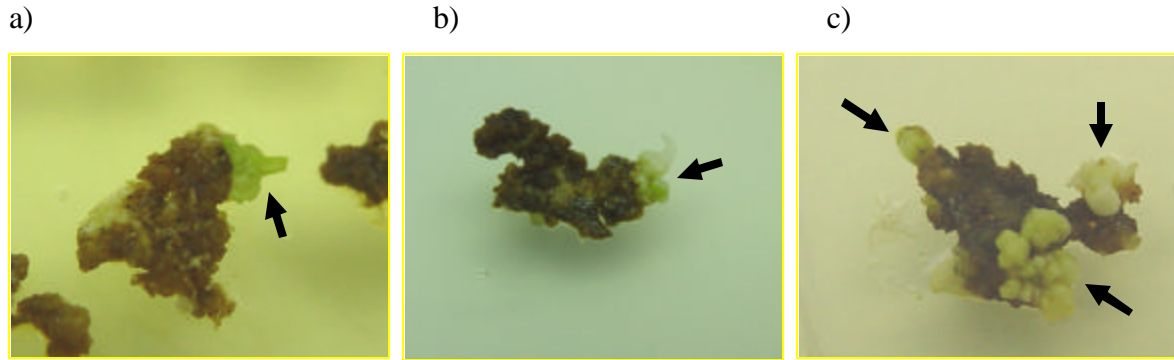


Figura 33. Brotes posiblemente transplstómicos provenientes de hojas de lechuga de 2.5 meses después del bombardeo, con: a) pKCZ-PG1 bic, b) pKCZ-PG3cc bic, c) pADCt-PG3cc bic.

Después de ser observados, los brotes transformantes se cortaron y se colocaron en medio de selección para micropropagarlos y obtener suficiente material para los ensayos siguientes, en la Tabla 6 se muestra el resumen de los resultados de los disparos.

Tabla 6. Resumen de resultados de los disparos con las construcciones generadas

Material Bombardeado	Construcción disparada	No. De callos que dieron brotes	% de Regeneración	% de Transformación
Callo de Lechuga	pKCZ-PG1 bic	7	30	4%
	pKCZ-PG3cc bic	5	20	4%
	pKCZ-IB367 bic	5	20	MS
	pADCt-PG1 bic	10	40	MS
	pADCt-PG3cc bic	8	32	4%
	pADCt-IB367 bic	6	24	MS
Hoja de Lechuga	pKCZ-PG1 bic	3	15	MS
	pKCZ-PG3cc bic	2	10	MS
	pKCZ-IB367 bic	1	5	MS
	pADCt-PG1 bic	1	5	MS
	pADCt-PG3cc bic	3	15	MS
	pADCt-IB367 bic	3	15	MS

Se utilizaron entre 25 y 30 callos, y entre 15-20 hojas.

MS: Los callos se encuentran en medio de selección.

En estos resultados preliminares, se observa una tendencia de mayor porcentaje de regeneración usando vectores específicos de especie tanto para callo como hoja, a excepción de hoja de lechuga disparada con pKCZ-PG1 bic. Se observa que el explante menos dañado es el callo con una tendencia general de regeneración más alta que la hoja.

Con estos resultados no es posible concluir cual de los vectores (pKCZ ó pADct) es mas eficiente para la transformación de cloroplasto, ya que es necesario analizar el total de muestras por PCR, para verificar el porcentaje de transformación tanto de hojas como de callos de lechuga. El cortar parte de los callos retrasa el desarrollo y formación de los brotes, incluso en algunos casos el callo se muere.

6.7 Análisis por PCR de los brotes transformantes

Una vez micropropagados los brotes transformantes se realizó la extracción de ADN para realizar los ensayos de la integración del transgén en el genoma del cloroplasto de la lechuga, por lo que fue necesario realizar combinaciones de oligonucleótidos que identificaran el gen bicistrónico así como verificar la integración al genoma de cloroplasto.

6.7.1 Análisis de la integración del transgén al genoma de cloroplasto

La transformación de cloroplastos es sitio específico, de manera que se conoce el sitio exacto de la integración de los genes bicistrónicos. De esta manera se puede analizar la integración del transgén al genoma del plástido por PCR, utilizando un oligonucleótido que hibride en el transgén y otro con el genoma del cloroplasto, de esta forma si hay amplificación, se asume que el transgén bicistrónico está integrado en el genoma del cloroplasto (Kota y col., 1999).

A los brotes verdes seleccionados se les extrajo el ADN y se realizó una PCR para verificar la integración del transgén. Primeramente se determinó la presencia de los transgenes para lo cual se usaron oligonucleótidos que amplifican el gen de la protegrina (292 pb) y oligonucleótidos que identifican el gen de selección *aadA* (796 pb). Una vez identificados los brotes transgénicos, se les realizó una PCR para conocer si se llevó acabo la integración específica en el genoma de cloroplasto. En la Figura 34 se muestran los resultados del PCR de los brotes transplastómicos.

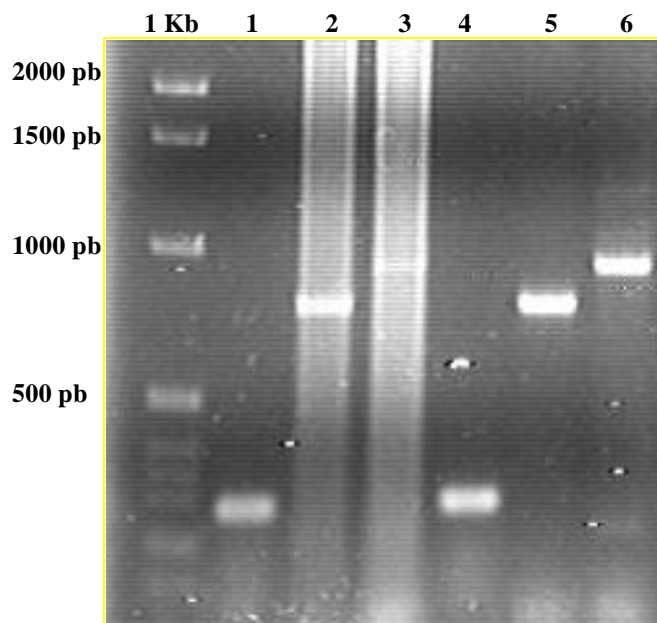


Figura 34. Identificación de brotes transplastómicos por PCR. 1) Brote de lechuga (PG1 bic) usando los oligonucleótidos PG1-F+PG1-R; 2) Brote de lechuga (PG1 bic) usando los oligonucleótidos *aadA*-F+*aadA*-R; 3) Brote de lechuga (PG1 bic) usando los oligonucleótidos *aadA*-F+GCL-R; 4) Brote de lechuga (PG3cc bic) usando los oligonucleótidos PG3-F+PG3-R; 5) Brote de lechuga (PG3cc bic) usando los oligonucleótidos *aadA*-F+*aadA*-R; 6) Brote de lechuga (PG3cc bic) usando los oligonucleótidos *aadA*-F+GCL-R.

