



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA

**“OPTIMIZACIÓN DE LA TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE
ALFALFA PARA LA EXPRESIÓN DE EPÍTOPOS RELEVANTES
DE *BORDETELLA PERTUSSIS*”**

Tesis que presenta

Q.F.B. María Teresa Esquivel Contreras

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

San Luis Potosí, S.L.P., Julio de 2013.



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Optimización de la transformación genética de alfalfa para la expresión de epítomos relevantes de Bordetella pertussis**” presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **María Teresa Esquivel Contreras** y aprobada el **ocho de julio del dos mil trece** 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. Gerardo Rafael Argüello Astorga
Director de la tesis

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Ruth Elena Soria Guerra
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

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

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-262188) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C., así como apoyo financiero del proyecto “Reconversión del cultivo de alfalfa” apoyado por la CAED.



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 112 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 8 días del mes de julio del año 2013, se reunió a las 10:00 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. Ruth Elena Soria Guerra	Sinodal externo	UASLP

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

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

María Teresa Esquivel Contreras

sobre la Tesis intitulada:

Optimización de la transformación genética de alfalfa para la expresión de epítomos relevantes de Bordetella pertussis

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 11:30 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 8 días del mes de julio de 2013.


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado

Dedicatorias

Después de dos años de grandes retos, aprendizajes y experiencias he culminado esta etapa de mi vida, lo cual no hubiese sido posible sin el apoyo de personas tan importantes que estuvieron en todo momento.

Primeramente agradezco a Dios, quien supo guiarme y mantener mi fortaleza para permitirme cumplir un sueño más.

A mis padres quienes son el ejemplo de perseverancia por excelencia, de amor incondicional, motivación y el pilar que me mantuvo avante en cada paso, que acortaron largas distancias para hacerme saber y sentir que siempre estarán conmigo en cada decisión y momento de mi vida.

A mis hermanas, amigas, cómplices y compañeras; me han demostrado que las palabras van de la mano con las acciones, y eso mantuvo encendido mi motor.

A Luis Rodríguez, novio, amigo y consejero, a quien la distancia no limita para hacerme sentir que su apoyo y amor estuvieron y estará siempre presentes.

Agradecimientos

Al Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís, por brindarme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo, por su orientación, enseñanzas y apoyo durante la realización de éste trabajo.

A la Dra. Ruth Elena Soria Guerra y el Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga, quienes me dieron su tiempo y apoyo en la revisión de la tesis, gracias por tan acertadas sugerencias, aportaciones y consejos.

A mis compañeros de laboratorio: Lucy, Mayra, Benita, Lula, Karla, Vero y Mireya, con quienes compartí tiempo y largas horas, haciendo más llevadero el trabajo en el laboratorio.

A las técnicas Q.F.B Rosy Castillo y M.C. Ana Luz Romero por su apoyo en el trabajo diario.

A la Sra. Rosy por su apoyo, consejos y cariño sincero.

Y a mis amigos, Cinthya, Ángel, Paty, Yazmín y Oscar por compartir estos dos años conmigo y brindarme su valiosa amistad, la cual espero perdure a través del tiempo.

ÍNDICE

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos Institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	ix
Lista de figuras	x
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
1 INTRODUCCIÓN	1
2 MATERIALES Y MÉTODOS	4
2.1 Estandarización del método de esterilización de semilla y germinación	4
2.2 Determinación de la dosis letal media en semilla e hipocotilo de alfalfa para dos agentes de selección: kanamicina y espectinomicina	5
2.2.1 Determinación de la dosis letal media en semilla de alfalfa	5
2.2.2 Determinación de la dosis letal media en explante de hipocotilo de alfalfa	5
2.3 Desarrollo de un sistema de regeneración de alfalfa	6
2.3.1 Medios de cultivo de tejidos	6
2.3.2 Esterilización de semilla y germinación	6
2.3.3 Ensayos de regeneración utilizando hipocotilos como explantes	8
2.3.4 Ensayos de regeneración utilizando embriones maduros como explantes	8
2.3.5 Ensayos de regeneración utilizando cotiledones y hojas como explantes	10
2.4 Cepas de <i>Agrobacterium</i> y vector de transformación	10
2.5 Estandarización de un sistema de transformación nuclear de alfalfa	12
2.5.1. Transformación nuclear de alfalfa utilizando plántulas como explante	12
2.5.2. Transformación nuclear de alfalfa utilizando embriones maduros como explantes	15

2.5.3. Transformación nuclear de alfalfa utilizando hipocotilos como explante	17
2.6. Ensayo histoquímico de la β -glucoronidasa (GUS)	17
2.7. Análisis de reacción en cadena de la polimerasa	19
2.8. Diseño del gen sintético	19
3. RESULTADOS	22
3.1. Estandarización del método de esterilización de semilla	22
3.2. Establecimiento de la dosis letal media en semilla de alfalfa para dos agentes de selección: kanamicina y espectinomicina	22
3.3. Establecimiento de la dosis letal media en explante de hipocotilo de alfalfa para dos agentes de selección: kanamicina y espectinomicina	24
3.4. Desarrollo de un sistema de regeneración de alfalfa	29
3.4.1. Ensayos de regeneración utilizando hipocotilo como explantes	29
3.4.2. Ensayos de regeneración utilizando embriones maduros como explantes	31
3.4.3. Ensayos de regeneración utilizando cotiledones y hojas como explantes	31
3.5. Estandarización de un sistema de transformación nuclear de alfalfa	36
3.6. Identificación de plantas transgénicas de alfalfa mediante análisis de reacción en cadena de la polimerasa	37
3.7. Construcción pBI121-BP para la transformación nuclear de alfalfa	43
4. DISCUSIÓN	45
5. REFERENCIAS	49
ANEXO A. TÉCNICAS EMPLEADAS	52
Preparación de células químicamente competentes y transformación de <i>E. coli</i> por choque térmico.	52
Preparación de células electrocompetentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	52
Extracción de ADN plasmídico.	53
ANEXO B. SOLUCIONES	54
Preparación de soluciones	54
Preparación de antibióticos	54
Reguladores del crecimiento	55
Preparación de medios de cultivo	55

Lista de tablas

Tabla 1. Composición de los medios de regeneración seleccionados.	7
Tabla 2. Características de las cepas de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> empleadas en este trabajo.	11
Tabla 3. Comparación de los porcentajes de eficiencias de esterilización superficial y los porcentajes de germinación de los métodos usados.	23
Tabla 4. Porcentajes de germinación para los diferentes agentes de selección utilizados.	23
Tabla 5. Efecto de diferentes cepas de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> en la transformación de alfalfa.	38

Lista de figuras

Figura 1. Procedimiento utilizado para la obtención del explante y medio de regeneración más apropiado.	9
Figura 2. Transformación de plántulas de alfalfa con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -pBI121.	14
Figura 3. Transformación de embriones maduros de alfalfa con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -pBI121.	16
Figura 4. Transformación de hipocotilo de alfalfa con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -pBI121.	18
Figura 5. Esquema del gen sintético para la transformación nuclear que codifica para una proteína de fusión que comprende regiones de epítomos relevantes de <i>Bordetella pertussis</i> .	21
Figura 6. Desarrollo de plántulas de alfalfa germinadas en MS 0.5 X con distintas concentraciones de kanamicina.	25
Figura 7. Desarrollo de plántulas de alfalfa germinadas en MS 0.5 X con distintas concentraciones de espectinomicina.	26
Figura 8. Regeneración de plántulas de alfalfa a partir de hipocotilos puestos en medio Li con diferentes concentraciones de kanamicina.	27
Figura 9. Regeneración de plántulas de alfalfa a partir de hipocotilos puestos en medio de Li con diferentes concentraciones de espectinomicina.	28
Figura 10. Diferentes estados de regeneración de alfalfa a partir de hipocotilos.	30
Figura 11. Diferentes estados de regeneración de alfalfa a partir de embriones maduros.	32
Figura 12. Comparación de los diferentes medios de regeneración y su efecto utilizando cotiledones como explantes.	33
Figura 13. Embriones globulares emergiendo en la superficie del callo.	34
Figura 14. Comparación de los diferentes medios de regeneración y su efecto utilizando hojas como explantes.	35

Figura 15. Ensayo histoquímico de la expresión de β -glucoronidasa (GUS) en hojas de plántulas transformadas con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	39
Figura 16. Ensayo histoquímico de la expresión de β -glucoronidasa (GUS) en hojas de embriones maduros transformadas con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	40
Figura 17. Ensayo histoquímico de la expresión de β -glucoronidasa (GUS) en hojas de hipocotilos transformadas con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	41
Figura 18. Análisis por PCR de las plantas de alfalfa transformadas con el plásmido pBI121 usando los oligonucleótidos gus F y gus R.	42
Figura 19. Análisis por PCR de las plantas de alfalfa transformadas con el plásmido pBI121 usando los oligonucleótidos nptII F y nptII R.	42
Figura 20. Secuencia del gen sintético BP optimizado para su expresión en alfalfa.	44

RESUMEN

Optimización de la transformación genética de alfalfa para la expresión de epítomos relevantes de *Bordetella pertussis*

La tos ferina es una enfermedad infecciosa aguda, altamente contagiosa, de las vías respiratorias altas. En las últimas décadas la incidencia de esta enfermedad causada por la bacteria *Bordetella pertussis* ha aumentado en los países en desarrollo, e incluso se han presentado casos en niños y adolescentes que fueron previamente vacunados, por lo que el desarrollo de una vacuna contra la tos ferina que inmunice de modo eficiente y a bajo costo, es particularmente importante para países del Tercer Mundo. En este sentido, la producción de proteínas antigénicas en plantas es una alternativa económicamente viable. Este trabajo se enfoca a la expresión de epítomos relevantes de *B. pertussis* y moléculas adyuvantes, en plantas transgénicas de alfalfa (*Medicago sativa*), como primer paso en el desarrollo de una vacuna mejorada contra la tos ferina. Para ello, se estandarizaron y optimizaron las condiciones de transformación y regeneración de este sistema vegetal para la expresión de las proteínas de interés. Se probaron 5 diferentes cepas de *Agrobacterium tumefaciens* (C58C1, C58/GV3101, GV3101, GV3010 y LBA4404) que contenían el vector binario pBI121 y se evaluaron 3 protocolos diferentes de transformación, usando plántulas, embriones maduros e hipocotilos maduros como material inicial. La transformación de las plantas fue confirmada por PCR y el ensayo histoquímico de la actividad de la glucoronidasa. La mayor eficiencia de transformación (30%) se logró empleando la cepa de *A. tumefaciens* GV3010 e hipocotilo como explante inicial, por lo que concluimos que éste es un método eficiente para introducir los genes de interés biofarmacéutico en la variedad de alfalfa CUF 101. Finalmente, se diseñó un gen sintético para la transformación nuclear, el cual codifica varios epítomos relevantes de *B. pertussis*, como algunos derivados de la hemaglutinina, pertactina, toxina pertúsica y fimbria, además de una secuencia adyuvante derivada de *E. coli* enterotoxigénica. Este gen sintético formado con secuencias cortas de varios genes se clonó en un vector binario y será utilizado para la transformación nuclear de alfalfa.

PALABRAS CLAVE: Tosferina, biofarmacéuticos, vacuna, gen sintético.

ABSTRACT

Optimization of genetic transformation of alfalfa for the expression of relevant epitopes from *Bordetella pertussis*

Whooping cough is an acute highly contagious disease of upper respiratory tract. In the last decades the incidence of this disease caused by bacteria *Bordetella pertussis* has increase in the developing countries and there have been cases in children and teenagers who had been vaccinated; therefore development of vaccine against whooping cough that can effectively immunize at a low-cost, is particularly important for Third World countries. In this sense, the production of antigenic proteins in plants is an economically feasible alternative. This work focuses on the expression of relevant epitopes of *B. pertussis* and an adjuvant, in transgenic alfalfa plants (*Medicago sativa*), as a first step in the development of an improved vaccine against whooping cough. For this purpose, we standardized and optimized the transformation and regeneration conditions for the expression of proteins of interest in this plant system. Five different strains of *Agrobacterium tumefaciens* (C58C1, C58/GV3101, GV3101, GV3010 and LBA4404) harboring the binary vector pBI121 were tested. Furthermore, three different transformation protocols were evaluated using seedlings, mature embryos and mature hypocotyls as starting material. Plant transformation was confirmed by PCR and the glucuronidase activity histochemical assay. The highest transformation efficiency (30%) was obtained by using *A. tumefaciens* strain GV3010 and hypocotyls as starting material, thus we conclude that this is an efficient transformation method to introduce genes of biopharmaceutical interest into alfalfa var CUF101. Finally, a synthetic gene was designed for the nuclear transformation of alfalfa. This synthetic gene has several relevant epitopes from *B. pertussis* such as some derived from hemagglutinin, pertactin, pertussis toxin and fimbria and an adjuvant sequence derived from an enterotoxigenic *E. coli*. This synthetic gene that harbors short sequences of several genes was cloned into a binary vector and will be used for alfalfa nuclear transformation.

KEY WORDS: Whooping cough, biopharmaceutical, vaccine, synthetic gene.

1 INTRODUCCIÓN

La tos ferina es una enfermedad infecciosa altamente contagiosa de las vías respiratorias altas, que representa un problema de salud pública mundial. En países desarrollados, a pesar de la vacunación universal en la infancia, se ha observado un aumento de casos en ciertos grupos de edad, como adolescentes y adultos jóvenes, así como lactantes, presentando estos últimos las mayores tasas de hospitalización, complicaciones graves y mortalidad (Moreno Pérez, 2008).

La tos ferina es causada por la bacteria *Bordetella pertussis* que es un bacilo Gram-negativo con afinidad exclusiva por las capas de la mucosa de las vías respiratorias humanas. Posee múltiples factores de virulencia que determinan su patogenicidad, dentro de los que se incluyen la toxina pertussis (TP), la hemaglutinina filamentosa (HFA), la pertactina (PRN), las fimbrias (FIM) de tipo 2 y tipo 3, la toxina adenilato ciclasa (TAC), la citotoxina traqueal (CTT), lipooligosacáridos y endotoxina. La patogénesis de la tos ferina no se comprende completamente, pero la FHA, PRN y FIM podrían facilitar la unión a células huésped específicas, y TP, TCT y TAC permitir a la bacteria destruir el revestimiento epitelial y evadir el sistema inmune (WHO, 2010).

Las manifestaciones clínicas de la tos ferina varían según el huésped, y van desde la presencia de tos paroxística con estridor inspiratorio, periodos de apnea y tos emetizante, hasta síntomas leves que pueden ser confundidos con infecciones virales de las vías respiratorias (Grupo de expertos en vacunación contra tos ferina, 2011).

Se estima que entre 200,000 a 400,000 niños mueren por esta enfermedad en América, aunque la cifra puede ser mayor, dado que su cuadro clínico suele confundirse con el de otras enfermedades respiratorias. Estimaciones recientes indican que la incidencia global anual es de 60 millones de casos; aunque las infecciones en los adultos, por ser en general de presentación clínica atípica, no se diagnostican (Morón Duarte y col., 2008).

