



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

POSGRADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Transformación nuclear y de cloroplastos de
sistemas vegetales con genes sintéticos
antimicrobianos**

Tesis que presenta

Areli Herrera Díaz

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Director de Tesis:

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

San Luis Potosí, S.L.P., Diciembre del 2005



La tesis “**Transformación nuclear y de cloroplastos de sistemas vegetales con genes sintéticos antimicrobianos**” presentada para obtener el Grado de de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Areli Herrera Díaz** y aprobada el **19 de Diciembre del 2005** 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. Ángel G. Alpuche Solís

Dr. Roberto Montes de Oca Luna

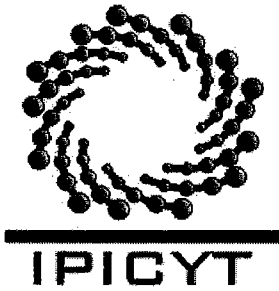
Dr. Gerardo R. Argüello Astorga



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., y en el laboratorio del Dr. S.S. Korban del Department of Natural Resources and Environmental Sciences de la Universidad de Illinois en Urbana-Champaign, bajo la dirección del **Dr. Ángel G. Alpuche Solís**.

El presente trabajo se realizó con apoyo del proyecto CONACYT 37048-B. Durante la realización del mismo, el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 182178), así como del TIES-Training program del TIES-USAID y una beca terminal del COPOCYT, del IPICYT y de la Fundación Produce, S.L.P.



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

Acta de Examen de Grado

COPIA CERTIFICADA

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 019 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 19 días del mes de diciembre del año 2005, 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	IPICTY
Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís	Secretario	IPICTY
Dr. Roberto Montes de Oca Luna	Sinodal externo	UANL

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

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Areli Herrera Díaz

sobre la Tesis intitulada:

Transformación nuclear y de cloroplastos en sistemas vegetales con genes sintéticos antimicrobianos

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 14:15 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé 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 19 días del mes de diciembre de 2005.


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico




Mtra. Ma. Elisa Lucio Aguilar
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

Dedicatoria

Quisiera dedicar el fruto de mi trabajo y esfuerzo a nuestro creador Justo y Bueno y a las personas que mas amo en la vida y que son a las que me debo eternamente, mi Padre Juan Herrera Ríos y mi Madre Lupita Palomares Villalobos, y por supuesto mi hermanito Erick Alejandro Herrera Palomares, a mis tíos y Abuelita, Gracias por que sé que siempre están y estarán conmigo a pesar de mis errores

Agradecimientos

Mi mas sincero respeto, admiración y agradecimiento, aún cuando no conozco las palabras suficientes que me permitan transmitirlo, al **Dr. Ángel G. Alpuche Solís**, por su confianza al admitirme en su grupo de trabajo, por sus atinadas sugerencias durante mi trabajo y porque siempre me brindó la ayuda y las palabras de aliento cuando éstas eran mas necesarias. Al **Dr. Gerardo R. Argüello Astorga** por su desinteresado apoyo, por todas sus sugerencias para mi trabajo y porque su agradable sentido del humor alegraba mas mi estancia en el laboratorio. Al **Dr. Schuyler S. Korban** por todo su apoyo, su confianza y por todas sus atenciones, durante mi estancia en la Universidad de Illinois. Al **Dr. Roberto Montes de Oca Luna** por su ayuda en el proyecto y por todo lo aprendido en mi estadía, en su laboratorio. A la **Dra. Ksenjia Gasic** y la **Dra. Elvira de Mejía** porque fueron un gran apoyo y ayudaron a hacer mas agradable mi estancia en la Universidad de Illinois. A **Sergio Rosales** por su amistad, por todos sus consejos personales y técnicos y, porque su sentido del humor tan peculiar, siempre ayudaba en los momentos difíciles, de igual forma quisiera agradecer a **Ruth E. Soria** y **Silvia Flores** por su amistad y apoyo durante mi trabajo, A **Luzmila Martínez** por cuidar mis plantitas durante la escritura de mi tesis y ser siempre tan atenta y agradable. A **Rosalba Castillo** y **Salvador Ambríz**, por su amabilidad y colaboración ya que siempre permitieron obtener los reactivos y materiales necesarios, durante el desarrollo del presente trabajo. A mis amigos y compañeros de laboratorio: **Pablo, Clara, Vero, Armando, Josefát, Bernardo, Alex, Astrid, Elvira, Rosy, Sandra y Elida.**