A la fecha se han obtenido brotes transplastómicos de lechuga creciendo en agente de selección que contienen las protegrinas PG1 y PG3cc, en un cassette bicistrónico integrado en el genoma del cloroplasto, al ser disparados con los vectores pKCZ-PG1 bic, pKCZ-PG3cc bic y pADCt-PG3cc bic.

A pesar de que la homoplasia se logra con varias rondas de selección, según los resultados descritos por Kanamoto y col. (2006), la transformación estable de la lechuga se establece al analizar la T₁, por lo que es necesario realizar los ensayos en plantas adultas de la T₀, así como en la T₁, para concluir que la transformación realizada en este trabajo fue estable lo cual está en proceso.

El tiempo para generar plantas transplastómicas de lechuga, usando vectores con sitio de recombinación específicos de tabaco fue similar al usar un vector con sitios específicos de lechuga, sin embargo deberán hacerse ensayos de antagonismo contra bacterias para ver, cual de las plantas transplastómicas es mas eficiente respecto al control

de microorganismos y poder llegar a conclusiones respecto al uso del vector utilizado para transformar cloroplasto.

6.8 Ensayos de la actividad antimicrobiana

Dentro de las pruebas cruciales en la producción heteróloga de proteínas recombinantes se encuentra el análisis de la actividad de la proteína que se expresó, lo que constituye la prueba fehaciente de la funcionalidad del sistema para producir la proteína que se desea estudiar (Aumelas y col., 1996). Con base en lo anterior se decidió realizar las pruebas de funcionalidad de las protegrinas producidas en los cloroplastos de lechuga. Las protegrinas son péptidos pequeños, solubles, y que conservan su actividad en un amplio rango de pH, debido a lo anterior es posible obtener el extracto crudo de las proteínas totales solubles de los brotes transplastómicos y realizar ensayos *in vitro* de la actividad antimicrobiana, lo cual se realizó al retar dos cepas de microorganismos patógenos de humano con las proteínas totales solubles (PTS) de los callos transplastómicos.

Las PTS extraídas de los brotes transplastómicos se cuantificaron por el método de Bradford, y se ajustó la concentración de proteínas tomando como base a la concentración mas baja de proteínas extraídas, para posteriormente ajustar la concentración total de proteína a 200 µg para cada una de las líneas transplastómicas, así como para el control negativo y se realizaron experimentos independientes por triplicado. Se supone que en esta concentración de proteínas totales solubles, deberemos tener entre 1-100 µg de protegrina (rangos usados para pruebas de antagonismos), asumiendo que como se ha reportado anteriormente, la transformación de cloroplastos da rendimientos por arriba del 10% de PTS. En el caso particular de *E. coli* y *K. pneumoniae* el rango es de 0.25-5 µg/mL. Para realizar el reto de las protegrinas, se utilizó el método de difusión radial en disco descrito en el apartado de metodología. Se utilizaron como control negativo callos de lechuga que no habían sido transformados, el control positivo fue el antibiótico de Carbenicilina a una concentración de 10 mM ya que no contamos con protegrina pura como control. Para esta prueba se consideró la capacidad de difusión de las Protegrinas y se siguieron las sugerencias de Albrecht y col. (2002) en las que se describe que las protegrinas difunden mejor en medios que contienen agarosa de bajo grado de electroendosmosis y no así en

medio con agar. Las cepas a las cuales se les realizó el reto fueron: *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*. Los resultados del ensayo antimicrobiano se muestran en la Figura 35. En esta imagen se pueden observar los halos de inhibición del control positivo de la Carbenicilina y de los extractos proteicos de las protegrinas, así como la ausencia de halo en el extracto de proteínas de lechuga no transformada.

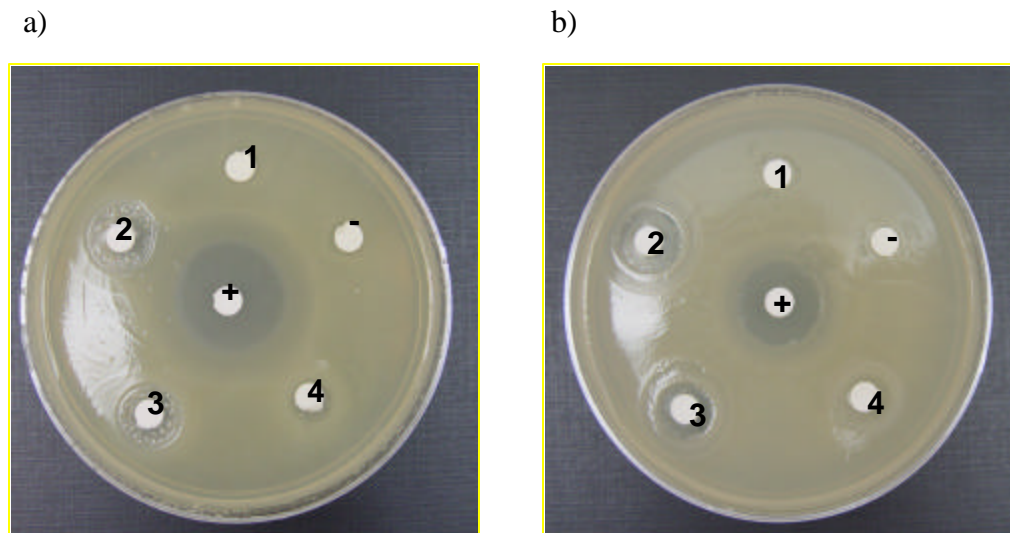


Figura 35. Resultados del ensayo antimicrobiano de los extractos proteicos de los callos transplastómicos de lechuga: a) prueba con *Escherichia coli*, b) prueba con *Klebsiella pneumoniae*. 1) Callo silvestre (WT); 2) Callo transplastómico 1 (pKCZ-PG1 bic); 3) Callo transplastómico 2 (pKCZ-PG3cc bic); 4) Callo transplastómico 3 (pADCt-PG3cc bic); (+) Carbenicilina (10mM); (-) Buffer de extracción de proteínas.