La prevención de la tos ferina en los países industrializados se basa principalmente en la inmunización con vacunas acelulares. El uso rutinario de las vacunas contra la tos ferina de células enteras se suspendió en algunos países en

los 1970s/1980s debido a las preocupaciones sobre los posibles efectos adversos, pero todavía están en uso en los países de bajos ingresos, ya que son mucho menos costosas. Además, las vacunas contra la tos ferina de células enteras no tienen licencia para uso rutinario en niños mayores, adolescentes y adultos (Bechini y col., 2012).

Los altos costos de producción de las vacunas acelulares resultan finalmente en precios por dosis más elevados que las vacunas de células enteras, siendo por ello poco accesibles para la mayoría de los países en desarrollo (WHO, 2010).

El desarrollo de una vacuna contra la tos ferina a bajo costo, que inmunice eficientemente con solo una dosis, es de particular importancia para países en desarrollo, donde es difícil acceder a centros de salud y se dificulta completar el esquema de vacunación de los infantes (Soria-Guerra, 2009).

Desde el punto de vista económico, el costo de producción de biomoléculas en plantas íntegras, es menor que la de cultivo de células microbianas y de animales, que requieren de equipo, sustrato y suministro de energía eléctrica (Shinmyo y Kato, 2010). En términos generales, una ventaja importante de las plantas transgénicas con respecto a otros sistemas de producción disponibles para la producción a gran escala y de bajo costo, tales como *Escherichia coli* o levaduras, es su capacidad para realizar la mayoría de las modificaciones post-traduccionales requeridas para la bioactividad y farmacocinética de la proteína terapéutica (Faye y Gomord, 2010).

La alfalfa (*Medicago sativa*) como sistema de expresión de proteínas recombinantes ofrece varias ventajas, entre las que destacan las siguientes: 1) alto contenido de proteína (del 17 al 20% de peso seco); 2) rendimientos de hasta 75 ton/ha en peso fresco (SIAP 2012) y de 4 ton/ ha de forraje seco (Vázquez-Vázquez y col., 2010); 3) capacidad para producir y procesar glicoproteínas recombinantes con patrones de glicosilación homogéneos (D'Aoust y col., 2004).

Tomando en consideración el potencial de los sistemas vegetales para la producción de proteínas de importancia médica, el presente trabajo se enfoca a la expresión de epítomos relevantes de *Bordetella pertussis* en plantas de alfalfa, como un primer paso en el desarrollo de una vacuna mejorada contra la tos ferina,

que pueda incluir regiones antigénicas no presentes en las vacunas acelulares producidas en la actualidad. Para ello, es necesario estandarizar y optimizar las condiciones de regeneración y transformación de este sistema vegetal para la expresión de las proteínas de interés.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Estandarización del método de esterilización de semilla y germinación

Las semillas de alfalfa (*Medicago sativa* variedad CUF 101) se esterilizaron superficialmente por tres métodos distintos los cuales se detallan a continuación:

Método 1: semillas de alfalfa fueron puestas en agitación con una solución de Extrán® al 10% durante 5 min, renovando luego la solución y agitando por 5 min adicionales; a lo que siguieron tres enjuagues de 1 min cada uno con agua destilada estéril, etanol al 70% por 1 min, seguido por tres enjuagues de 1 min cada uno con agua destilada estéril y por último en una solución de hipoclorito de sodio al 10% por 20 min, seguido por tres enjugues de 1 min cada uno con agua destilada estéril.

Método 2: semillas de alfalfa fueron puestas primero en agitación con etanol al 70% por 1 min, seguido por tres enjuagues de 1 min cada uno con agua destilada estéril y por último en una solución de hipoclorito de sodio al 10% por 20 min, seguido por tres enjugues de 1 min cada uno con agua destilada estéril.

Método 3: semillas de alfalfa fueron puestas primero en agitación con una solución de Extrán® al 10% durante 5 min en dos ocasiones, seguido por tres enjuagues de 1 min cada uno con agua destilada estéril, etanol al 70% por 1 min, seguido por tres enjuagues de 1 min cada uno con agua destilada estéril y por último en una solución de hipoclorito de sodio al 20% por 20 min, seguido por tres enjugues de 1 min cada uno con agua destilada estéril.

Las semillas esterilizadas a través de los métodos antes mencionados se colocaron sobre gasa estéril para eliminar el exceso de humedad, y posteriormente 100 semillas por tratamiento fueron puestas a germinar en frascos de vidrio con medio MS 0.5 X (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 1% de sacarosa, en una cámara de cultivo a un fotoperiodo normal de 16 horas luz/8 horas oscuridad y una temperatura de 26°C. Después de 5 días se contabilizaron las semillas que germinaron así como los índices de contaminación para calcular la eficiencia de esterilización de cada uno de los métodos y así determinar cuál sería el más apropiado.

$$\% \text{ de eficiencia de esterilización} = \frac{\text{No. de semillas libres de contaminación}}{\text{No. de semillas totales}} \times 100$$

2.2 Determinación de la dosis letal media en semilla e hipocotilo de alfalfa para dos agentes de selección: kanamicina y espectinomicina

Dentro del proceso de generación de plantas transgénicas, debe seleccionarse la dosis de agente de selección que permita discriminar entre las plantas transformadas y las no transformadas. Los marcadores de selección más eficientes para la transformación de plantas provienen de genes bacterianos que confieren resistencia a antibióticos o herbicidas. Es por ello que se considera importante el establecimiento de la dosis letal media tanto en semilla como en tejido a transformar (explante), para los agentes de selección que en este caso fueron los antibióticos kanamicina y espectinomicina, dicha resistencia es conferida en los vector binario pBI121 y el vector pKCZ que son utilizados para transformación nuclear y de cloroplastos, respectivamente.

2.2.1 Determinación de la dosis letal media en semilla de alfalfa

Quinientas semillas por réplica se sometieron a un proceso de desinfección (método 1), para su posterior siembra en 5 diferentes concentraciones de kanamicina (10, 20, 50, 75 y 100 mg L⁻¹) y espectinomicina (100, 200, 500, 550 y 600 mg L⁻¹) más un control (sin antibiótico). Las semillas se germinaron *in vitro* en medio ½ MS libre de hormonas (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 1% de sacarosa bajo un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad a 25 °C. Finalmente se cuantificaron los índices de germinación para cada concentración de antibiótico empleada.

2.2.2 Determinación de la dosis letal media en explante de hipocotilo de alfalfa

Después de un proceso de desinfección (método 1), se pusieron a germinar semillas *in vitro* durante 5 días. Posteriormente el hipocotilo fue cortado y utilizado

como explante para regenerar en placas Petri con medio reportado por Li y col. (2009) conteniendo 5 diferentes concentraciones de kanamicina (10, 20, 50, 75, 100, 200, 250 y 300 mg L⁻¹) y espectinomicina (100, 200, 300, 500 y 700 mg L⁻¹) más un control (sin antibiótico), en un experimento en el que se emplearon 50 explantes por cada concentración a probar. Las cajas fueron puestas bajo un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad a 25 °C y monitoreadas semanalmente.

2.3 Desarrollo de un sistema de regeneración de alfalfa

Los sistemas de regeneración son necesarios para poder obtener un gran número de plantas a partir de un material transgénico por lo que hay que probar diferentes explantes y medios. Para ello se evaluaron diferentes medios de cultivo así como de explantes iniciales para determinar cuáles serían los más apropiados.

2.3.1 Medios de cultivo de tejidos

Los medios de cultivos de tejidos usados para inducir regeneración fueron seleccionados de la literatura y corresponden al medio MS104, RM73, LM1, SH y Li cuya composición y concentración de reguladores de crecimiento se muestran en la Tabla 1. A todos los medios se les agregaron 2 g L⁻¹ de fitagel (Phytotech, USA) para solidificación y 30 g L⁻¹ de sacarosa antes de esterilizado a 121 °C durante 15 min y posteriormente fueron vaciados en placas Petri.

2.3.2 Esterilización de semilla y germinación

Las semillas se esterilizaron superficialmente utilizando el método 1 descrito en la sección 2.1. Después del procedimiento de esterilización, fueron germinadas en medio MS 0.5 X con 2 g L⁻¹ de fitagel (Phytotech, USA) y suplementado con 1% de sacarosa, bajo un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad a una temperatura de 26 °C.

Para la selección de la fuente de explante se usaron: hipocotilos, embriones maduros, cotiledones y hojas, probando los diferentes medios y siguiendo el protocolo general que se esquematiza en la Figura 1.

Tabla 1. Composición de los medios de regeneración seleccionados.

	MS104¹	RM73²	LM1³	SH⁴	Li⁵
Sales	MS	MS	MS	SH	MS
Vitaminas	MS	MS	-	-	B5
ANA (mg L ⁻¹)	0.05	0.09	-	-	-
BA (mg L ⁻¹)	0.02	-	-	-	-
TDZ (mg L ⁻¹)	-	1.10	-	-	0.025
Cinetina (mg L ⁻¹)	-	-	0.25	0.2	-
2,4-D (mg L ⁻¹)	-	-	2	1	-
Caseína (mg L ⁻¹)	-	-	2	-	-
AgNO ₃ (mg L ⁻¹)	-	-	-	-	3

Nota: ¹ Pileggi y col., 2001; ² Ding y col., 2003; ³ Wei y col., 2011; ⁴ Liu y col., 2011; ⁵ Li y col., 2009.

2.3.3 Ensayos de regeneración utilizando hipocotilos como explantes

Los explantes fueron removidos de forma aséptica de plántulas de 5 días de edad y colocados en los medios previamente seleccionados. La inducción de brotes fue monitoreada durante varias semanas. Los brotes adventicios formados en el ápice de los hipocotilos fueron removidos del explante a la 4^o semana y subcultivados en medio MS para enraizar. Luego de varias 3-4 semanas comenzó el proceso de enraizamiento en algunos de los brotes pasados a medio MS y una vez que la plántula tuvo una altura mayor a 5 cm fue puesta en macetas para su posterior aclimatación. Adicionalmente se realizó una modificación al medio de regeneración RM73 disminuyendo la concentración final de TDZ a 0.025 mg L⁻¹ con la finalidad de obtener un mayor número de brotes adventicios y con menor grado de vitrificación.

2.3.4 Ensayos de regeneración utilizando embriones maduros como explantes

De acuerdo a lo reportado por Li y col. en el 2009, se llevó a cabo el siguiente protocolo de regeneración *in vitro* vía organogénesis directa, el cual se plantea como un método rápido de regeneración. Después de esterilizar, las semillas se dejaron embebidas en agua toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, las capas de las semillas, cotiledones y radículas fueron eliminadas y los nodos cotiledonarios con 1 a 2 mm de segmentos de hipocotilo se insertaron verticalmente en medio Murashige y Skoog (1962) modificado (mMS) que consiste en sales MS, vitaminas B5 (Gamborg y col., 1968), 30 g L⁻¹ de sacarosa, 8 g L⁻¹ de agar, 0.025 mg L⁻¹ de tidiázurón (TDZ) y 3 mg L⁻¹ de AgNO₃. Las cajas fueron selladas y puestas en una cámara de cultivo bajo un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad a una temperatura de 26 °C.

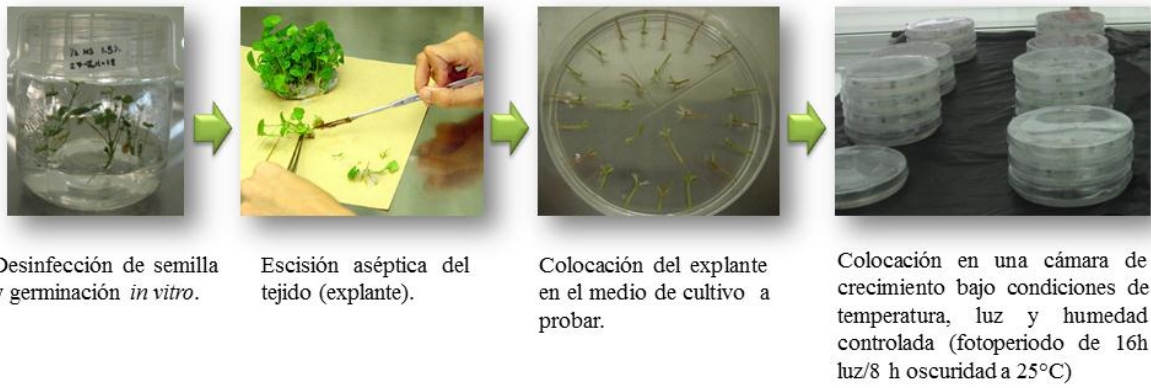


Figura 1. Procedimiento utilizado para la obtención del explante y medio de regeneración más apropiado.

A la tercera semana los brotes adventicios que emergieron del nodo apical se escindieron y pasaron a medio MS 0.5 X libre de hormonas para el enraizamiento. Después de la primera semana surgieron las primeras raíces de algunas de las plántulas. Sin embargo, las plántulas se dejaron crecer 8 semanas, hasta que la mayoría de las plántulas enraizaron y fueron transferidas a maceta para su aclimatación. Este mismo explante fue utilizado probando en medio MS104 pero aún y cuando se logró inducir brotes, éstos lograron muy poco desarrollo en comparación con el medio Li.

2.3.5 Ensayos de regeneración utilizando cotiledones y hojas como explantes

Los explantes fueron removidos de forma aséptica de plántulas de 5 y 10 días de edad, para el caso de cotiledones y hojas respectivamente, y colocados en los medios previamente seleccionados. La inducción de brotes se monitoreó durante varias semanas en la que diferencias entre los distintos medios fueron observadas.

2.4 Cepas de *Agrobacterium* y vector de transformación

En este trabajo fueron utilizadas las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* C58C1, C58/GV3101, GV3101, GV3010 y LBA4404; transformadas por electroporación con el vector binario pBI121. En la Tabla 2 se describen algunas características de las diferentes cepas de *Agrobacterium*. El plásmido pBI121 contiene β -glucoronidasa (*uidA*) como gen reportero y neomicina fosfotransferasa II (*nptII*) como marcador de selección, ambos genes bajo el control del promotor del virus del mosaico de la coliflor (*CaMV* 35S).

Tabla 2. Características de las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* empleadas en este trabajo.

Cepa	Plásmido Ti	Opina	Gen marcador
C58C1	Curada	Nopalina	Rifampicina
C58/GV3101	pMP90	Nopalina	Rifampicina, gentamicina
GV3101	Curada	Nopalina	Rifampicina
GV3010	pMP90	Nopalina	Rifampicina, gentamicina
LBA4404	Curada	Octopina	Rifampicina

2.5. Estandarización de un sistema de transformación nuclear de alfalfa

El mejor método de regeneración no siempre es el que produce la mayor eficiencia de transformación por lo que hay que probar métodos eficientes de transformación a la par de métodos de regeneración. Por ello, se evaluaron tres protocolos para la transformación nuclear de alfalfa utilizando plántulas, embriones maduros e hipocotilos como material inicial.

2.5.1. Transformación nuclear de alfalfa utilizando plántulas como explante

El primer protocolo de transformación nuclear que se probó fue la metodología reportada por Weeks y col. en el 2008, con algunas modificaciones. El procedimiento que se siguió se ilustra en la Figura 2 y se detalla a continuación.