Quisiera agradecer además a las personas que no se encuentran directamente relacionadas con mi trabajo, pero que su apoyo me ayudó mucho a realizar un mejor desempeño. A mis amigas y amigos, **Almita, Alicia, Jeanny, Estrella, Dra Lydia, Teo, Deya, Ana, Rafa, Jorge, Fito, Humberto, Gera.** A las personas que a pesar de conocer desde hace muy poco, creo que los conozco de toda la vida, ya que me permitieron ver su belleza interior: A **Claudia Robledo**, por que siempre estuvo cuando necesité de una amiga, por todo su apoyo y confianza. A **Aurora y Maribel**, por la amistad compartida. A **Cecilia Silva**, porque en poco tiempo me brindó su confianza, y porque gracias a su presencia, la estadía en Urbana fue mas provechosa y agradable. Al **Dr. Sergio Casas**, a **Lalo Cruz** y la **Biol. Mireya Sánchez**, porque han sido un excelente apoyo moral en los momentos difíciles. Por supuesto, mi agradecimiento especial para **Leonardo Chávez Guerrero**, por los momentos compartidos, su amistad y apoyo.

A **mis profesores** del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, por fomentar el desarrollo de la Investigación, al **Dr. José Luis Morán**, por prestar atención a los estudiantes que requieren apoyo. Finalmente a las instituciones que ayudaron a mi manutención, durante el desarrollo de mi trabajo: **Beca CONACYT Registro: 182178**, el programa **TIES-Training program**, a la beca interna del **IPICT**, la beca externa del **COPOCYT**, y a la **Fundación PRODUCE.**



Lista de Tablas

1	Actividad antimicrobiana de las protegrinas.....	11
2	Transformación de cloroplastos de plantas superiores.....	20
3	Producción heteróloga de péptidos antimicrobianos en plantas.....	22
4	Condiciones para la amplificación mediante PCR.....	45
5	Temperaturas utilizadas en la PCR.....	46
6	Transformación de sistemas vegetales.....	54

**Lista de Figuras**

1	Principales causas de muerte en países en desarrollo.....	3
2	Cronología del descubrimiento de los péptidos antimicrobianos y su utilización.....	5
3	Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos.....	7
4	Ilustración de productos génicos de catelicidinas.....	9
5	Protegrina 1.....	10
6	Transferencia de genes por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> a células vegetales.....	16
7	Transformación de cloroplastos mediante biobalística e integración del transgén en el genoma del cloroplasto por recombinación homóloga.....	19
8	Transformación nuclear mediante <i>A. tumefaciens</i>	63
9	Mapa de restricción del vector pBI221.....	64
10	Análisis de restricción del vector pBI221-PG1.....	65
11	Representación esquemática del vector pCAMBIA1304.....	66
12	Análisis de restricción del vector pCAMBIA1304 –PG1.....	67
13	Resultados de la transformación nuclear de tomate.....	68
14	Resultados de la transformación nuclear de zanahoria.....	69
15	Resultados de la transformación nuclear de lechuga.....	70
16	Resultado del PCR de plantas de lechuga para el gene de PG1.....	71
17	Ensayo de actividad antimicrobiana de extractos proteicos de lechuga transgénica para PG1.....	72
18	Resultados de tinción histológica de GUS.....	73
19	Pasos en la transformación de cloroplastos.....	74
20	Mapa del genoma de Cloroplasto.....	75
21	Síntesis del Promotor <i>Prrn</i> unido a la región 5'UTR T7g10.....	77
22	Caracterización de clonas positivas TopoZero Blunt end®-Prrn5'UTR.....	78
23	Purificación del vector pKCZ y la región P5'UTR.....	79
24	Análisis de restricción del vector pKCZ-P5'UTR.....	81
25	Homología en aminoácidos de protegrinas.....	82
26	Representación esquemática del diseño de genes sintéticos.....	84
27	Purificación del gen de Ubiquitina.....	85
28	Unión de los genes PG3 y PGIB367 a Ubiquitina.....	86
29	Análisis de restricción de vectores de expresión de Protegrinas en cloroplastos.....	87
30	Diseño de oligonucleótidos para genes reporteros.....	88
31	Amplificación mediante PCR de genes reporteros para GFP y GFP-GUS.....	89
32	Análisis de restricción del vector pKCZ-P'5UTR' GUS.....	90
33	Análisis de restricción del vector pKCZ-P'5UTR-GFP-GUS.....	91
34	El vector de expresión pKCZ-GFPGUS es funcional en <i>E. coli</i>	92



35	Inmunodetección de Ubiquitina en extractos proteicos de <i>E. coli</i>	93
36	Estrategias de restricción y ligación para la generación del vector bicistrónico conteniendo la PG1.....	96
37	Purificación del vector pKCZ-UbPG1 con extremos romos para la subclonación del gen <i>aadA</i>	97
38	Análisis de restricción del vector bicistrónico para la PG1.....	99
39	Resultados obtenidos de la transformación de cloroplastos.....	101