En la Figura 35 se observa que en el control negativo no hay ningún tipo de halo que pueda indicar la inhibición del crecimiento bacteriano en ambos ensayos, por otro lado en el extracto del callo silvestre (WT), se observa un pequeño halo de inhibición en el caso de la prueba contra *K. pneumoniae*, sin embargo, en los extractos de los callos disparados con los genes pKCZ-PG1 bic y pKCZ-PG3cc bic, se observa un halo de inhibición bacteriana mayor en ambas pruebas, y solo un pequeño halo en el extracto del callo disparado con pADCt-PG3cc bic. En la prueba practicada con *E. coli*, los halos de inhibición son mayores a los halos de la prueba contra *K. pneumoniae*.

Nosotros esperábamos encontrar halos de inhibición mayores, partiendo de que en el trabajo de Herrera-Diaz, (2005), donde se transformó nuclearmente la lechuga con la

PG1, se observaron halos de inhibición similares, sin embargo no sabemos que tipo de procesamiento están teniendo las protegrinas en el cloroplasto, por lo que un aspecto a considerar es que posiblemente la ubiquitina no está favoreciendo eficientemente la formación de puentes disulfuro así como el plegamiento adecuado de la protegrina, por otro lado debemos recordar que la ubiquitina está fusionada traduccionalmente con la protegrina, por lo que otra explicación podría ser que no se está llevando a cabo el corte de la proteína en el sitio correcto (ubiquitina-protegrina), lo que podría disminuir la actividad de las protegrinas. De igual forma es necesario hacer notar que los ensayos antimicrobianos se realizaron en un estado muy temprano del desarrollo de la planta (callo indiferenciado), por lo que es necesario realizar los ensayos en plantas adultas de lechuga y determinar el nivel de expresión. Cabe destacar que la estimación de la producción de protegrinas producidas en cloroplasto, se realizó en base a la actividad antimicrobiana, y probablemente solo una pequeña cantidad de protegrina es funcional, por lo que probablemente la mayor cantidad de proteína traducida no tuvo las modificaciones para ser una protegrina biológicamente activa. Lo anterior podría corroborarse al realizar ensayos Inmuno-Enzimáticos usando la técnica de ELISA o un Western-blot que nos permite cuantificar la proteína que se traduce, mas no la que es biológicamente activa.

No obstante, el hecho de que se haya demostrado la posibilidad de expresar proteínas de mamífero en cloroplastos de lechuga, con cierta actividad, abre un nuevo panorama en la producción de proteínas heterólogas en plantas, debiendo abordar estudios sobre el procesamiento de la ubiquitina para la formación de puentes disulfuro y su papel como chaperona para la producción de una proteína funcionalmente activa, así como el sitio de corte de ubiquitina-protegrina.

Este es el primer trabajo donde se ha logrado obtener callos transplastómicos de lechuga que son capaces de expresar el gen de la protegrina 1 y de la protegrina 3 cíclica, ambos en construcciones bicistrónicas, sin embargo es necesario obtener plantas adultas para concluir que la transformación es estable, así como realizar antibiogramas con extractos de planta adulta.

Capítulo 7
CONCLUSIONES

VII.- CONCLUSIONES

1. Las 6 construcciones bicistrónicas para tres protegrinas (PG1, PG3cc y IB367) obtenidas en los vectores pKCZ y pADCt son funcionales en *E. coli*.
2. El vector pKCZ con las tres protegrinas, es funcional en la transformación por bombardeo tanto en tabaco como en lechuga.
3. El vector pADCt con las tres protegrinas, es funcional en la transformación por bombardeo tanto en lechuga como en tabaco.
4. El uso de vectores específicos de especie para la transformación de cloroplastos, favorece, un mayor porcentaje de regeneración en lechuga.
5. No se puede concluir en este momento cual vector es más eficiente para la transformación de cloroplastos de lechuga, ya que falta analizar todos los brotes, pero hasta ahora se han obtenido callos transplastómicos con ambos vectores.
6. Con las construcciones bicistrónicas de protegrina 1 y 3cc se lograron obtener plantas modificadas genéticamente que integraron el transgén en el genoma de cloroplasto.
7. Los extractos proteicos extraídos de callos transplastómicos de lechuga, que expresan las protegrinas PG1 y PG3cc de lechuga, son capaces de inhibir el crecimiento de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* al realizar los ensayos antimicrobianos de difusión radial en placa, demostrando la actividad de estas protegrinas expresadas en planta.
8. El sistema de lechuga es un sistema ideal para transformación de cloroplastos, ya que en periodo corto de 2.5 meses se obtienen brotes de posibles plantas transplastómicas.

Capítulo 8
PERSPECTIVAS

VIII.- PERSPECTIVAS

- Obtener y analizar plantas T₀ y T₁ transplastómicas de lechuga y comparar en pruebas de antagonismos cual de las 3 protegrinas expresadas presenta mayor actividad antimicrobiana.
- Comparar el grado de hemólisis al suministrar el extracto de las tres protegrinas en ratones para probar su eficiencia en mamíferos como control de enfermedades infecciosas.
- Retar bacterias patógenas de plantas con las lechugas transplastómicas.
- Retar bacterias resistentes a antibióticos convencionales con extractos proteicos de lechugas transplastómicas.
- Analizar el procesamiento de la fusión traduccional de Ubiquitina-Protegrina y correlacionarlo con la actividad antimicrobiana.