Las semillas estériles fueron germinadas en medio de germinación de semillas (SGM) que consiste de medio MS y 1% de sacarosa por dos días a 24 °C en la oscuridad y a 4 °C por 16 horas antes de la transformación. Los cotiledones de las plántulas fueron asépticamente eliminados en la posición del nodo apical previo a la infección con la bacteria conteniendo un vector binario, y transferidos a un tubo de 50 mL con 15 mL de una suspensión de *Agrobacterium* y acetosiringona 200 µM. Esta suspensión fue obtenida inoculando *Agrobacterium* portando el plásmido pBI121, en 20 mL de medio YM que contenía 100 mg L⁻¹ de kanamicina e incubado a 28 °C bajo rotación constante a 250 rpm, colectando las células por centrifugación por 15 min a 3600 rpm y resuspendiendo en 15 mL de medio MS ajustando a una DO₆₀₀ de 0.45. Adicionalmente, se agregaron 2.4 g de arena de cuarzo blanca estéril (pasado por malla 80) al medio conteniendo las plántulas en el tubo de 50 mL. El tubo fue colocado verticalmente en una placa de agitación por 30-45 min (400 rpm) a 28 °C. Las plántulas tratadas fueron colocadas verticalmente dentro del medio de co-cultivo (medio MS 0.5 X, 1.5% de sacarosa, 2 g L⁻¹ de fitagel, pH 5.8). Los frascos fueron sellados e incubados por 24-72 h a 24 °C en la oscuridad. Transcurrido el periodo de co-cultivo, todas las plántulas fueron transferidas y colocadas verticalmente dentro del medio de desarrollo de plántulas (SDM) consistente de MS 0.5 X, 1.5% de sacarosa, 250 mg L⁻¹ de cefatoxima, 200 mg L⁻¹ de kanamicina y 2 g L⁻¹ de fitagel (pH 5.8). Los

frascos fueron puestos en una cámara de cultivo bajo un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad y una temperatura de 26 °C.

Después de 21 días en SDM, las plántulas establecidas fueron transferidas a tierra y aclimatadas en una cámara de crecimiento bajo un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad a una temperatura de 26 °C.



Figura 2. Transformación de plántulas de alfalfa con *Agrobacterium tumefaciens*-pBI121.

2.5.2. Transformación nuclear de alfalfa utilizando embriones maduros como explantes

Una segunda estrategia para lograr la transformación nuclear de la alfalfa fue probar con embriones maduros como explante. La metodología realizada se describe con detalle a continuación y se representa en la Figura 3.

Las semillas estériles fueron puestas en un vaso de precipitados y embebidas en agua toda la noche a 4 °C en la oscuridad. Las cubiertas de las semillas, cotiledones, y radículas fueron eliminadas asépticamente y los nodos cotiledonarios con 1 a 2 mm de hipocotilo fueron transferidos a un tubo Eppendorf con 1 mL de una suspensión de *Agrobacterium* y acetosiringona 200 µM. Esta suspensión fue obtenida por la inoculación, con *Agrobacterium* portando el plásmido pBI121, de 20 mL de medio YM con 100 mg L⁻¹ de kanamicina e incubado a 28 °C bajo rotación constante a 250 rpm, sedimentando las células por centrifugación por 15 min a 3600 rpm, y resuspendiéndolas en 15 mL de medio MSO ajustando a una DO₆₀₀ de 0.45. Los tubos fueron colocados en un agitador térmico Thermomixer® (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) por 30-45 min, a 900 rpm y 28 °C. Los explantes fueron colocados verticalmente dentro del medio de co-cultivo Li. Las cajas Petri fueron selladas e incubadas por 48 h a 24 °C en la oscuridad. Luego del periodo de co-cultivo, todos los explantes fueron transferidos y colocados verticalmente dentro del medio de desarrollo de plántulas consistente de medio Li conteniendo 250 mg L⁻¹ de cefatoxima, 200 mg L⁻¹ de kanamicina y 2 g L⁻¹ de fitagel (pH 5.8). Las cajas Petri fueron puestas en una cámara de cultivo bajo un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad, a una temperatura de 26 °C. Después de 28 días en SDM, los brotes adventicios fueron escindidos y transferidos a medio de enraizamiento.

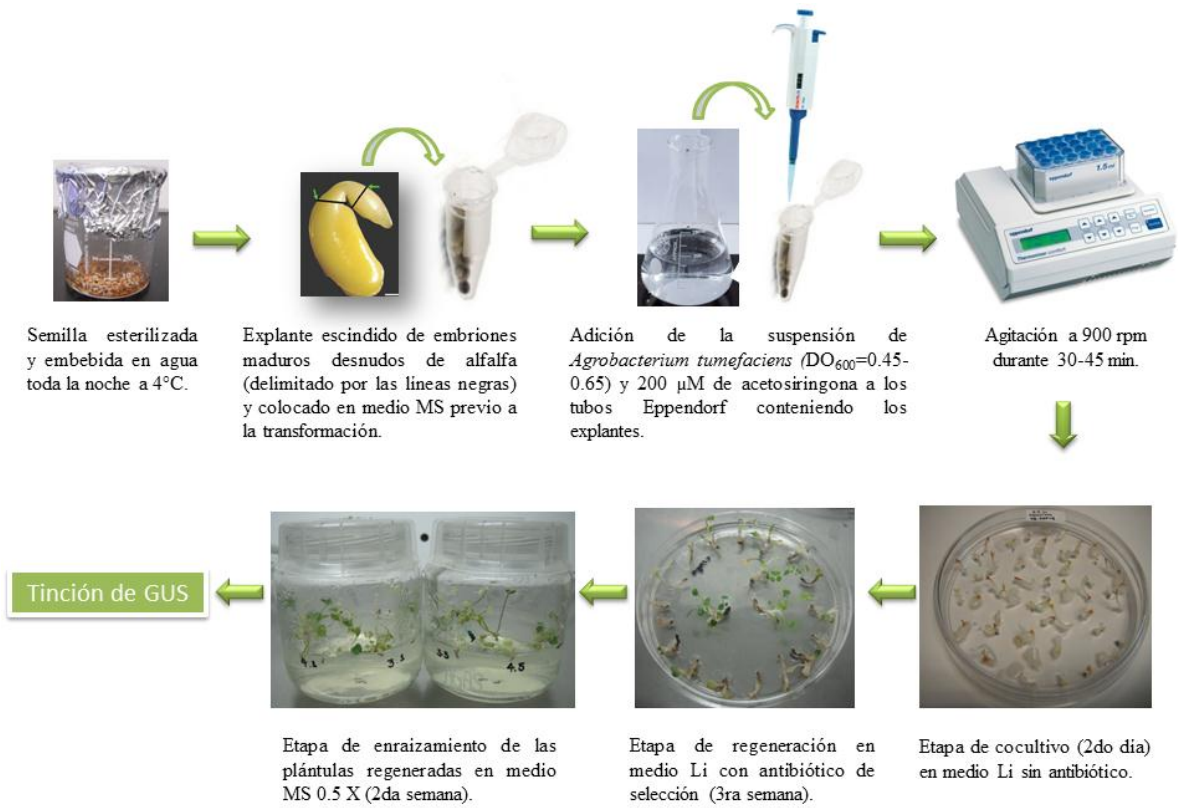


Figura 3. Transformación de embriones maduros de alfalfa con *Agrobacterium tumefaciens*-pBI121.

2.5.3. Transformación nuclear de alfalfa utilizando hipocotilos como explante

Como tercera estrategia de transformación nuclear se probaron hipocotilos como explantes. En la Figura 4 se ilustra el procedimiento que se detalla a continuación. Luego de la germinación de semillas *in vitro* durante ocho días, los cotiledones y radícula de las plántulas fueron eliminados asépticamente, transfiriendo los hipocotilos a una suspensión de *Agrobacterium* con acetosiringona 200 μM . Esta suspensión fue obtenida por la inoculación con *Agrobacterium* conteniendo el plásmido PBI121 de 20 mL de medio YM conteniendo 100 mg L^{-1} de kanamicina e incubado a 28 °C bajo rotación constante a 250 rpm, precipitando las células por centrifugación por 15 min a 3600 rpm y resuspendiendo en 20 mL de medio MSO ajustando a una DO_{600} de 0.45.

Los explantes tratados fueron colocados en el medio de co-cultivo Li. Las cajas Petri fueron selladas e incubadas por 24-48 h a 24 °C en la oscuridad. Posterior al periodo de co-cultivo, todos los hipocotilos fueron transferidos y colocados verticalmente dentro del medio de desarrollo de plántulas consistente de medio Li con 250 mg L^{-1} de cefatoxima, 350 mg L^{-1} de kanamicina y 2 g L^{-1} de fitagel (pH 5.8). Las cajas Petri fueron puestas en una cámara de cultivo bajo un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad a una temperatura de 26 °C.

Después de 4 semanas en SDM, los brotes fueron escindidos y transferidos a medio de enraizamiento.

2.6. Ensayo histoquímico de la β -glucoronidasa (GUS)

Tejido foliar de plantas resistentes a la kanamicina fue seleccionado para realizar la reacción histoquímica de GUS de acuerdo con el procedimiento de Jefferson y col. (1987).

El buffer de reacción tenía una concentración de 2 mM del sustrato X-Gluc (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil glucurónico); además de fosfato de ferrocianuro de potasio 0.5mM, ferricianuro de potasio 0.5 mM, fosfato de potasio 100 mM pH 7.0, EDTA 10 mM y el X-Gluc previamente disuelto en triton 0.1%.



Figura 4. Transformación de hipocotilo de alfalfa con *Agrobacterium tumefaciens*-pBI121.

Después de la tinción durante 24 horas a 37 °C en el buffer de reacción, los tejidos se sumergieron en etanol al 70% para eliminar la clorofila. Este proceso se repitió varias veces hasta desteñir completamente el tejido y revelar la tinción de GUS. Finalmente las muestras se visualizaron en estereoscopio.

2.7. Análisis de reacción en cadena de la polimerasa

Para la detección por PCR, el ADN fue extraído de plantas transformadas genéticamente que mostraron resistencia al antibiótico de selección y plantas control no transformadas. La presencia del gen *gus A* fue confirmada usando el par de oligonucleótidos específicos GUS-F (5'-GGTGGGAAAGCGCGTTACAAG-3') y GUS-R (5'-GTTTACGCGTTGCTTCCGCCA-3'); mientras que la del gen *nptII* se llevó a cabo utilizando el par de oligonucleótidos NPTII-F (5'TATTCGGCTATGACTGGGCA-3') y NPTII-R (5'-GCCAACGCTATGTCCTGAT-3'). Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.2%.

2.8. Diseño del gen sintético

Se diseñó el gen sintético para transformación nuclear el cual posee epítomos relevantes de *Bordetella pertussis* adicionales a los examinados en trabajos previos realizados en nuestro laboratorio, y una secuencia adyuvante derivada de *E. coli* enterotoxigénica (LT-B).

Se seleccionaron epítomos de las proteínas Fimbria 2 y Fimbria 3 mediante el uso de las herramientas de Raghava's group (<http://www.imtech.res.in/raghava/>) y el programa ANTHEPROT (<http://antheprot-pbil.ibcp.fr>) incluyendo además regiones de la subunidad S1 de la toxina pertúsica, hemaglutinina y pertactina previamente utilizado en construcciones generadas en nuestro laboratorio (Soria-Guerra, 2009 y Sánchez-Álvarez, 2010).

Los epítomos están unidos por espaciadores, los cuales son ricos en prolina para permitir su exposición apropiada. En el extremo 5' tiene la secuencia 5'TEV UTR

con la cual se pretende darle estabilidad al transcrito, así como un péptido señal para dirigir la proteína al retículo endoplásmico. En el extremo 3' se encuentra la secuencia KDEL con la finalidad de retener a la proteína recombinante en el retículo endoplásmico, 6 codones que codifica para una etiqueta de histidinas para identificar y/o purificar la proteína recombinante y también se añadió un sitio de proteasa (EK), el cual permite eliminar las histidinas una vez que la proteína ha sido purificada. A este gen sintético se le añadieron los sitios de restricción *Xba*I y *Sac*I para facilitar su clonación en el vector binario pBI121 (Figura 5).



Figura 5. Esquema del gen sintético para la transformación nuclear que codifica para una proteína de fusión que comprende regiones de epítomos relevantes de *Bordetella pertussis*.

TEV 5'UTR; SP: Péptido señal; FIM2: Fimbria 2; FIM3: Fimbria 3; TPS1: Epítomos subunidad S1 toxina pertúsica; FHA: Hemaglutinina; PRN: pertactina; LTB/ST: Subunidad B de la toxina termolábil-termoestable de *E. coli* enterotoxigénica; EK: Sitio de escisión de proteasa tipo enteroquinasa; His: Histidinas; KDEL: Señal de retención en el retículo endoplásmico; L: Espaciador.

3. RESULTADOS

3.1. Estandarización del método de esterilización de semilla

Las primeras etapas en el cultivo de semillas son las más importantes y de ellas depende el éxito de la germinación *in vitro*. Para este material es necesario realizar esterilización superficial y dado que no existe un protocolo que funcione eficientemente en todas las especies vegetales, se deben establecer las condiciones específicas. Debe existir un balance entre el porcentaje de reducción de patógenos presentes en la superficie de la semilla y el porcentaje de germinación, pues un protocolo que reduzca mucho el porcentaje de germinación no es útil.

Las semillas de alfalfa (*Medicago sativa* variedad CUF 101) utilizadas en este trabajo de tesis, son usadas comercialmente en la comarca Lagunera y San Luis Potosí. Se esterilizaron superficialmente por tres métodos distintos, los cuales se describieron ya en la sección de metodología. Después de 5 días en el medio de germinación se contabilizaron las semillas que germinaron, y se determinaron los índices de contaminación (Tabla 3).

Los resultados obtenidos mostraron que los Métodos 1 y 3 son los más eficientes, con ciertas diferencias en las frecuencias de germinación, probablemente resultado de las distintas concentraciones de hipoclorito de sodio empleadas. Al final el Método 1 se seleccionó como el mejor, ya que con él se obtuvo una reducción de contaminación por microorganismos del 97% y un porcentaje de germinación del 92%, por lo que fue utilizado en los ensayos subsecuentes.

3.2. Establecimiento de la dosis letal media en semilla de alfalfa para dos agentes de selección: kanamicina y espectinomicina

Con el fin de seleccionar en etapas posteriores líneas transgénicas estables fue necesario establecer la dosis letal media para semilla de los antibióticos de selección. Los porcentajes de germinación fueron calculados para cada concentración de antibiótico empleada (Tabla 4).

Tabla 3. Comparación de los porcentajes de eficiencias de esterilización superficial y los porcentajes de germinación de los métodos usados.

Método de esterilización	Eficiencia de esterilización (%)	Germinación (%)
Método 1	97	92
Método 2	13	69
Método 3	97	81

Tabla 4. Porcentajes de germinación para los diferentes agentes de selección utilizados.