**Índice**

Carátula.....	i
Constancia de probación de tesis.....	ii
Créditos institucionales.....	iii
Acta de examen.....	iv
Dedicatoria.....	v
Agradecimientos.....	vi
Lista general de tablas.....	vii
Lista general de figuras.....	viii
Índice.....	x
I. Resumen.....	xiii
I. Summary.....	xv
II. Introducción.....	1
III. Antecedentes.....	2
3.1. Enfermedades infecciosas y resistencia a antibióticos.....	2
3.2. Inmunidad innata y péptidos antimicrobianos.....	3
3.2.1. Péptidos catiónicos antimicrobianos en mamíferos.....	6
3.2.1.1. Catelicidinas.....	8
3.2.1.1.1. Protegrinas.....	9
3.3. Agrobiotecnología.....	12
3.3.1. Cultivo de tejidos para la transformación de plantas.....	13
3.3.2. Transformación nuclear mediante <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	14
3.3.3. Generalidades de la transformación de cloroplastos.....	17
3.3.3.1. Métodos para la transformación de plástidos.....	18
3.3.3.2. Transformación de plástidos de plantas superiores.....	18
3.4. Producción heteróloga de péptidos antimicrobianos en plantas.....	21
3.5. Características de sistemas vegetales de tomate, zanahoria y lechuga.....	22
3.5.1. Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>).....	23
3.5.2. Zanahoria (<i>Daucus carota</i>).....	24
3.5.3. Lechuga (<i>Lactuca sativa</i>).....	24
IV. Objetivos.....	26
4.1. Objetivo general.....	26
4.2. Objetivos específicos.....	26
V. Hipótesis.....	26b
VI. Material y Equipo.....	27
6.1. Material biológico.....	27
6.2. Vectores utilizados.....	28
6.3. Reactivos y suplementos.....	28
6.4. Equipo.....	31
VII. Metodología.....	34
7.1 Preparación de soluciones y medios de cultivo.....	34
7.1.1. Medios de cultivo para plantas.....	34
7.1.1.1. Procedimiento para preparar medios de cultivo para plantas.....	34



7.1.2. Preparación de vitaminas para medios de cultivo.....	35
7.1.3. Preparación de antibióticos, hormonas y agentes antioxidantes.	35
7.1.4 Preparación de medios de cultivo para bacterias.....	37
7.1.5 Preparación de soluciones.....	38
7.2. Aislamiento y purificación de ADN.....	39
7.2.1. Extracción de ADN plasmídico de <i>E.coli</i>	39
7.2.2. Extracción de ADN de plantas.....	41
7.2.3. Métodos de cuantificación de ADN.....	43
7.3. Amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	44
7.4. Manipulación enzimática del ADN.....	46
7.4.1. Reacciones de digestión y purificación de ADN.....	46
7.4.2. Reacciones para generar extremos romos.....	47
7.4.3. Reacciones de ligación y purificación.....	47
7.5. Transformación de <i>E. coli</i> con los plásmidos recombinantes.....	48
7.6. Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con los plásmidos recombinantes	50
7.7. Detección de la proteína recombinante en <i>E. coli</i>	51
7.7.1. Métodos de extracción de proteína en <i>E.coli</i>	51
7.7.2. Ensayo de Inmunoblot para la detección de la proteína heteróloga.....	52
7.8. Métodos de transformación en plantas.....	52
7.8.1. Transformación nuclear mediante <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	53
7.8.1.1. Esterilización y germinación de semillas.....	53
7.8.1.2. Transformación nuclear de zanahoria (<i>Daucus carota</i>).....	54
7.8.1.3. Transformación nuclear de tomate (<i>Lycopersicum esulentum</i>)	55
7.8.1.4. Transformación nuclear de lechuga (<i>Lactuca sativa</i>).....	55
7.8.1.5. Tinción histológica para β -Glucuronidasa (GUS).....	56
7.8.2. Transformación de cloroplastos de tabaco mediante biobalística..	56
7.8.2.1. Preparación de la suspensión de micropartículas de oro.....	56
7.8.2.2. Preparación del material consumible para el bombardeo.....	57
7.8.2.3. Metodología para el bombardeo de hojas de tabaco.....	57
7.9. Ensayos de actividad biológica de plantas transgénicas.....	59
7.9.1. Extracción de proteína total soluble de tejidos vegetales.....	59
7.9.2. Ensayos de inhibición bacteriana en placa.....	59
7.9.2.1. Método de antibiograma.....	59
7.9.2.2. Método ultrasensible de difusión radial.....	61
VIII. Resultados y Discusiones.....	63
8.1. Estrategia general en la transformación nuclear utilizando <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	63
8.1.1. Optimización del gen sintético de Protegrina (PG1).....	64
8.1.1.1. Clonación de PG1n en el vector de biobalística pBI221.....	64
8.1.1.2. Subclonación de PG1n en pCAMBIA 1304 y 2201.....	66
8.1.2. Transformación nuclear de tomate (<i>Lycopersicum esulentum</i>) mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	68