Capítulo 9
BIBLIOGRAFÍA

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Albrecht, M. T., Wang, W., Shamova, O., Lehrer, R., Schiller, L., (2002). Binding of protegrin-1 to *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Respir. Res.* **3**:1-18.
- Allefs, S. J. H. M., Florack, D.E.A., Hoogendoorn, C., y Stiekema, W.J. (1995). Erwinia soft rot resistance of potato cultivars transformed with a gene construct coding for antimicrobial peptide cecropin B is not altered. *Am. Potato. J.* **72**:437-445.
- Aumelas, A., Mangoni, C., Roumestand, L., Chiche, E., Despaux, G., Grassy, B., Calas, and Chavanieu, A. (1996). Synthesis and solution structure of the antimicrobial peptide protegrin-1. *Eur. J. Biochem.* **237**:575-583.
- Barrett, J. (1975). Preparation of a bacterial vaccine. En Goodman RN (Ed.) *Proc. First. Workshop on Phytobacteriology*. University of Missouri. 1-7.
- Bellm, L., Lehrer, R.I., Ganz, T. (2000). Protegrins: new antibiotics of mammalian origin. *Ingenta.* **9**:1731-1742.
- Birch, R.G. (1997). Plant transformation: problems and strategies for practical application. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* **48**:297-326.
- Boman, H.G. (1995). Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **13**:61-92.
- Bradford, M.M. (1968). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anu. Biochem.* **72**: 248-254.
- Bruno, R.S., Eduardo, S., Rogelio, H. P., y Victor, T. (2006). Péptido antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas. *Salud Pública de Mex.* **48**:62-71.
- Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R. L. (2000). Biochemistry and Molecular Biology of Plant. *Ed. American Society of Plant Physiologists*. Rocville, Maryland. 37-45.
- Carmona, M.J., Molina, A., Fernandez, J.A., Lopez-Fando, J.J., y Garcia-Olmedo, F. (1993). Expression of the α -thionin gene from barley in tobacco confers enhanced resistance to bacterial pathogens. *Plant. J.* **3**:457-462.
- Cary, J.W., Rajasekarana, K., Jaynes, J.M., y Cleveland, T.E. (2000). Transgenic expression of a gene encoding a synthetic antimicrobial peptide results in inhibition of fungal growth in vitro and in planta. *Plant Sci.* **154**:171-181.
- Claridades agropecuarias, (1999). Lechuga y Trigo. Revista mensual producida y editada por Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria. Mayo 1999.

- Chen, J., Falla, T. J., Liu, H., Hurst, M. A., Fujii, C. A., Mosca, D. A., Embree, J. R., Loury, D. J., Radcliff, P. A., Chang, C., Gu, L., y Fiddes, J. C. (2000). Development of protegrins for the treatment and prevention of oral mucositis: structure-activity relationships of synthetic protegrin analogues. *Peptide Science*. **55**: 88-98.
- Chin, H.G., Kim, G.D., Marin, I., Mersha, F., Evans, T.C., Chen, L., Xu, M.Q. y Pradhan, S. (2003). Protein trans-splicing in transgenic plant chloroplast: Reconstruction of herbicide resistance from split genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**:8, 4510–4515.
- Cho, Y., Turner, J. S., Dinh, N., y Lehrer, R. I. (1998). Activity of protegrins against yeast-phase *Candida albicans*. *Infection and Immunity*. **66**:2486-2493.
- Cui, L., Veeraraghavan, N., Richter, A., Wall, K., Jansen, R.K., Leebens-Mack, J., Makalowska, I., y DePamphilis C.W. (2006). ChloroplastDB: the chloroplast genome database. *Nucleic Acids Research*. **34**: 692-696.
- Daniell, H., Kota, M., Varma, S., Garczynski, S. F., Gould F. y Moar, W. J. (1999). Overexpression of the *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry2Aa2 protein in chloroplasts confers resistance to plants against susceptible and Bt-resistant insects. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**:1840-1845.
- Daniell, H., Khan, M. S., y Allison, L. (2002). Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. *Trends in Plant Science*. **2**:84-91.
- Daniell, H., Chebolu, S., Kumar, S., Singleton, M., y Falconer, R. (2004). Chloroplast-derived vaccine antigens and other therapeutic proteins. *Vaccine*. **4913**:1-5.
- Daniell, H., Ruiz, O., y Dhingra, A. (2005). Chloroplast genetic engineering to improve agronomic traits. *Methods in Molecular Biology*. **286**:111-137.
- De Cosa, B., Moar, W., Lee, S. B., Miller, M., Daniell, H. (2001). Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. *Nat. Biotechnol.* **19**: 71–74.
- De Gray, G., Rajasekaran, K., Smith, F., Sanford, J., y Daniell, H. (2001). Expression of an antimicrobial peptide via the chloroplast genome to control phytopathogenic bacteria and fungi. *Plant Physiology*. **127**:852-862.
- Dellaporta, S.L., Wood, J., Hicks, J.B. (1983). A plant DNA miniprep: Version II. *Plant. Mol. Biol. Rep.* **1**:19-21.
- Díaz, M. L., Zappacosta, D. C., Franzone, P. M., y Ríos, R. D. (2003). Biotecnología y mejoramiento vegetal. *Argen. Bio.* **3**:109-123.