Antibiótico	Concentración (mg L⁻¹)	% de germinación
Kanamicina	10	92
	20	92
	50	92
	75	90
	100	87
	200	82
	300	80
Espectinomicina	100	92
	200	89
	500	86
	550	86
	600	85
Control	-	93

En las condiciones experimentales descritas no se encontró efecto letal de los agentes de selección utilizados. Sin embargo, se observaron diferencias cualitativas en el desarrollo de las plántulas con respecto al grupo control en los tratamientos con una concentración $\geq 300 \text{ mg L}^{-1}$ de kanamicina (Figura 6) y $\geq 100 \text{ mg L}^{-1}$ de espectinomicina (Figura 7), por lo que se eligió utilizar los valores de concentración mencionados de esos dos agentes de selección para detectar a las transformantes.

3.3. Establecimiento de la dosis letal media en explante de hipocotilo de alfalfa para dos agentes de selección: kanamicina y espectinomicina

Antes de comenzar procesos de transformación es importante conocer las dosis de antibiótico necesarias que deberán añadirse en el medio de regeneración para cada tipo de explante inicial para poder seleccionar transformantes de no transformantes.

Las semillas se sometieron a un proceso de desinfección y germinación. Posteriormente se cortó el hipocotilo y se usó como explante para la regeneración en el medio Li con diferentes concentraciones de dos agentes de selección (kanamicina y espectinomicina).

Se observaron diferencias cualitativas en el proceso de regeneración con respecto al control para los tratamientos con kanamicina a partir de una concentración de 300 mg L^{-1} (Figura 8) y de espectinomicina a 100 mg L^{-1} (Figura 9). Por lo que se determinó que dichas concentraciones de antibiótico son las mínimas necesarias para poder discriminar eficientemente transformantes de no transformantes.



Figura 6. Desarrollo de plántulas de alfalfa germinadas en MS 0.5 X con distintas concentraciones de kanamicina.

(A) Control; (B) Km 10 mg L⁻¹; (C) Km 20 mg L⁻¹; (D) Km 50 mg L⁻¹; (E) Km 75 mg L⁻¹; (F) Km 100 mg L⁻¹; (G) Control; (H) Km 200 mg L⁻¹; (I) Km 300 mg L⁻¹. Las fotos fueron tomadas 1 (A-F) y 2 (G-I) semanas después de la germinación.

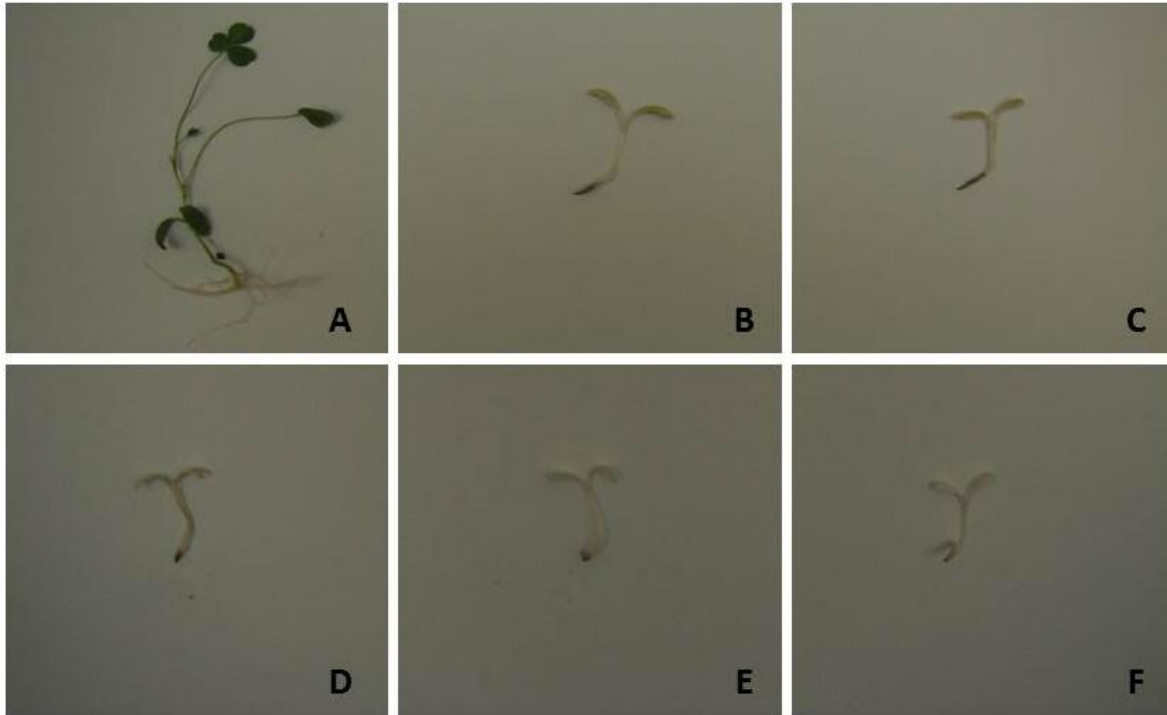


Figura 7. Desarrollo de plántulas de alfalfa germinadas en MS 0.5 X con distintas concentraciones de espectinomicina.

(A) Control; (B) Spc 100 mg L⁻¹; (C) Spc 200 mg L⁻¹; (D) Spc 500 mg L⁻¹; (E) Spc 550 mg L⁻¹; (F) Spc 600 mg L⁻¹ . Las fotos fueron tomadas 2 semanas después de la germinación.

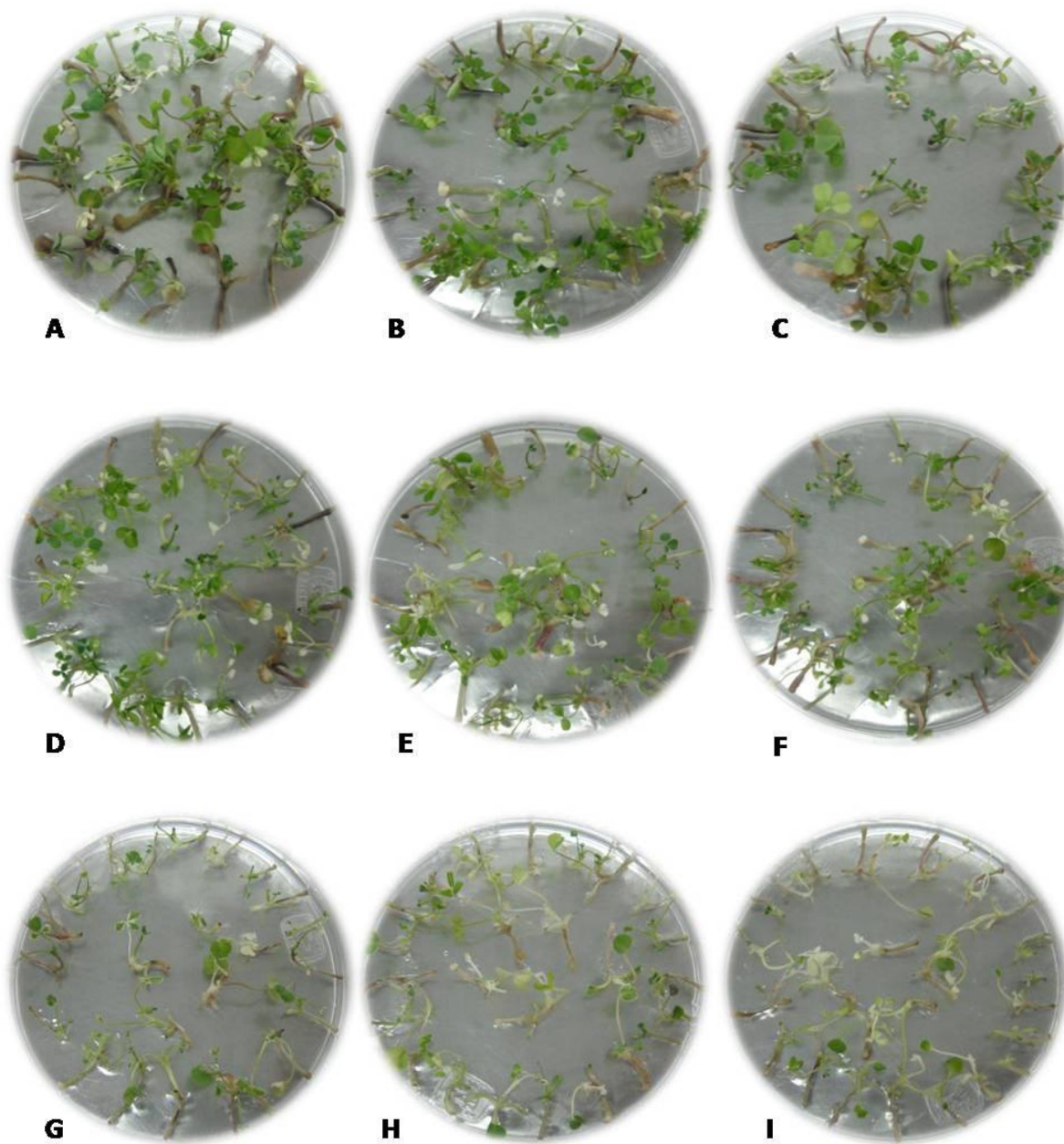


Figura 8. Regeneración de plántulas de alfalfa a partir de hipocotilos puestos en medio Li con diferentes concentraciones de kanamicina.

(A) Control; (B) Km 10 mg L⁻¹; (C) Km 30 mg L⁻¹; (D) Km 50 mg L⁻¹; (E) Km 70 mg L⁻¹; (F) Km 100 mg L⁻¹; (G) Km 200 mg L⁻¹; (H) Km 250 mg L⁻¹; (I) Km 300 mg L⁻¹. Las fotos fueron tomadas 3 semanas después de haber sido puestos los explantes de hipocotilos en el medio.

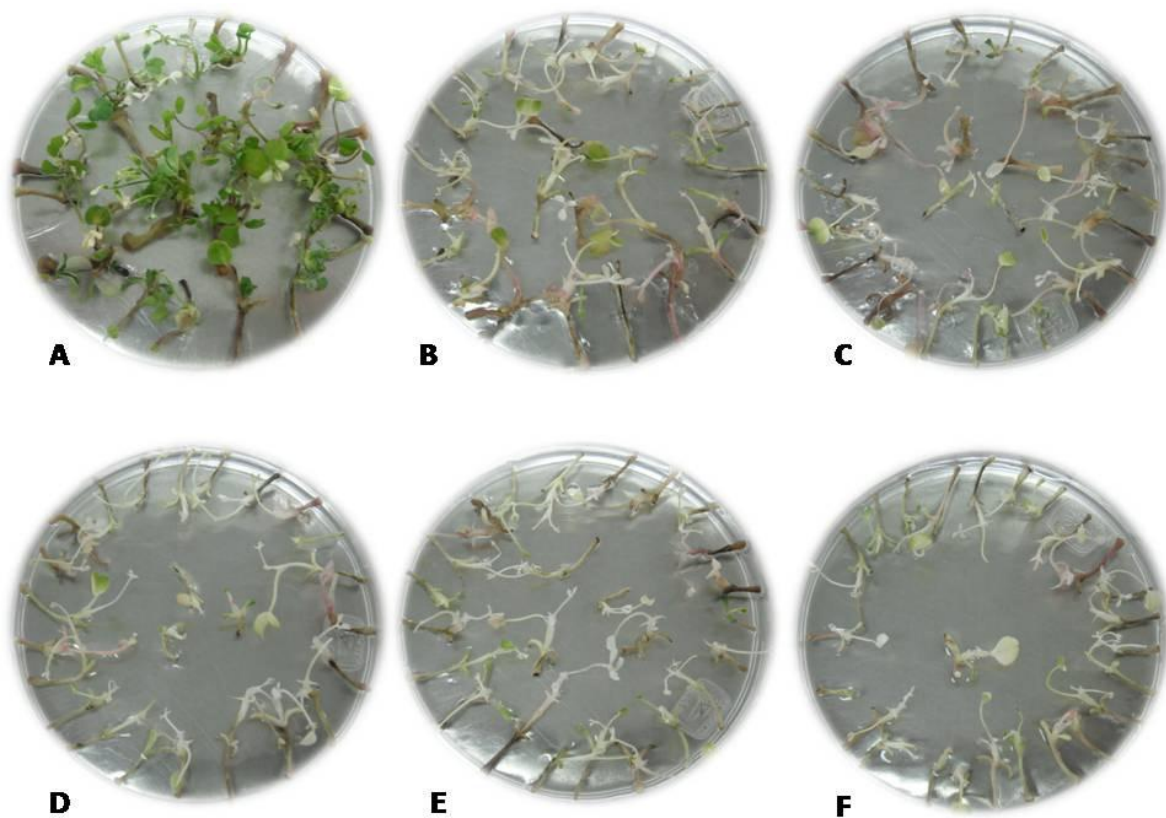


Figura 9. Regeneración de plántulas de alfalfa a partir de hipocótilos puestos en medio de Li con diferentes concentraciones de espectinomicina.

(A) Control; (B) Spc 100 mg L⁻¹; (C) Spc 200 mg L⁻¹; (D) Spc 300 mg L⁻¹; (E) Spc 500 mg L⁻¹; (F) Spc 700 mg L⁻¹ Las fotos fueron tomadas 3 semanas después de haber sido puestos los explantes de hipocótilos en el medio.

3.4. Desarrollo de un sistema de regeneración de alfalfa

Los sistemas de regeneración vegetal mediante cultivo de tejidos son necesarios para obtener un gran número de plantas a partir del material vegetal inicial, utilizando diferentes estrategias como embriogénesis somática, directa, indirecta u organogénesis, mediante el manejo de reguladores de crecimiento, y así hacer factible la introducción de trans- o cis-genes y la selección de un posible material transgénico. Sin embargo, estos sistemas suelen ser específicos de la variedad, por lo que en primera instancia es necesario conocer el explante y medio de cultivo apropiado que permite el establecimiento exitoso de plantas adultas sin alteraciones fenotípicas, que pueden ser transferidas a suelo para continuar su desarrollo y producir semillas.

Para la determinación de la fuente de explante adecuado se usaron: embriones maduros, hipocotilo, cotiledones y hojas. Se probó, además, el efecto de cinco diferentes medios de cultivo; monitoreando el desarrollo de los tejidos vegetales a lo largo de 16 semanas.

3.4.1. Ensayos de regeneración utilizando hipocotilo como explantes

Cuando se utilizaron explantes de hipocotilo, se observó durante la primera semana la formación de brotes adventicios de los ápices de los explantes puestos tanto en medio MS104 (Figura 10C), como en RM73 (Figura 10D) y medio Li (Figura 10F). Esos brotes mostraron un alto grado de desarrollo en las tres semanas subsecuentes. En contraste, en los medios LM1 (Figura 10B) y SH (Figura 10E) sólo se llegó a la inducción de callos.

Los brotes adventicios formados en el ápice de los hipocotilos fueron removidos del explante a la 4a semana y subcultivados en medio MS para enraizar (Figura 10G). Luego de varias semanas, cuando las plantas habían enraizado, fueron transferidas a macetas para su aclimatación (Figura 10H).