- Dhingra, A. (2005). Transgenic Technologies Workshop. Curso teórico práctico impartido en el Instituto Potosino de la Investigación Científica y Tecnológica. San Luis Potosí, México.
- Dodds, J. H., Roberts, L. W. (1982). Experiments in plant tissue culture. Cambridge Univ. Press. London New York. 2nd edn.
- Dufourmantel, N., Pelissier, B., Garcon, F., Peltier, G., Ferullo, J.M., y Tissot, G. (2004). Generation of fertile transplastomic soybean. *Plant. Mol. Biol.* **55**:479-489.
- Elis, R. J., (1970). Further similarities between chloroplast and bacterial ribosomes. *Biochem. J.* **116**:1-28.
- Epple, P., Apel, K., y Bohlmann, H. (1997). Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of Arabidopsis against *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell.* **9**:509-520.
- Fernández-San Millan, A., Mingo-Castel, A., Millar, M., y Daniell, H. (2003). A chloroplast transgenic approach to hyper-express and purify serum albumin, a protein highly susceptible to proteolytic degradation. *Plant Biotechnology Journal.* **1**:71-79.
- Fleming, A. (1950). Antibiotic therapy, and introductory article. *Med. Illus.* **10**:470-478.
- Florack, D., Allefs, S., Bollen, R., Bosch, D., Visser, B., y Stiekema, W. (1995). Expression of giant silkworm cecropin B genes in tobacco. *Transgenic Res.* **4**:132-141.
- Fortney, K., Totten, P.A., Lehrer, R.I., y Spinoal, S.M. (1998). *Haemophilus ducreyi* is susceptible to protegrin. *Antimic. Agents. Chemoth.* **42**:10, 2690–2693.
- Francois, I.E.J.A., De Bolle, M.F.C., Dwyer, G., Goderis, I.J.W.M., Woutors, P.F.J., Verhaert, P.D., Proost, P., Schaaper, W.M.M., Cammue, B.P.A., y Broekaert, W.F. (2002). Transgenic expression in *Arabidopsis* of a polyprotein construct leading to production of two different antimicrobial proteins. *Plant Physiol.* **128**:1346–1358.
- Ganz, T., Selsted, M. E., Szklarek, D., Harwing, S.S, Daher, K., y Baiton, D. F. (1985). Defensins: Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J. Clin. Invest.* **76**: 1427-1435.
- Gao, A.G., Hakimi, S.M., Mittanck, C.A., Wu, Y., Woerner, B.M., Stark, D.M., Shah, P.M., Liang, J., y Rommens, C.M.T. (2000). Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. *Nat. Biotechnol.* **18**:1307-1310.
- Gestal-Otero J.J. (1997). Enfermedades infecciosas emergentes, alerta mundial, respuesta mundial. *Revista Española de Salud Pública.* **71**: 225-229.
- Giddings, G., (2001). Transgenic plants as protein factories. *Curr. Opin. Plant Biotechnol.* **12**: 450–454

- Golds, T., Maliga, P., y Koop, H.U. (1993). Stable plastid transformation in PEG treated protoplasts of *Nicotiana tabacum*. *Biotechnology*. **11**:95–97.
- Griffiths, A.J.F., Millar, J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C., Gelbart, W.M. (1998) *Genética*, Quinta Edición, Editorial Mc Graw-Hill Interamericana, México, 550-556.
- Harris, E., Boynton, J.E., y Gillham, N.W. (1994). Chloroplast ribosomes and protein síntesis. *Microbiological Reviews*. **58**:700-754.
- Heifetz, P. B. (2000). Genetic engineering of the chloroplast. *Biochimie*. **82**: 655-666.
- Herz, S., Fubi, M., Steiger, S., y Koop, H-U. (2005). Development of novel types of plastid transformation vectors and evaluation of factors controlling expression. *Transgenic Research*. **14**:969-982.
- Hernández, L.A., García, R.F. (1999). Obtención y caracterización química de cultivos *in vitro* de *Larrea tridentata* con diferente tolerancia al déficit de agua. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de San Luís Potosí. San Luís Potosí, México.
- Herrera-Díaz, A., Alpuche Solís, A. G., (2005) Transformación nuclear y de cloroplastos de sistemas vegetales con genes sintéticos antimicrobianos. Instituto Potosino de La Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT). Tesis de Maestría En Ciencias En Biología Molecular. San Luís Potosí, México.
- Hibberd, J.M., Linley, P.J., Khan, M.S., y Gray, J.C. (1998). Transient expression of green fluorescent protein in various plastid types following microprojectile bombardment. *Plant J*. **16**:627–632.
- Iamtham, S., y Day, A. (2000). Removal of antibiotic resistance genes from transgenic tobacco plastids. *Nat. Biotechnol*. **18**: 1172–1176.
- Jaynes, J.M., Nagpala, P., Destéfano-Beltrán, L., Huang, J.H., Kim, J.H., Denny, T., y Cetiner, S. (1993). Expression of a Cecropin B lytic peptide analog in transgenic tobacco confers enhanced resistance to bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Plant Science*. **89**:43-53.
- Kaiser, V., y Diamond, G. (2000). Expression of mammalian defensin genes. *J. Leukoc. Biol*. **68**:779-784.
- Kamysz, W., Okrűj, M., y Lukasiak, J. (2003). Novel properties of antimicrobial peptides. *Acta Biochim. Pol*. **50**:461-469.
- Kanamoto, H., Yamashita, A., Asao, H., Okumura, S., Takase, H., Hattori, M., Yolota, A., y Tomizawa, K. I. (2006). Efficient and stable transformation of *Lactuca sativa* L. cv. Cisco (lettuce) plastids. *Transgenic Research*. **15**:2005-217.