Por otra parte, al cabo de tres semanas en el medio de RM73 modificado (concentración de TDZ disminuida de 1.10 mg L^{-1} a 0.025 mg L^{-1}), se observó que el proceso de regeneración fue más favorable en comparación con el medio RM73 reportado (datos no mostrados).

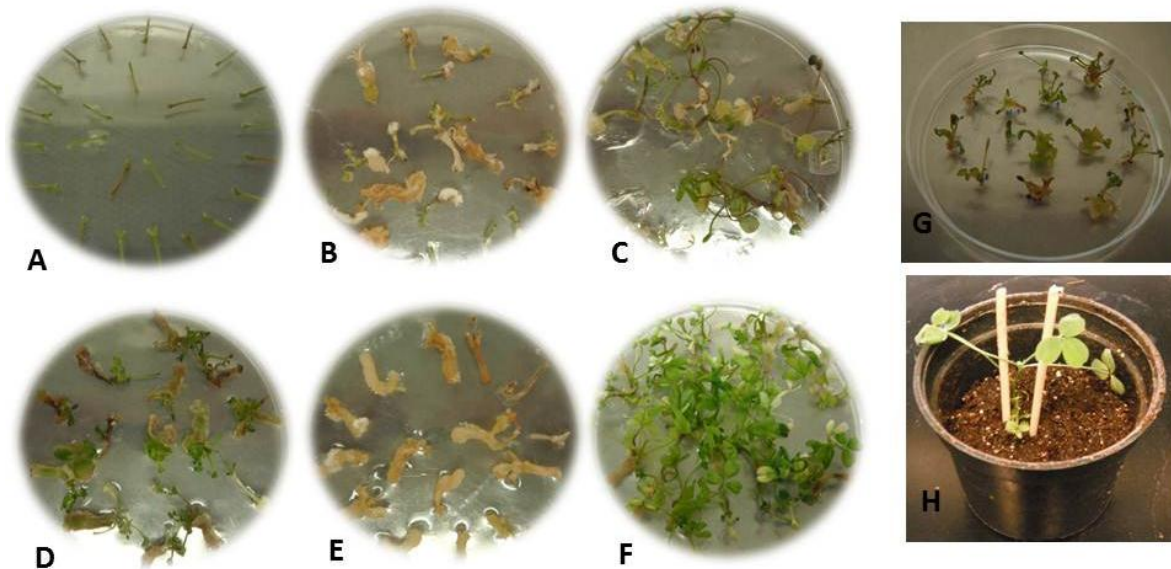


Figura 10. Diferentes estados de regeneración de alfalfa a partir de hipocotilos.

(A) Explante inicial; Medios de regeneración (B) LM1; (C) MS104; (D) RM73; (E) SH; (F) Li; (G) Brotes adventicios inducidos de los explantes de hipocotilos de alfalfa usando el medio RM73 y escindidos a la 4a semana; (H) Plántula enraizada y transferida a maceta. Las fotos muestran formación de callo y brotes adventicios en explantes de hipocotilos después de 3 semanas en los medios de regeneración seleccionados.

3.4.2. Ensayos de regeneración utilizando embriones maduros como explantes

El uso de embriones maduros como explantes (Figura 11), resultó ser el que mostró mejor respuesta de regeneración *in vitro*. En efecto, tres semanas después de haber insertado el explante en el medio Li emergieron las plántulas, que fueron escindidas y puestas en medio de enraizamiento. Con el uso de embriones maduros se obtuvieron las frecuencias más altas de regeneración (80%) con el potencial de crecer exitosamente en maceta en el menor tiempo posible.

3.4.3. Ensayos de regeneración utilizando cotiledones y hojas como explantes

Para el caso de los cotiledones, los medios LM1 (Figura 12B) y SH (Figura 12C) mostraron ser buenos inductores de callos, los cuales exhibieron una apariencia ligeramente amarillenta con granos blancos y una textura pegajosa. No fue lo mismo en el caso de los medios Li (Figura 12E) y RM73 (Figura 12F) en los que el explante solo aumentó de tamaño, o el medio MS104 (Figura 12D) en el que el tejido se oxidó rápidamente.

Fue a partir de la tercera semana, para el caso del explante de cotiledón en medio de regeneración LM1, y a la cuarta semana en medio de regeneración SH, que pudo observarse al estereoscopio la inducción de embriones en estado globular (Figura 13).

De acuerdo con lo reportado para los protocolos de regeneración mediante embriogénesis somática por Zhengyi Wei y col. (2011) utilizando el medio LM1 y por Zi-Hui-Liu y col., (2011) utilizando el medio SH, se hicieron los pases a los medios de cultivo correspondientes una vez lograda la formación de callos. Pero al final del proceso no se logró la maduración completa de los embriones a partir de los cuales se esperaba regenerar plántulas.

Con respecto a la evaluación de hojas como explantes (Figura 14), fue evidente que los resultados obtenidos son muy similares a los observados en la inducción de callo utilizando cotiledones como explantes.

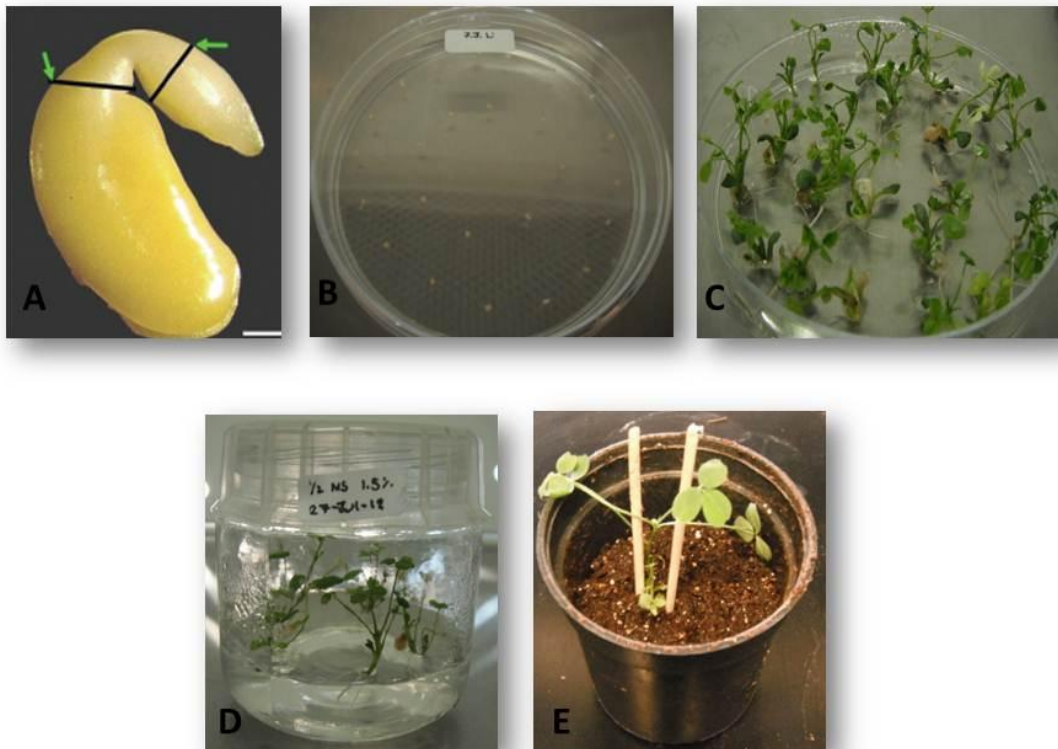


Figura 11. Diferentes estados de regeneración de alfalfa a partir de embriones maduros.

(A) Explante inicial escindido de embriones maduros desnudos de alfalfa (delimitado por las líneas negras); (B) Colocación de los explantes insertados verticalmente en el medio de regeneración de L₁; (C) Crecimiento de brotes adventicios morfológicamente normales después de 3 semanas; (D) Brotes enraizados en medio MS 0.5 X libre de hormonas; (E) Plantas aclimatadas.

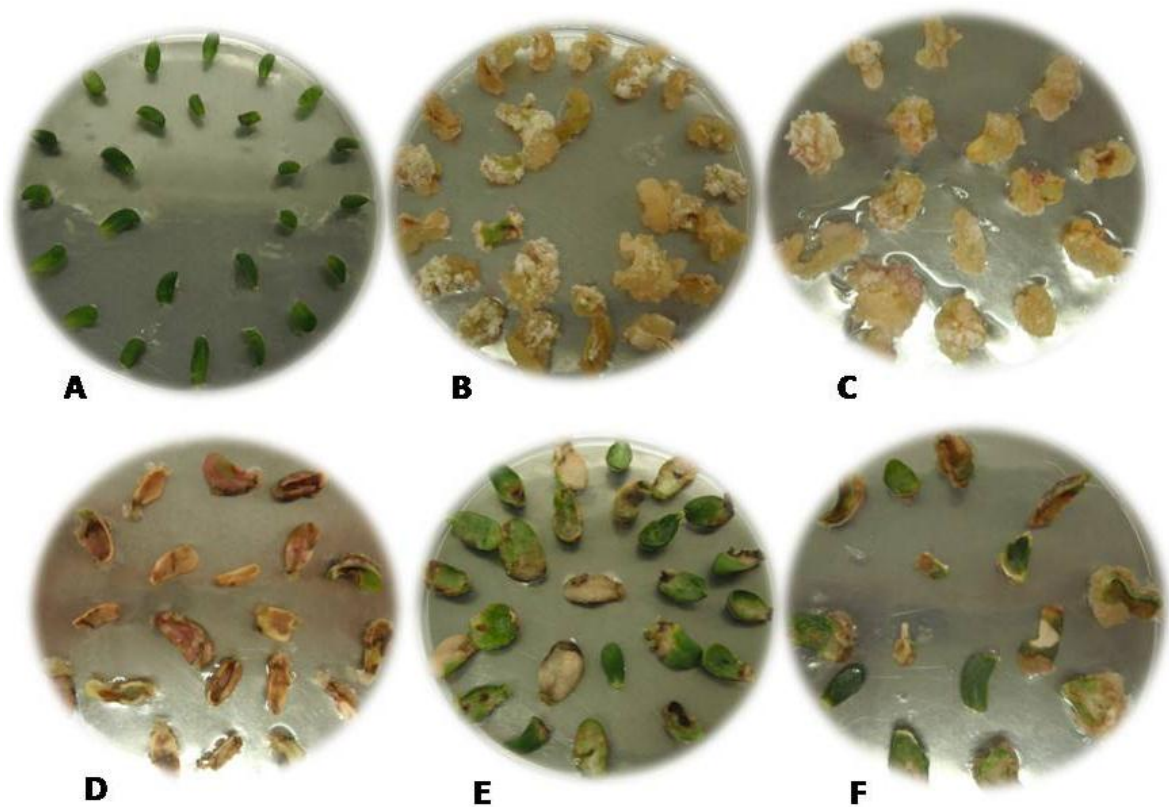


Figura 12. Comparación de los diferentes medios de regeneración y su efecto utilizando cotiledones como explantes.

(A) Explante inicial; Medios de regeneración (B) LM1; (C) SH; (D) MS104; (E) Li; (F) RM73. Las fotos muestran formación de callo a partir de explantes de cotiledones después de 3 semanas en los medios de regeneración seleccionados.

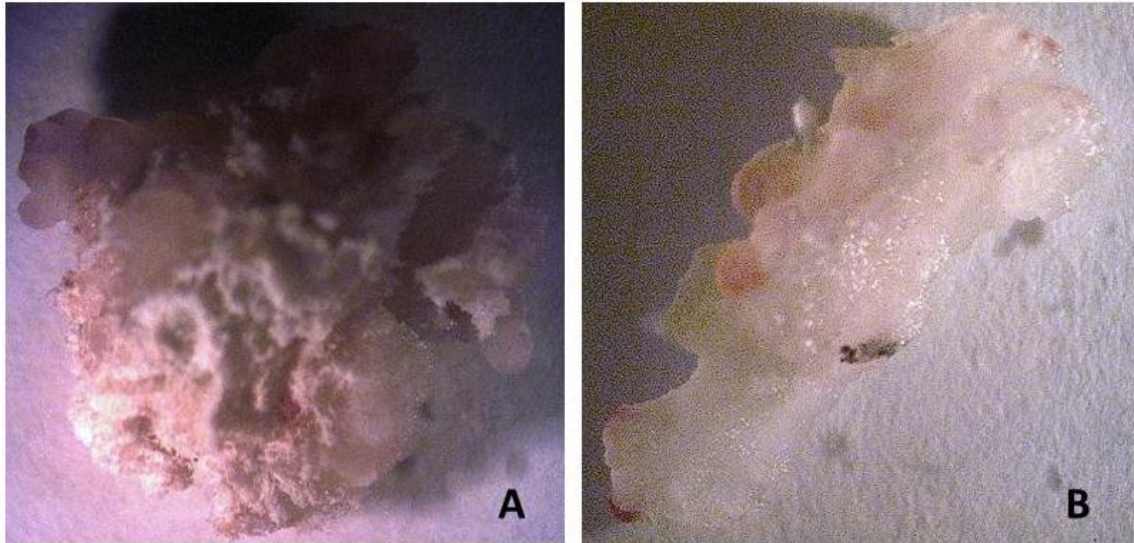


Figura 13. Embriones globulares emergiendo en la superficie del callo.

(A) Medio de regeneración LM1; (B) Medio de regeneración SH. Las fotos fueron tomadas al estereoscopio a la 4ta y 3ra semana de que el explante fue puesto en el medio de regeneración respectivo.

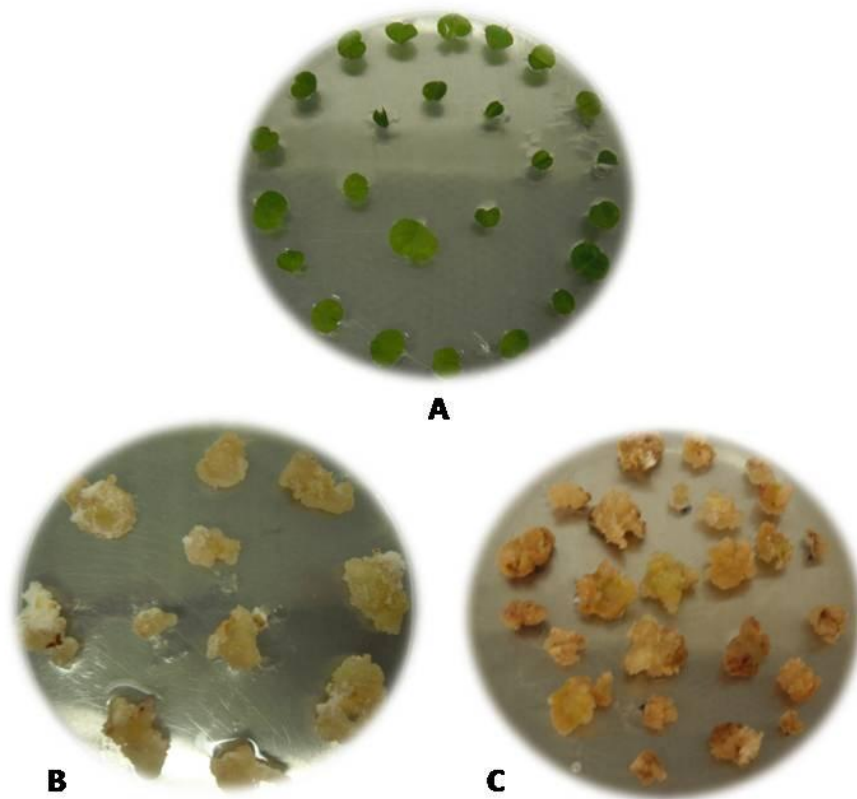


Figura 14. Comparación de los diferentes medios de regeneración y su efecto utilizando hojas como explantes.