- Kavanagh, T. A., Thanh, N. C., Lao, N. T., McGrath, N., Peter, S. O., Horváth, E. V., Dix, P. J., y Medgyesy, P. (1999). Homeologous plastid DNA transformation in tobacco is mediated by multiple recombination events. *Genetics Society of America*. **152**:1111-1122.
- Khan, M.S., y Maliga, P. (1999). Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plants. *Nat. Biotechnol.* **17**:910–915.
- Kim, J. W., y Minamikawa, T. (1996). Transformation and regeneration of French bean plants by the particle bombardment process. *Plant Science*. **117**:131-138.
- Klein, T. M., Harper, E. C., Svab, Z., Sanford, J. C., Fromm, M. E., y Maliga, P. (1988). Stable genetic transformation of intact *Nicotiana* cells by the particle bombardment process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **85**:8502-8505.
- Knoblauch, M., Hibberd, J. M., Gray, J. C., Vel, B., (1999). A galistan expansion femtosyringe for microinjection of eukaryotic organelles and prokaryotes. *Nat. Biotechnol.* **17**: 906–909.
- Kokryakov, V. N., Harwig, S. S., Panyutich, E. A., Shevchenko, A. A., Aleshina, G. M., Shamova, S. O., Korneva, H. A., y Lehrer R. I. (1993). Protegrins: leukocyte antimicrobial peptides that combine features of corticostatic defensins and tachyplesins. *FEBS Lett.* **327**:231-236
- Koop, H.U., Golds, T.J., y Eibl, C. (2004a). Green factory: recombinant protein production in chloroplast. *BIO forum Europe*. 32-34.
- Koop, H. U., Klaus, S. M. J., Huang, F. C., y Goles, T. J. (2004b). Generation of marker-free plastid transformants using a transiently cointegrated selection gene. *Nat. Biotechnol.* **22**:225-229.
- Kota, M., Daniell, H., Varma, S., Garczynski, S. F., Gould, F., y Moar, W. (1999). Overexpression of the *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry2Aa2 protein in chloroplast confers resistance to plants against susceptible and Bt-resistant insect. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**:1840-1845.
- Kumar, S., Dhingra, A., y Daniell, H. (2004a). Plastid-expressed betaine aldehyde dehydrogenase gene in carrot cultured cells, roots, and leaves confers enhanced salt tolerance. *Plant Physiology*. **136**:2843–2854.
- Kumar, S., Dhingra, A., y Daniell, H. (2004b). Stable transformation of the cotton plastid genome and maternal inheritance of transgenes. *Plant Mol Biol.* **56**:203–216.
- Kuroda, H., y Maliga, P. (2002). Overexpression of the *clpP* 5'-untranslated region in a chimeric context causes a mutant phenotype, suggesting competition for a *clpP*-specific RNA maturation factor in tobacco chloroplast. *Nucleic Acids Res.* **129**:1600-1606.

- Lapeña López de Armentía, S. (1999). Resistencias a antibióticos en nuestro medio. Visión global del problema. *Bol. Pediatr.* **39**: 243-247.
- Lehrer, R., Lichtenstein, A., y Ganz, T. (1993). Defensins: Antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu. Rev. Immunol.* **11**:105-128.
- Lelivelt, L.C., McCabe, S. M., Newell, C. A., Bastiaan de Snoo, C., Van Dun, M.P., Birch-Machin, I., Gray, J. C., Mills, H.G., y Nugent J.M. (2005). Stable plastid transformation in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Plant Molecular Biology.* **58**: 763-774.
- Li, X., Gasic, K., Cammue, B., Broekaert, W., y Korban, S.S. (2003). Transgenic rose lines harboring an antimicrobial protein gene, Ace-AMP1, demonstrate enhanced resistance to powdery mildew (*Sphaerotheca pannosa*). *Planta.* **218**: 226–232.
- Lopez-Brea, M., Rueda, A., Guillem, V., Arcediano, A., Yubero, A., Ribera, F., Tres, A., Cortes-Funes, H., Paz-Ares, L. (1999). Filgrastim in the treatment of high-risk febrile neutropenia: results of a multicenter randomized phase III trial *Proceedings of ASCO.* **583**.
- Magee, A.M., Horvath, E.M., y Kavanagh, T.A. (2004). Pre-screening plastid transgene expression cassettes in *Escherichia coli* may be unreliable as a predictor of expression levels in chloroplast-transformed plants. *Plant Sci.* **166**:1605–1611.
- Maliga, P. (1993). Towards plastid transformation in higher plants. *Trends Biotech.* **11**:101-7
- Maliga, P. (2002). Engineering the plastid genome of higher plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**: 164–172.
- Maliga, P. (2003). Progress towards commercialization of plastid transformation technology. *Trends in Biotechnology.* **21**:20-28.
- Maliga, P. (2004). Plastid transformation of higher plants. (2004). *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**:289–313.
- Mangoni, M. E., Aumelas, A., Charnet, P., Roumestand, C., Chiche, L., Despaux, E., Grassy, G., Calas, B., y Chavanieu, A. (1996). Change in membrane permeability induced by protegrin 1: implication of disulphide bridges for pore formation. *FEBS Lett.* **383**:93-98.
- Martel J.L., Tardy F, Brisabois A, Lailier R, Coudert M, y Chaslus-Dancla, E. (2000). The french antibiotic resistance monitoring programs. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **14**(4):275-83.
- Martínez-González, L., Alpuche-Solis, A.G., Rosales-Mendoza, S., (2005). Transformación genética de lechuga (*Lactuca sativa*) con un gen sintético de la subunidad B de la

- enterotoxina termolabil de *Escherichia coli*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de San Luís Potosí. San Luís Potosí, México.
- McBride, K.E., Svab, Z., Schaaf, D.J., Hogan, P.S., Stalker, D.M., y Maliga, P. (1995). Amplification of the chimeric Bacillus gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco. *Bio/Technology*. **13**:362-365.
- McGwire, B.S., Olson, C.L., Tack, B.F., y Engman, B.M. (2003). Killing of african trypanosomes by antimicrobial peptides. *J Infect Diseas*. **188**:146-52.
- Milner, S., Poindexter, B., Buja, M. Smith, E., y Bick, R. (2002). Localization of human beta-defensins is normal and burns skin by fluorescence deconvolution microscopy. *Burns*. **1**:1-4.
- Miyakawa, Y., Ratnakar, P., Rao, A.G., Costello, M.L., Mathieu-Costello, O., y Lehrer, R.I., (1996). In vitro activity of the antimicrobial peptides human and rabbit defensins and porcine leukocyte protegrin against *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect and Immun*. **64**: 926-932.
- Mosca, D.A., Hurst, M.A., So, W., Viajar, V.S.C., Fujii, C.A., y Falla, T.J. (2000). IB-367, a potegrin peptide with *in vitro* and *in vivo* activities against the microflora associated with oral mucositis. *Antimic Agent and Chemoth*. **44**:7, 1803-1808.
- Murashigie, T., y Skoog, F. (1962). A revised médium for rapad growth using plants wastes. *Biomass*. **21**:55.
- Nizet, V., y Gallo, R. I., (2003). Cathelicidins and innate defense against invasive bacterial infection. *Scand J. Infect Dis*. **35**:670-676.
- Ogata, K., Linzer, B.A., Zuberi, R.I., Ganz, T., y Catanzaro, S. (1992). Activity of defensins of human neutrophilic granulocytes against *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *Infect. Immune*. **60**:4720-4725.
- O'Neill, C., Horvath, G. V., Horvath, E., Dix P. J., y Medgyesy, P. (1993). Chloroplast transformation in plants: polyethylene glycol (PGE) treatment of protoplasts is an alternative to biolistic delivery systems. *The Plant Journal*. **3**:729-738.
- Osusky, M., Zhou, G., Osuska, L., Hancock, R.E., Kay, W.W., y Misra, S. (2000). Transgenic plants expressing cationic peptide chimeras exhibit broad-spectrum resistance to phytopathogens. *Nature Biotechnology*. **18**: 1162-1166.
- Palmer, J.D. (1985). Comparative organization of chloroplast genomes. *Annu. Rev. Genet*. **19**: 325-354.
- Ponti, D., Mangoni, M.L., Mignogna, G., Simmaco, M., y Barra, D. (2003). An amphibian antimicrobial peptide variant expressed in *Nicotiana tabacum* confers resistance to phytopathogens. *Biochem J*. **370**:121-127.

- Pontus, L., Langel, U. (2003). A brief introduction to cell-penetrating peptides. *J. Mol. Recognit.* **16**:227-233.
- Potrykus, S. I. (1990), Gene transfer to plants: assessment and perspectives. *Physiol. Plant.* **79**:125-134.
- Quesada-Vargas, T., Ruiz, O., y Daniell, H. (2005). Characterization of heterologous multigene operons in transgenic chloroplast. Transcription, processing, and translation. *Plant Physiol.* **1**:1-17.
- Rivas-Santiago, B., Sada, E., Hernandez-Pando, R., y Tsutsumi, V. (2006). Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas. *Salud Pública de México.* **48**: 62-71.
- Ruf, S., Hermann, M., Berger, I., Carrier, H., y Bock, R. (2001). Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. *Nat. Biotechnol* **19**: 870–875.
- Russell, J.A., Mihir, M.K., y Sanford, J.C. (1992). Physical trauma and tungsten toxicity reduce the efficiency of biolistic transformation. *Plant Physiol.* **98**:1050-1056.
- Sahl, H., Bierbaum, G. (1998). LANTIBIOTICS: Biosynthesis and Biological Activities of Uniquely Modified Peptides from Gram-Positive Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **52**:41-79.
- Sambri, V., Marangoni, A., Giacani, L., Gennaro, R., Murgia, R., Cevenini, R., y Cinco, M. (2002). Comparative *in vitro* activity of five cathelicidin-derived synthetic peptides against *Leptospira*, *Borrelia* and *Treponema pallidum*. *J. of Antimic. Chemoth.* **50**: 895–902.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Steinstraesser, L., Tippler, B., Mertens, J., Lamme, E., Homann, H.H., Lehnhardt, M., Wildner, O., Steinau, H.U., y Überla, K. (2005). Inhibition of early steps in the lentiviral replication cycle by cathelicidin host defense peptides. *Retrovirology.* **2**:1-12.
- Shafer, W.M., Qus, X.D., Waring, A.J., y Lehrer, R.I. (1998). Modulation of *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance nodulation/division efflux pump family. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **95**:1829–1833.
- Shi, J., y Ganz, T. (1998). The role of protegrins and other elastase-activated polypeptides in the bactericidal properties of porcine inflammatory fluids. *Infect and Immunit.* **66**: 3611–3617.

- Shinnar, A.E., Butler, K.L., y Park, H.J. (2003). Minireview. Cathelicidin family of antimicrobial peptides: proteolytic processing and protease resistance. *Bioorg. Chemist.* **31**:425-436.
- Sidorov, V.A., Kasten, D., Pang, S.Z., Hajdukiewicz P.T.J., Staub, J.M. y Nehra, N.S. (1999). Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker. *The Plant Journal.* **19**:209-216.
- Sikdar, S.R., Serino, G., Chaudhuri, S., y Maliga, P. (1998). Plastid transformation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep.* **18** 20–24.
- Skarjinskaia, M., Svab, Z., y Maliga, P. (2003). Plastid transformation in *Lesquerella fendleri*, an oilseed Brassicacea. *Transgenic Res.* **12**:115–22.
- Sporlein, B., Streubel, M., Dahlfeld, G., Westhoff, P., y Koop, H-U. (1991). PEG-mediated plastid transformation: A new system for transient gene expression assays in chloroplasts. *Theor. Appl. Genet.* **82**:717–722.
- Starner, T.D., Agerberth, B., Gudmundsson, G.H., y McCray, P.B. (2005). Expression and activity of beta-defensins and LL-37 in the developing human lung. *J. Immunol.* **3**:1608-1615.
- Staub, J.M., y Maliga, P. (1995). Expression of a chimeric *uidA* gene indicates that polycistronic mRNAs are efficiently translated in tobacco plastids. *Plant J.* **7**:845–848.
- Staub, J.M., Garcia, B., Graves, J., Hajdukiewicz, P., Hunter, P., Nehra, N., Paradkar, V., Schlittler, M., Carroll, J., Spatola, L., Ward, D., Ye, G., y Russell, D. (2000). High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nat. Biotechnol.* **18**: 333–338.
- Steinberg, D.A., Hurst, M.A., Fuji, C.A., Kung, A.H.C., Ho, J.F., Cheng, F.C., Loury, D.J., y Fiddes, J.C. (1997). Protegrin-1: a broad-spectrum, rapidly microbicidal peptide with in vivo activity. *Antimic. Agents. Chemoth.* **41**: 1738–1742.
- Svab, Z., Hajdukiewicz, P., y Maliga, P. (1990). Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 8526-8530
- Sytnik, E., Komarnytsky, Gleba, Y., y Kuchuk, N. (2005). Transfer of transformed chloroplast from *Nicotina tabacum* to the *Lycium barbarum* plants. *Cell Biology International.* **29**:71-75.
- Tamamura, H., Murakami, T., Horiuchi, S., Sigihara, K., Otaka, A., Takada, W., Ibuka, T., Waki, M., Yamamoto, N., y Fujii, N. (1995). Synthesis of protegrin-related peptides and their antibacterial and anti-human immunodeficiency virus activity. *Chem Pharm Bull.* **43**:853–858.