(A) Explante inicial; Medios de regeneración (B) SH; (C) LM1. Las fotos muestran formación de callo a partir de explantes de hojas después de 3 semanas en los medios de regeneración seleccionados.

Los resultados descritos indican que los medios SH y LM1 pueden ser utilizados en la inducción de callo partiendo tanto de explantes cotiledonarios como de hojas, siendo más conveniente el uso de cotiledones como explantes ya que ofrecen dos ventajas principales por encima del uso de hojas: primero, porque pueden obtenerse en un periodo más corto (5 días vs. 10 días) y segundo, porque muestran menor grado de oxidación en el transcurso de las semanas. Para nuestra variedad de alfalfa CUF 101, es el explante más recomendado para obtención de plántula.

Fue posible regenerar alfalfa vía organogénesis directa a partir de embriones maduros, y vía organogénesis indirecta a partir de hipocotilos, hasta el establecimiento en invernadero de plantas adultas fenotípicamente normales. Sin embargo, no fue posible regenerar vía embriogénesis somática a partir de cotiledones y/o hojas, aún y cuando se llegó a observar el desarrollo de embriones globulares.

3.5. Estandarización de un sistema de transformación nuclear de alfalfa

Con base en los resultados observados para la regeneración de explantes de alfalfa, se decidió usar para la transformación a embriones maduros e hipocotilos, además de plántulas con base en el reporte de Weeks y col. en el 2008, probando cinco diferentes cepas de *Agrobacterium tumefaciens* y siguiendo los protocolos que se ilustran en las Figuras 2-4; haciendo variaciones en los tiempos y condiciones de infección así como en el periodo de co-cultivo. Al final se realizó el ensayo histoquímico de GUS a todas las plantas regeneradas para determinar así la eficiencia de transformación, la cual fue calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de eficiencia de transformación} = \frac{\text{No. total de plantas transgénicas}}{\text{No. de explantes inoculados}} \times 100$$

Los resultados muestran la más alta eficiencia de transformación de plántulas con la cepa C58/GV3101 (9%), de embriones con la cepa GV3101 (5%) y para hipocotilos con la cepa GV3010 (30%). Además puede verse que la cepa

LBA4404 no fue infectiva en ninguno de los casos (Tabla 5), lo cual es de resaltar ya que ésta es una cepa usada eficientemente en varios cultivos. La mejor expresión del gen reportero en una mayor área de tejido, se observó en los explantes de hojas de hipocotilo (Figura 17), seguidos de los embriones (Figura 16) y finalmente las plántulas (Figura 15).

3.6. Identificación de plantas transgénicas de alfalfa mediante análisis de reacción en cadena de la polimerasa

Para verificar la integración del gen reportero *gus A* y el gen marcador de selección *nptII* dentro del genoma de la planta, se realizó la extracción del ADN a partir de hojas de las plantas regeneradas en medio con agente de selección y fue usado como templado para la amplificación por PCR. Los fragmentos obtenidos por PCR fueron del tamaño esperado: 1.2 kb para *gus A* (Figura 18) y 600 pb para *nptII* (Figura 19).

Las plantas transgénicas produjeron los amplicones esperados mientras que las plantas control no mostraron ninguna señal en la amplificación por PCR.

Tabla 5. Efecto de diferentes cepas de *Agrobacterium tumefaciens* en la transformación de alfalfa

Cepa de <i>Agrobacterium</i>	Eficiencia de transformación (%)		
	Plántula	Embriones maduros	Hipocotilos
C58	6	4	26
C58/GV3101	9	1	ND
GV3101	4	5	ND
GV3010	3	3	30
LBA4404	0	0	ND

Nota: ND = No determinado

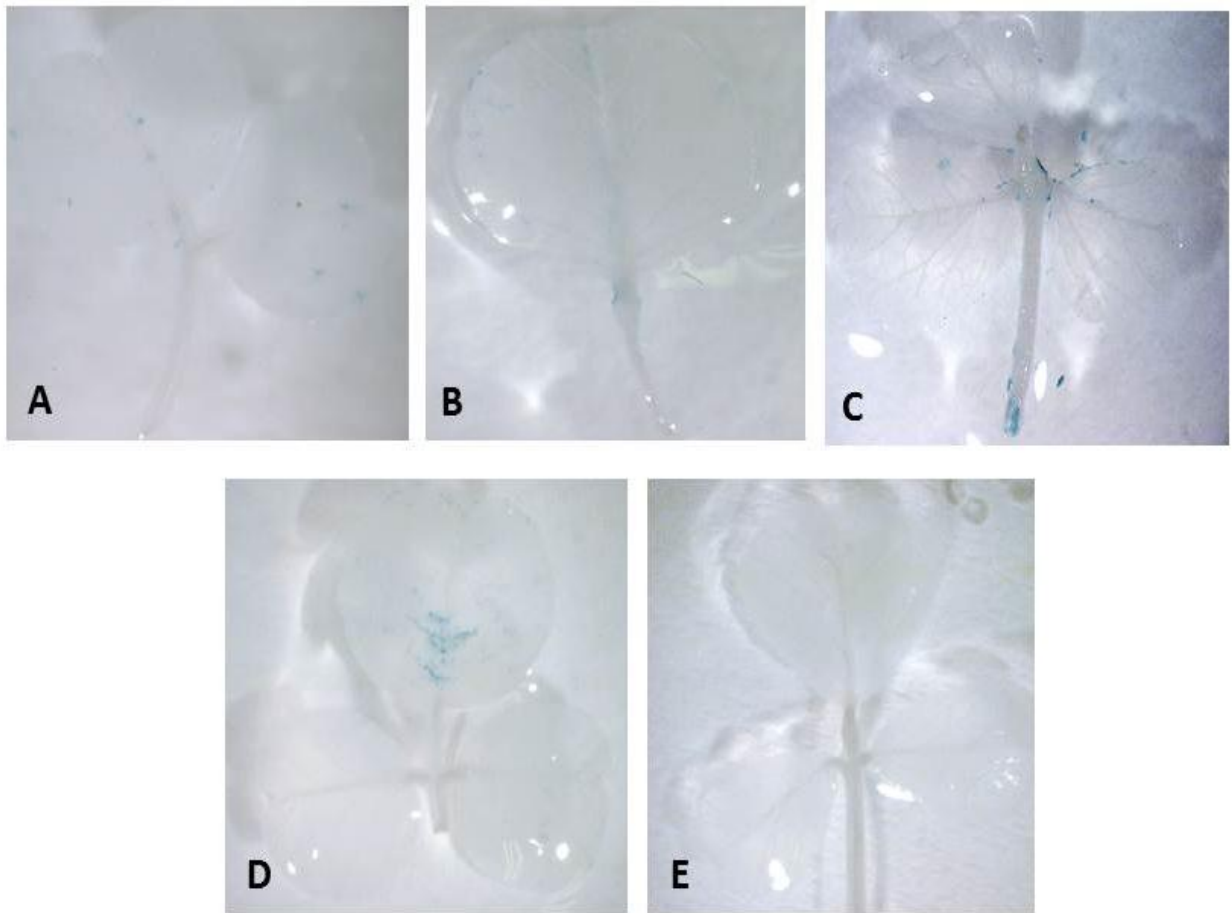


Figura 15. Ensayo histoquímico de la expresión de β -glucoronidasa (GUS) en hojas de plántulas transformadas con *Agrobacterium tumefaciens*.

(A) Cepa C58; (B) Cepa C58/GV3101; (C) Cepa GV3101; (D) Cepa GV3010; (E) Cepa LBA4404.

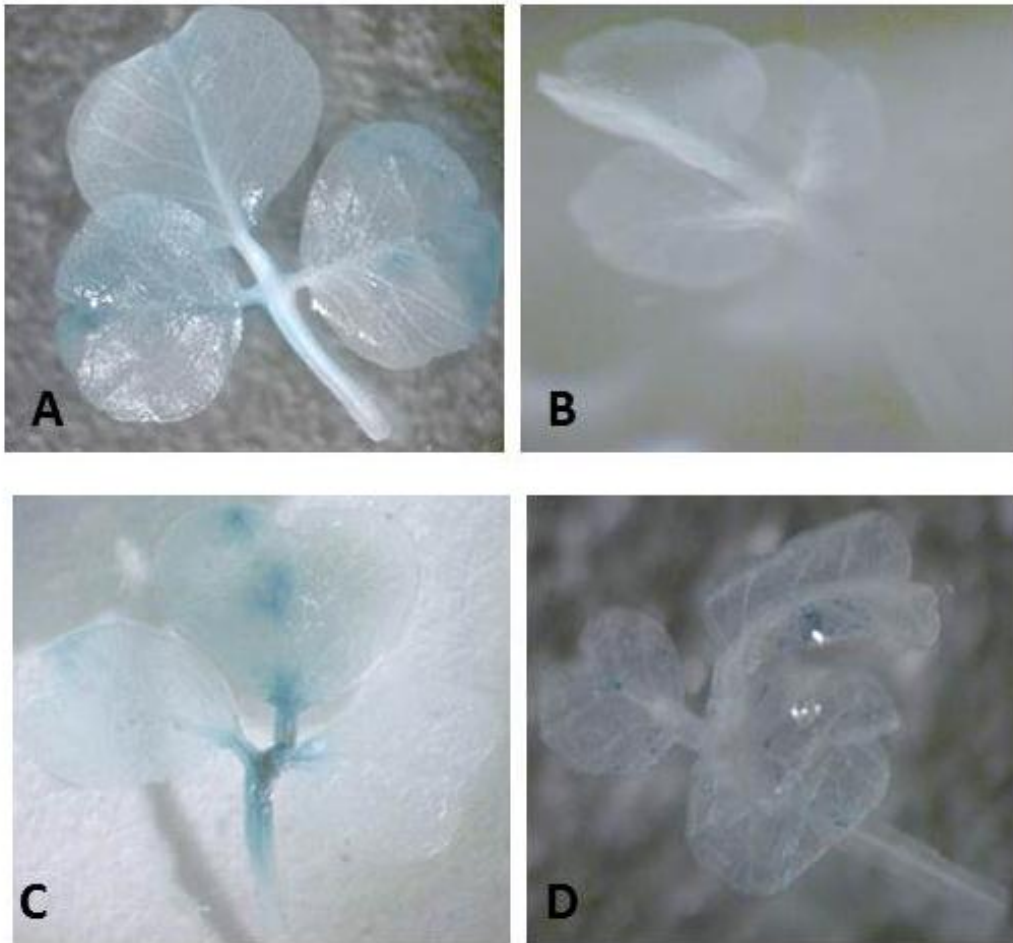


Figura 16. Ensayo histoquímico de la expresión de β -glucoronidasa (GUS) en hojas de embriones maduros transformadas con *Agrobacterium tumefaciens*.

(A) Cepa C58; (B) Cepa C58/GV3101; (C) Cepa GV3101; (E) Cepa GV3010.

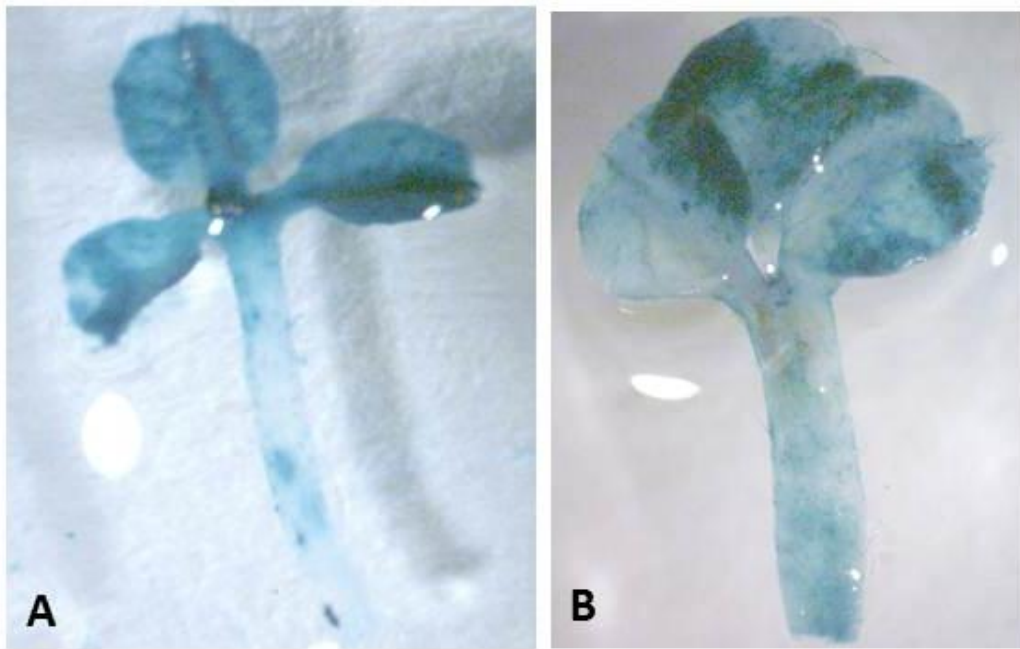


Figura 17. Ensayo histoquímico de la expresión de β -glucoronidasa (GUS) en hojas de hypocotilos transformadas con *Agrobacterium tumefaciens*.

(A) Cepa C58; (B) Cepa GV3010.

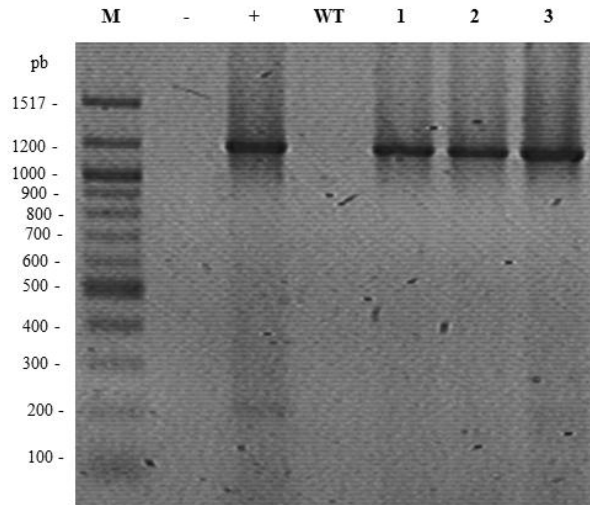


Figura 18. Análisis por PCR de las plantas de alfalfa transformadas con el plásmido pBI121 usando los oligonucleótidos gus F y gus R.

Un fragmento de 1.2 Kb fue amplificado en 3 líneas resistentes al antibiótico de selección. M: Marcador de peso molecular de 100 pb NEB[®]; WT: planta sin transformar como control negativo y agua como otro control negativo (carril -); vector pBI121 como control positivo (carril +).

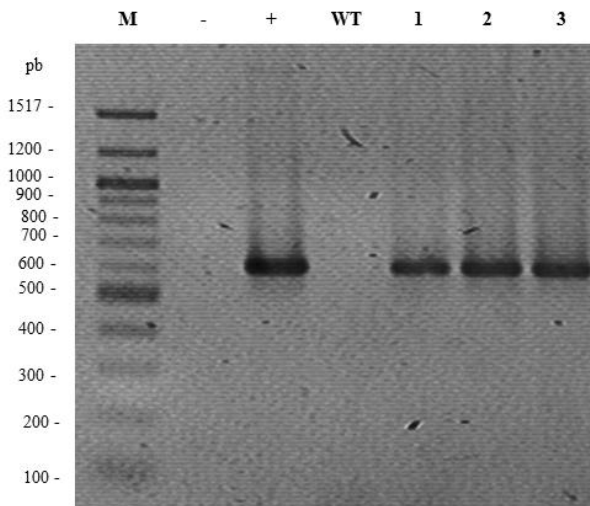


Figura 19. Análisis por PCR de las plantas de alfalfa transformadas con el plásmido pBI121 usando los oligonucleótidos nptII F y nptII R.

Un fragmento de 600 pb fue amplificado en 3 líneas resistentes al antibiótico de selección. M: Marcador de peso molecular de 100 pb NEB[®]; WT: planta sin transformar como control negativo y agua como otro control negativo (carril -); vector pBI121 como control positivo (carril +).

3.7. Construcción pBI121-BP para la transformación nuclear de alfalfa

Una vez que diseñamos el gen sintético previamente descrito, éste fue enviado a sintetizar a la empresa GenScript para optimizar el uso de codones en plantas de alfalfa. Dicho gen tiene una longitud de 2,001 pb y codifica para una proteína de 611 aa (Figura 20).

Posteriormente fue subclonado en el vector binario pBI121, obteniéndose finalmente la construcción pBI121-BP para la futura transformación nuclear de alfalfa.

A

```
GAATTCCTAGAAAAATAACAATCTCAACACACATATACAAAAAAAGCAATCTCAAGCAATCAAGATTCTA
CTTCTATTGCAGCAATTTAAATCATTTCTTTTAAAGCAAAAGCAATTTTCTGAAAAATTTCCACCATTTACGAAG
ATAGCC
ATGGGTTTGGTGTGTCTCTCAGCTTCCTTCATTCTCTTGTGTCTACTCTTCTCTTTCCCTGTATTAGT
CACTCATGCCGTGCAATTGAAGATCCTTCTAAAGCTAACGGAGATGAGCCTGGACCACTACATATGCTACTAAT
CCTGGAGCAAAAGCAAGCTGATCCAGAGGTTCAAACCTGGTGGTACTTCAAGAACAGTTACCATGAGGGCATCATAT
GTGAAAAAGAAATGGTGGACCTGGTCCAGGATCAAAAAATGCTTTGAGAAAAGATGGAGATACCACTAACTACGAT
ACTGGAGATCTTATTGCATATAAGCAACATACAACGCTAGTGGTACCGATAAAAACTGGAAAGGTTACAAACGGT
AGTAAATCTTACGTGAAAAAGCAAGGAAGGTCCTGGTCTGGAGATGATCCTCCAGCTACTGTTTATAGATAC
GATTACAGTCTCCAGAGGATGGACCTGGTCCAGGATTGACAGCTCTTGATAAATCGTGCAGGACTTAGTCTGCT
ACTTGGAACTTCCAATCTACATATGAACCTTTGGATTACCTTTGGATCAGAACAGATACGAATACATTTGGGGA
TTGTACCCAACTTACACAGAGTGGAGTGTAAATACCTTAAAAACTTGGATCTTGGTATCAAGCAAAAGCCTGCT
CCAACCTGCACCTCCAATGCTTAAAGCACCAAGATGGATCTTAGGGGTACATACTTGGAAATCAGCTGAGGGTGGT
AAGATTTTGGAGAGTATAAGAAGCTTCAAGGAGAAATACGAGAAAGCTAAGATGGCAGTTTCAGGCTGTGGAAGCA
TATGGAGAGGCTACTAGAAGGTTACGATCAATTGGGTGAGAGATACGAAAAAGCACTTGGTGGTATGGATGCT
GAAACAAAGGAGGTGGATGGAATTATTCAAGAATTGCTGCAGATTTGAGAGTCTGGACCAGGTAATACCCCTT
TTGCTTTGTTCAAATCCTTTGGGTTCTGCTGCAACCTTCACTCTTGCAAAACAAGATGGAAAGGTGGATATTGGT
ACATATCGTTACAGATTGGCTGCAAAATGGTAACGGTCAATGGTCACTTGTGGAGCAAAAGCTCCTCCAGCTCCT
AAGCCAGCACCTCAGOCAGGTCCTCAACCTCCACAGCCTCCACAAOCACAGCCTGAAGCACCAAGCTCCTCAACCT
CCAGCTGGAAGAGAGCTTTCTGCTGCAGCTAATGCAGCTGGACCAAGGTCCTGGTGGAGCAGCTTCTTACATCTC
GAATACGTTGATACTTACGGAGATAATGCAAGGCTGGTCTGGTCTGGTATGAATAAGGTTAAGTTCTACGCTG
TTGTTACAGCTTTGCTTAGTTCTCTTTGTGCTCATGGAGCACCTCAATCAATTACCGAATTGTGCAGTGGAGTAC
AGAAACACACAGATCTATACCATTAAAGATAAGATCTTTACATACAGAAAATATGGCAGGAAAAAGAGAGATG
GTTATTATTACTTTTAAATCAGGAGCTACCTTCCAAGTTGAAGTGCAGGTTCTCAACATATTGATTACAGAAA
AAGGCAATTGAACGTATGAAAGATACCTTGAAGATTGCTTATCTTACAGAGACCAAGATTGATAAGTTGTGTGTT
TGGAAACAAGACAACCTAATAGTATTGCAGCTATTCTATGAAAAACCAAGATCCTAGGGTCCATCAAGTAAT
TCTTCAAATCTGTTGGAGCTTTGTTGCAATCCAGCTTGTACTGGTGTACGTTAGGCCTGATGATGATGAT
AAGCACCAACCACCACCATAAAGATGAACCT
TAGTAGGAGCTC
```

B

```
MGFVLFPSQLPSFLLVSTLLLFLVISHSCRAIEDPSKANGDEPGPTTYATNPGANEADPEV
QTGQTSRTVIMRASVYVKKNGGPGPGSKNALRNDGDTTNYDTGDLIAYKQTYNASGTDKTG
KVTNGSKSYVKKPKGPGPGDDPPATVYRYDSRPPEDGPGPGLTALDNRAGLSPATWNPQ
STYELLDYLLDQNRYEYINGLYPTYTEWSVNTLKNLDLGYQAKPAPTAPPMPKAPELDRLR
GHTLESABGRKIPGEYKKLQGEYEKAKMAVQAVEAYGEATRRVHDQLGQRYGKALGGMDA
ETKEVDGIIQEFAADLRGPGPGNTLLLVQTPLGSAATPTLANKDGKVDIGTYRRLAANG
NGQWLSLVGAKAPPAPKPAQPPQPPQPPQPEAPAPQPPAGRELSAAANAAGPGPGGA
ASSYFEYVDTYGDNARPGPGPMNKVKFYVLPFTALLSSLCAHGAPQSI TELCSEYRNTQI
YTINDKILSYTESMAGKREMVIIITFKSGATPQVEVPGSQHIDSQKKAIERMKDTLRIAYL
TETKIDKLCVWNNKTPNSIAAISMENHDPVPSNSNSNYCCELCNPFACCTGCVYRPFDDDD
KHHHHHHKDEL
```

Figura 20. Secuencia del gen sintético BP optimizado para su expresión en alfalfa.

(A) Secuencia de nucleótidos del gen BP optimizada para su expresión en plantas de alfalfa. Longitud del gen: 2,001 pb. (B) Secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el gen sintético.

4. DISCUSIÓN

Estudios previos han revelado que la inmunización adquirida tras la infección por *Bordetella pertussis*, así como la obtenida por la vacunación, no suele exceder los 10 años. Esta ha sido una de las principales causas del resurgimiento de la enfermedad y la susceptibilidad de los adolescentes, siendo estos últimos y los adultos infectados la principal fuente de la transmisión de la tos ferina a los niños menores de 6 meses de edad (Grupo de expertos en vacunación contra tos ferina, 2011; Tomovici y col., 2012) Una de las estrategias adoptadas por varios países ha sido el cambio en el esquema de vacunación, pero ello ha conllevado a una mayor inversión en salud pública (Bechini y col., 2012), lo que ha llevado a la idea de que sería importante invertir esfuerzos en el desarrollo de una nueva vacuna contra la tos ferina que sea inmunológicamente más eficiente y cuyo costo de producción por unidad sea mucho menor que el de las actuales vacunas acelulares..

En este sentido las plantas, como sistema de producción, ofrecen una alternativa real ya que pueden reducir el costo de producción hasta en 2 órdenes de magnitud respecto a sistemas convencionales (Daniell y col., 2012). Por ello, en este trabajo se diseñó un gen sintético que codifica para una proteína con uso potencial como vacuna en contra de la tos ferina, la cual incluye regiones antigénicas que no se encuentran en las vacunas acelulares actuales, y con el objetivo de que al ser suministrada se obtenga una inmunoprotección más duradera contra *B. pertussis*. A fin de producir esta vacuna sintética de modo altamente eficiente se procedió a optimizar un sistema de regeneración y de transformación para su expresión en una variedad cultivable de alfalfa, ya que esta especie vegetal tiene un gran potencial para la producción de biofármacos por su alto contenido de proteína y su rendimiento por hectárea, por lo que empresas como MedicaGo en Canadá lo están empleando.

Como un primer paso para la optimización del sistema de expresión, se determinaron las mejores condiciones para la esterilización superficial de las semillas. Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con una solución

de Extran® seguido de un tratamiento con hipoclorito de sodio a la menor concentración evaluada (10%) condujo a la mayor eficiencia de esterilización (97%) y de germinación (92%).

En este estudio se utilizó una variedad cultivable de alfalfa (*Medicago sativa* var. CUF 101), la cual está recubierta de un material adherente que contiene bacterias simbióticas de *Rhizobium meliloti*. Por ello, es difícil obtener una mayor eficiencia de esterilización. Con el tratamiento propuesto, es posible esterilizar el 97% de las semillas tratadas, por lo cual se eligió este método para los estudios posteriores. Además, se obtuvo una alta tasa de germinación, probablemente debido al origen comercial de la semilla.

Para la producción de plantas transgénicas es necesario tener un sistema de regeneración eficiente. El sistema de regeneración más eficiente es diferente para cada especie y variedad. Por ello se decidió optimizar la regeneración de una variedad comercial de alfalfa (CUF 101). Se evaluó el uso de diferentes tejidos como explante inicial y de diferentes medios de cultivo para la regeneración de la planta.

En el presente trabajo encontramos que el sistema de regeneración más eficiente para la variedad de alfalfa utilizada, consiste en el uso de embriones maduros o hipocotilos como explante y el uso de medio Li para ambos casos.

Zhang y col. (2010), evaluaron la fuente de explante (cotiledones, nodos cotiledonares e hipocotilos) para la regeneración de plantas de 4 variedades de alfalfa. Ellos encontraron que para las 4 variedades estudiadas, los hipocotilos son la fuente de explante más adecuada para la regeneración de plantas de alfalfa, debido a una mayor frecuencia en la formación de callos y mayor eficiencia de regeneración con respecto a las otras fuentes de explante. Estos resultados son similares a los obtenidos en el presente estudio; sin embargo, los resultados de Zhang y col. (2010) fueron obtenidos vía embriogénesis somática.

Ding y col. (2003), aplicaron un sistema de regeneración vía organogénesis directa a 16 variedades alfalfa, incluyendo la variedad CUF 101. Ellos obtuvieron una frecuencia de regeneración de 35-85% para las 16 variedades usando hipocotilos

como explante y el medio de regeneración RM73 (frecuencia de regeneración \approx 55% para la variedad CUF 101).

Por otra parte, en este estudio encontramos una mayor frecuencia de regeneración cuando se utilizó el medio Li (80%). Este medio fue formulado para optimizar la regeneración de plantas de alfalfa a partir de nodos cotiledonares vía organogénesis directa. Con ellos se obtuvo una frecuencia de regeneración de 63.8 a 82.5% para ocho variedades de alfalfa, usando este protocolo.

Al igual que la fuente de explante es determinante durante el proceso de regeneración, la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* es el factor clave durante la transformación nuclear de la planta. En el presente trabajo decidimos evaluar la capacidad infectiva de 5 cepas de *Agrobacterium tumefaciens* sobre tres tipos de explantes de alfalfa.

De las 5 cepas evaluadas 4 fueron capaces de transformar los tres tipos de explantes, a excepción de la cepa LBA4404 cuya capacidad de transformación no fue demostrada para esta variedad específica de alfalfa. Los niveles de expresión del gen reportero GUS fueron variables en cada uno de los explantes transformados. Los altos niveles de expresión observados en las hojas de los hipocotilos analizados definen a este explante como el más apropiado para llevar a cabo la transformación nuclear de alfalfa CUF101, utilizando la cepa GV3010, con la que los porcentajes de transformación fueron del 30%. De acuerdo a lo reportado en la literatura las eficiencias de transformación para alfalfa suelen oscilar entre 1-15% (Wei y col., 2011; Weeks y col., 2008; Ninkovic y col., 2004, Sobhanian y col., 2012) y dichos valores sólo suelen ser superiores para genotipos específicos altamente regenerable con poco valor comercial (Austin y col., 1995; Samac y Austin-Phillips, 2006).

CUF101 es la variedad comercial que fue transformada en este trabajo y aunque hasta el momento las plantas se encuentran en la fase de enraizamiento y se han tenido algunos inconvenientes, los altos índices de transformación observados hacen prometedor el protocolo propuesto en éste trabajo para transformar esta variedad.

Éste trabajo contribuye a los esfuerzos para hacer uso biotecnológico de la alfalfa como un sistema de expresión de proteínas recombinantes de interés farmacológico.

5. REFERENCIAS

Austin S, Bingham ET, Mathews DE, Shahan MN, Will J, Burgess RR (1995) Production and field performance of transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) expressing alpha-amylase and manganese-dependent lignin peroxidase. *Euphytica* 85:381-393. doi: 10.1007/978-94-011-0357-2_47.

Bechini A, Tiscione E, Boccalini S, Levi M, Bonanni P (2012) Acellular pertussis vaccine use in risk groups (adolescents, pregnant women, newborns and health care workers): A review of evidences and recommendations. *Vaccine* 30:5179-5190. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.06.005.