- Tregoning, J.S., Nixon, P., Kuroda, H., Svab, Z., Clare, S., Bowe, F., Fairweather, N., Ytterberg, J., van Wijk, K. J., Dougan, G., y Maliga, P. (2003). Expression of tetanus toxin fragment C in tobacco chloroplast. *Nucleic Acids Research*. **4**:1174-1179.
- Trigiano, R.N., y Gray, D.J. "Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises", CRC Press, 2ª Edición, (2000).
- Turner, J., Cho, Y., Dinh, N.N., Waring, A.J. y Lehrer, R.I. (1998). Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. *Antim Agents Chemoth.* **42**: 2206-2214.
- Ulvatne, H. (2003). Antimicrobial peptides. *American Journal of Dermatology*. **9**:591-595.
- WHO: <http://www.who.int/infectious-disease-report/2000/>
- Wu, H., Zhang, G., Ross, C.R., y Blecha, F. (1999) Cathelicidin gene expression in porcine tissues: Roles in ontogeny and tissue specificity. *Infect. Immun.* **67**: 439-442.
- Yasin, B., Lehrer, R.I., Harwing, S.S.L., y Wagari, E.A. (1996). Protegrins: structural requirements for inactivating elementary bodies of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun.* **64**: 4863-4866.
- Yoon, C., Turner, J.S., Nhu-Nguyen, D., y Lehrer, R.I. (1998). Activity of protegrins against yeast-phase *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **66**: 2486-2493.
- Zannetti, M., Gennaro, R., y Romeo, D. (1995). Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett.* **347**:1-5.
- Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organism. *Nature*. **415**:389-395.
- Zhang, X.H., Portis, A.R., y Widholm, J.M. (2001). Plastid Transformation of soybean suspension cultures. *J. Plant Biotech.* **3**: 39-44.
- Zhao, C., Ganz, T., y Lehrer, R.I. (1995). The structure of porcine protegrin genes. *FEBS Lett.* **368**:197-202.
- Zhuong, Z., Koop, U. (2001). Analysis of *cis*-acting expression determinants of the tobacco *psbA5'*UTR *in vivo*. Tesis de Doctorado. Facultad de Biología de la Universidad de Munich, Alemania.

Capítulo 10
APÉNDICE

X. APÉNDICE

10.1 Medios de cultivo para plantas

Mezcla basal de sales MS*

Solución	Compuesto	Concentración final (mg/L)	Concentración del stock 100 X (g/L)
MS I	Nitrato de amonio	1650.0	165.0
	Nitrato de potasio	1900.0	190.0
MS II	Sulfato de magnesio	342.5	34.25
	Sulfato de manganeso	16.9	1.69
	Sulfato de zinc	8.6	0.86
	Sulfato de cobre	0.025	0.0025
MS III	Cloruro de calcio	440.0	44.0
	Yoduro de potasio	0.83	0.083
	Cloruro de cobalto	0.025	0.0025
MS IV	Fosfato de potasio monobásico	70.0	7.0
	Ácido bórico	6.2	0.62
	Molibdato de sodio dihidratado	0.25	0.025
MS V	Sulfato ferroso heptahidratado	27.8	2.78
	EDTA dihidratado	37.3	3.73

*Información técnica de Phytotechnology[®]. Modificado por M.C. Sergio Rosales y Q.F.B. Luzmila Martínez.

En caso de contar con el polvo MS listo para usarse marca Phytechnology, se agregan 4.3g para preparar un litro de medio.

10.2 Vitaminas para plantas

10.2.1 Vitaminas del medio RMOP (Necesarios para *Nicotiana tabacum*)

Compuesto	Concentración final (mg/L)	Concentración del Stock 1000 X (mg/mL)
Myoinositol	100.0	100.0
Tiamina	10.0	10.0

Los compuestos se disolvieron en agua desionizada estéril y se aforaron a 50 mL, para almacenarse a -20 °C.

10.2.2 Vitaminas B5 (Necesarias para *Lactuca sativa*)

Compuesto	Concentración (mg/L)	Concentración del Stock 1000 X (mg/mL)
Myo Inositol	100	100
Tiamina	0.1	0.1
Ácido nicotínico	0.5	0.5
Piridoxina	0.5	0.5
Glicina	2.0	2.0

Los compuestos se disolvieron en agua desionizada estéril y se almacenaron en alícuotas de 25 mL a -20 °C.

10.2.3 Vitaminas MS

Compuesto	Concentración final (mg/L)	Concentración del Stock 1000 X (mg/mL)
Myoinositol	100.0	100.0
Tiamina	10.0	10.0
Ácido nicotínico	1.0	1.0
Piridoxina	1.0	1.0

Los compuestos se disolvieron en agua desionizada estéril y se almacenaron en alícuotas de 25 mL a -20 °C.

10.3 Medios de cultivo para lechuga y tabaco

A continuación se presentan Tablas en las cuales se describe la composición de los medios de cultivo de tejido, con los reguladores de crecimiento y vitaminas de acuerdo a la planta en la que se realizó.

10.3.1 Medios de cultivo para lechuga (*Lactuca sativa*)

Componentes	MS	MSO	MS104	MSJ
Sales MS 2X	500 mL/L	500 mL/L	500 mL/L	500 mL/L
Vitaminas (1000X)	MS- 1mL	B5- 1mL	B5- 1mL	MS- 1mL
BA	-	-	0.5mg/L	0.5mg/L
ANA	-	-	0.02m/L	1.0mg/L
Cinetina	-	-	-	-
2,4-D	-	-	-	-
Caseína	-	-	-	-
Sacarosa (g/L)	30	30	30	30
pH	5.7	5.7	5.7	5.7
Agar (g/L)	7	7	7	7

10.3.2 Medios para tabaco (*Nicotiana tabacum*)

Componentes	MS	MSO	RMOP
Sales MS 2X	500mL/L	500mL/L	500mL/L
Vitaminas (1000X)	MS- 1mL	B5- 1mL	RMOP- 1mL
BA	-	-	1(mg/L)
ANA	-	-	0.1(mg/L)
Sacarosa (g/L)	30	30	30
pH	5.8	5.8	5.8
Agar (g/L)	7	7	8