Cangelosi GA, Best EA, Martinetti G y Nestei EW (1991). Genetic analysis of *Agrobacterium*. *Meth Enzymol* 204: 384-397.

Daniell H, Streatfield SJ, Wycoff K (2001) Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends Plant Sci* 6:219-226. doi:10.1016/S1360-1385(01)01922-7.

D'Aoust MA, Lerouge P, Busse U, Bilodeau P, Trépanier S, Gomord V, Faye L, Vézina LP (2004) Efficient and reliable production of pharmaceuticals in alfalfa. En: Fischer R, Schillberg S (Eds) *Molecular Farming*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, pp 1-12.

Ding YL, Aldao-Humble A, Ludlowa E, Drayton M, Lin YH, Nagel J, Dupal M, Zhaoa Q, Pallaghy C, Kalla R, Emmerling M, Spangenberg G (2003) Efficient plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation in *Medicago* and *Trifolium* species. *Plant Sci* 165:1419-1427. doi: 10.1016/j.plantsci.2003.08.013.

Faye L, Gomord V (2010) Success stories in molecular farming-a brief overview. *Plant Biotechnol J* 8:525-528. doi: 10.1111/j.1467-7652.2010.00521.x

Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50:151-158.

Grupo de expertos en vacunación contra tos ferina (2011) Consenso para el diagnóstico clínico y microbiológico y la prevención de la infección por *Bordetella pertussis*. *Salud Pública Méx* 53:57-65.

Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J 6:3901-3907.

Li JJ, Wu YM, Wang T, Liu JX (2009) *In vitro* direct organogenesis and regeneration of *Medicago sativa*. Biol Plant 53:325-328. doi: 10.1007/s10535-009-0059-2.

Liu ZH, Zhang HM, Li GL, Guo XL, Chen SY, Liu GB, Zhang YM (2011) Enhancement of salt tolerance in alfalfa transformed with the gene encoding for betaine aldehyde dehydrogenase. Euphytica 178:363-372. doi: 10.1007/s10681-010-0316-7.

Moreno-Pérez D, Baquero-Artigao F, Gonzalo de Liria CR, Cilleruelo-Ortega MJ (2011) Tos ferina. En: Protocolos diagnóstico-terapéuticos de la AEP: Infectología pediátrica, 3ª ed. ERGON, pp 95-102.

Morón-Duarte LS, Moreno J, Gracia M, Realpe ME, Peña-Daza GL (2008) Estado de portadores de *Bordetella pertussis* en adolescentes de 12 a 19 años en el Departamento de Tolima, Colombia, 2007. Inv Andina 10:7-26.

Murashige T y Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473-497.

Ninkovic S, Miljus-Dukic J, Vinterhalter B, Neskovic M (2004) Improved transformation of alfalfa somatic embryos using a superbinary vector. Acta Biol Cracov Bot 46: 139–143.

Pileggi M, Mielniczki Pereira AA, dos Santos Silva J, Veiga Pileggi SA, S. Verma DP (2001) An Improved Method for Transformation of Lettuce by *Agrobacterium tumefaciens* with a Gene that Confers Freezing Resistance. Braz Arch Biol Technol 44:191-196.

Sánchez-Álvarez K (2010) Producción de antígenos inmunogénicos en plantas: un enfoque para mejorar la vacuna contra la tos ferina. Tesis de maestría, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.

Samac DA, Austin-Phillips S (2006) Alfalfa (*Medicago sativa* L.). Methods Mol Biol 343:301-312. doi: 10.1385/1-59745-130-4:301.

Sambrook J, Fritsch EF, y Maniatis T (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed New York: Cold Spring Harbor Laboratory.

Shinmyo A, Kato K (2010) Molecular farming: production of drugs and vaccines in higher plants. *J Antibiot* 63:431-433. doi: 10.1038/ja.2010.63.

SIAP (2011). Cierre de la producción agrícola por cultivo Secretaría de Agricultura Ganadería y Recursos Pecuarios. <http://www.siap.gob.mx/index.php?>. Consultada el 20 de Junio de 2012.

Soria-Guerra RE (2007) Expresión en tomate de un polipéptido antigénico con epítomos de 3 exotoxinas bacterianas (DPT) codificado por un gen sintético. Tesis de doctorado, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.

Sobhanian N, Habashy AA, Farshad-Far E, Tohid-Far M (2012) Optimizing regeneration and reporter gene (*gus*) transformation of alfalfa (*Medicago sativa*). *Ann of Biol Res* 3:2419-2427.

Tomovici A, Barreto L, Zickler P, Meekison W, Noya F, Voloshen T, Lavigne P (2012) Humoral immunity 10 years after booster immunization with an adolescent and adult formulation combined tetanus, diphtheria, and 5-component acellular pertussis vaccine. *Vaccine* 30:2647-2653. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.02.013.

Vázquez-Vázquez C, García-Hernández JL, Salazar-Sosa E, Murillo-Amador B, Orona-Castillo I, Zúñiga-Tarango R, Rueda-Puente EO, Preciado-Rangel P (2010) Rendimiento y valor nutritivo de forraje de alfalfa (*Medicago sativa* L.) con diferentes dosis de estiércol bovino. *Rev Mex Cienc Pecu* 1:363-372.

Wei Z, Liu Y, Lin C, Wang Y, Cai Q, Dong Y, Xing S (2011) Transformation of alfalfa chloroplasts and expression of green fluorescent protein in a forage crop. *Biotechnol Lett* 33:2487-2494. doi: 10.1007/s10529-011-0709-2.

Weeks JT, Ye J, Rommens CM (2008) Development of an in planta method for transformation of alfalfa (*Medicago sativa*). *Transgenic Res* 17:587-597. doi: 10.1007/s11248-007-9132-9.

WHO (2010) Pertussis vaccines: WHO position paper. *Weekly epidemiological record* 40:385-400.

Zhang H, Huang QM, Su J (2010). Development of alfalfa (*Medicago sativa* L.) regeneration system and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. *Agric Sci China* 9:170-178. doi: 10.1016/S1671-2927(09)60081-X.

ANEXO A. TÉCNICAS EMPLEADAS

Preparación de células químicamente competentes y transformación de *E. coli* por choque térmico.

Se prepararon células competentes a partir de un cultivo de *E. coli* Top 10 F' de 24 h, crecido en caldo LB a 37 °C. De este inóculo se tomaron 250 µL y se añadieron a 25 mL de caldo LB, se incubó por 90 min a 37 °C y agitación de 150 rpm. El cultivo se enfrió sobre hielo y se centrifugó 35 segundos a 12,000 rpm. La pastilla se lavó con 4 mL de cloruro de calcio 0.1M y glicerol al 15%, y se volvió a empacar por centrifugación. Finalmente las células se resuspendieron en 630 µL de cloruro de calcio 0.1 M + 15% glicerol y se almacenaron a -70 °C en alícuotas de 30 µL. Para realizar la transformación, las células competentes se descongelaron sobre hielo y se añadieron entre 10-100 ng del ADN de interés, 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 µL del cultivo se inocularon en agar LB con 100 mg L⁻¹ de kanamicina o ampicilina, según el caso.

Preparación de células electrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens*.

Se prepararon de acuerdo al protocolo de Cangelosi y col (1991). La cepa de *Agrobacterium* se inoculó en medio de cultivo YM por dos días, de este cultivo ($DO_{600nm} = 0.04-0.08$), se tomaron 5 mL y se les agregó medio YM hasta 100 mL y se incubó a 28 °C hasta obtener una densidad óptica de 0.5 (aproximadamente 4 h), se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la bacteria en 40 mL de buffer HEPES 1mM pH 7, se centrifugó nuevamente a 10,000 rpm por 10 minutos a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la bacteria en 40 mL de buffer HEPES 1mM pH 7 y 10% de glicerol. Se centrifugó y se resuspendió la bacteria en 2 mL de buffer HEPES 1 mM pH 7 y 10% de glicerol y finalmente se centrifugó a 12,000 rpm por 5 minutos a 4 °C, se

resuspendió la pastilla en 400µL de buffer HEPES y 10% de glicerol, se tomaron alícuotas de 50µL y se almacenaron a -80 °C.

Extracción de ADN plasmídico.

Se basó en el método de lisis alcalina (Sambrook y col., 1989). Se tomaron 1.5 mL de cultivo bacteriano crecido en el medio de selección apropiado durante 16 horas y se centrifugó a 13,000 rpm por 2 minutos, se eliminó parte del sobrenadante, se resuspendió la pastilla con vórtex y se añadió 150 µL de la solución I de Birnboim (BD) (Tris 0.25 M, pH 8, EDTA 10 mM, glucosa 10 mM), se mezcló en vórtex y se agregaron 300 µL de la solución II de BD (NaOH 0.2M, SDS 1%) recién preparada, se agitó por inversión 5 veces, se añadieron 225 µL de la solución III de BD (acetato de sodio 3M, pH 4.8), se mezcló por inversión y se colocaron los tubos por 5 minutos en hielo, se centrifugó a 13,000 rpm por 10 minutos, se recuperó la fase acuosa; se agregó un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló suavemente y se centrifugó 5 minutos a 10,000 rpm; se recuperó el sobrenadante y se adicionó un décimo de volumen de acetato de sodio 3 M, pH 7 y un volumen de isopropanol frío, se mezcló por inversión, se precipitó a -20 °C por 30 minutos, se centrifugó a 13,000 rpm por 10 minutos a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 500 µL de etanol al 70%. Posteriormente se centrifugó por 2 minutos a 13,000 rpm, se agregó RNAsa (10 mg ml⁻¹) y se incubó a 37 °C por una hora, nuevamente se agregó fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y se precipitó el ADN con acetato de sodio e isopropanol frío, se lavó la pastilla con etanol al 70%, se centrifugó 5 minutos a 12,000 rpm y se secó la pastilla a 50-60 °C; se resuspendió en 30 µL de agua milli Q.

ANEXO B. SOLUCIONES

Preparación de soluciones

TAE 50X

Para preparar un litro se mezclaron 98.8 g de Tris base, 22.84 mL de ácido acético, 40 mL de EDTA 0.5 M pH 8, se aforó con agua destilada, se esterilizó y se almacenó a temperatura ambiente.

Agarosa 1%

Para preparar 100 mL se añadió 1 gramo de agarosa a 100 ml de TAE 1X, se calentó hasta disolver en el microondas y se almacenó a temperatura ambiente.

Preparación de antibióticos

Kanamicina (Stock de 100 mg L⁻¹)

Se disolvieron 10 gramos de sulfato de kanamicina en agua desionizada. Se aforó a 100 mL, se esterilizó por filtración (filtro Miller-GP, 0.2 µm) y se almacenó a -20 °C.

Carbenicilina (Stock de 100 mg L⁻¹)

Se disolvieron 10 gramos de carbenicilina en agua desionizada. Se aforó a 100 mL, se esterilizó por filtración (filtro Miller-GP, 0.2 µm) y se almacenó a -20 °C.

Ampicilina (Stock de 100 mg mL⁻¹)

Se disolvieron 10 gramos de ampicilina en agua desionizada. Se aforó a 100 mL, se esterilizó por filtración (filtro Miller-GP, 0.2 µm) y se almacenó a -20 °C.

Espectinomicina (Stock de 100 mg mL⁻¹)

Se disolvieron 10 gramos de dihidrocloruro de espectinomicina en agua desionizada. Se aforó a 100 mL, se esterilizó por filtración (filtro Miller-GP, 0.2 µm) y se almacenó a -20 °C.

Reguladores del crecimiento

Ácido Naftalenacético (ANA; Stock de 1.5 mg mL^{-1})

Se disolvieron 150 mg de ANA en 1.0 mL de hidróxido de sodio. Se aforó a 100 mL con agua desionizada y se almacenó a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Benciladenina (BA; Stock de 0.6 mg mL^{-1})

Se pesaron 60 mg de BA y se disolvieron en 1.0 mL de ácido clorhídrico 1 N, se aforó a 100 mL con agua desionizada y se almacenó a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Cinetina (Cin; Stock de 1.0 mg mL^{-1})

Se pesaron 100 mg de cinetina y se disolvieron en 1.0 mL de ácido clorhídrico 1 N, se aforó a 100 mL con agua desionizada y se almacenó a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D; Stock de 1.0 mg mL^{-1})

Se pesaron 100 mg de 2,4-D y se disolvieron en 1.0 ml de hidróxido de sodio 1 N, se aforó a 100 mL con agua desionizada y se almacenó a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Preparación de medios de cultivo

Medio de cultivo YM

Para preparar 1 l de medio YM se pesaron 400 mg de extracto de levadura, 10 g de manitol, 100 mg de cloruro de sodio, 200 mg de sulfato de magnesio y 500 mg de fosfato de potasio. Se disolvieron en agua destilada, el pH se ajustó a 7.0 con hidróxido de sodio 1.0 N, se aforó con agua destilada y se esterilizó.

Medio de cultivo LB

Para preparar 1 L de medio LB se pesaron 10 g de cloruro de sodio, 5g de extracto de levadura y 10 g de bacto triptona se disolvieron, se aforó con agua destilada y se esterilizó. Cuando fue necesario se agregaron 10 g de agar grado bacteriológico.

Medios de cultivo para plantas

Estrategia general para la preparación

Para preparar 1 L de medio de cultivo, se añadieron 10 mL de cada solución MS (MS I – MS V) a 700 mL de agua desionizada. Se adicionaron 30 gramos de sacarosa y, después de añadir reguladores de crecimiento y vitaminas apropiados, el pH fue ajustado a 5.7 con hidróxido de sodio 1 N / ácido clorhídrico 1 N y se aforó con agua destilada estéril. Para los medios semisólidos se añadieron 2 g de fitagel. Los medios se esterilizaron a 15 lb pulgada⁻² por 15 minutos. Cuando fue necesario, se añadió el antibiótico previamente esterilizado al medio después de esterilizar una vez que su temperatura bajó hasta aproximadamente 50 °C.

Mezcla basal de sales MS

Solución	Compuesto	Concentración final (mg L⁻¹)	Concentración del stock (g L⁻¹)
MS I	Nitrato de amonio	1650	165
	Nitrato de potasio	1900	190
	Sulfato de magnesio	342.5	34.25
MS II	Sulfato de manganeso	16.9	1.69
	Sulfato de zinc	8.6	0.86
	Sulfato de cobre	0.025	0.025
	Cloruro de calcio	440.0	44.0
MS III	Yoduro de potasio	0.83	0.083
	Cloruro de cobre	0.025	0.0025
	Fosfato de potasio monobásico	70.0	7.0
MS IV	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

Vitaminas MS

Compuesto	Concentración final (mg L⁻¹)	Concentración del stock (g L⁻¹)
Mioinositol	100.0	100.0
Tiamina	10.0	10.0
Ácido nicotínico	1.0	1.0
Pirodixina	1.0	1.0

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

Vitaminas B5

Compuesto	Concentración final (mg L⁻¹)	Concentración del stock (g L⁻¹)
Mioinositol	100.0	100.0
Tiamina	0.1	0.1
Ácido nicotínico	0.5	0.5
Pirodixina	0.5	0.5
Glicina	2.0	2.0

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