8.1.3. Transformación nuclear de zanahoria (<i>Daucus carota</i>) mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	69
8.1.4. Transformación nuclear de lechuga (<i>Lactuca sativa</i>) mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	70
8.1.4.1. Análisis mediante PCR de la transformación nuclear de <i>L. sativa</i>	71
8.1.4.2. Análisis de la actividad antimicrobiana de plantas que confieren el gen de PG1.....	72
8.2. Estrategia general en la transformación de cloroplastos mediante biobalística.....	74
8.2.1. Modificación de un vector para la transformación de cloroplastos.....	74
8.2.2. Clonación del promotor <i>Prrn</i> y la región 5'UTR (T7-g10) en pKCZ.....	78
8.2.3. Generación de vectores de expresión de Protegrinas en cloroplasto.....	81
8.2.3.1. Diseño y optimización de genes sintéticos de Protegrina.....	81
8.2.3.2. Fusión del gen de Ubiquitina a las Protegrinas: PG3cc y PGIB367.....	84
8.2.3.3. Subclonación de los genes de Ubiquitina-Protegrina en el vector pKCZ para la transformación de cloroplastos.....	86
8.2.4. Vectores para transformación de cloroplastos con genes reporteros.....	87
8.2.4.1. Amplificación de los genes reporteros para GUS y GFP-GUS.....	87
8.2.4.2. Clonación del gen <i>uidA</i> (GUS) en el vector pKCZ para la transformación de cloroplastos.....	89
8.2.4.3. Clonación del gen <i>uidA-gfp</i> (GFP-GUS) en el vector pKCZ para la transformación de cloroplastos.....	90
8.2.5. Análisis de expresión de vectores para transformación de cloroplasto en <i>Escherichia coli</i>	91
8.2.5.1. Detección de la proteína verde fluorescente (GFP) de <i>Aequorea victoria</i> en <i>E. coli</i>	91
8.2.5.2. Inmunodetección de la proteína de Ubiquitina en <i>E. coli</i>	92
8.2.6. Construcción de un vector bicistrónico con la fusión Ubiquitina-PG1 para la transformación de cloroplastos.....	93
8.2.7. Ensayos de biobalística para la transformación genética de cloroplastos.....	100
IX. Conclusiones.....	102
X. Perspectivas.....	103
XI. Literatura Citada.....	104
XII. Apéndice.....	116



I. RESUMEN

Las enfermedades infecciosas son una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial. El uso indiscriminado de antibióticos para combatir estas enfermedades ha provocado que los microorganismos desarrollen resistencia a una gran cantidad de antibióticos, motivo por el cual es necesario contar con nuevas estrategias para combatirlos. En este contexto, los péptidos antimicrobianos son una alternativa eficaz para combatir un gran número de microorganismos.

El uso de plantas transgénicas para la producción de proteínas de importancia farmacéutica es una excelente alternativa biotecnológica. Dentro del área de la transformación genética de plantas, en los últimos diez años fue posible introducir genes al genoma del cloroplasto. Esta tecnología emergente cuenta con ventajas respecto a la transformación nuclear tales como: ausencia de flujo de transgenes mediante polen; altos niveles de expresión de proteína heteróloga (hasta 20% de la proteína total soluble); y no se conocen efectos epigenéticos. Particularmente en el caso de los péptidos antimicrobianos se han reportado buenos resultados de plantas transgénicas con genes sintéticos que confieren resistencia contra bacterias y hongos.

En base a lo anterior, el objetivo del presente proyecto es la generación de plantas transgénicas y transplastómicas que expresen péptidos antimicrobianos de Protegrina (PG) de cerdo. Con respecto a la transformación nuclear se diseñó un gen sintético de PG1 optimizado para expresión en sistemas vegetales, fusionado al péptido señal de la proteína antifúngica 2 de rábano (Rs-AFP2); se clonó este gen en vectores binarios pCAMBIA1304 y 2201, bajo el promotor constitutivo CaMV35S y el terminador NOS. Los vectores fueron introducidos en *Agrobacterium tumefaciens* y mediante co-cultivo se transformaron nuclearmente los sistemas vegetales de tomate, lechuga y zanahoria. Se obtuvieron callos embriogénicos de zanahoria, y explantes y callos de tomate después de 6 meses en medio de cultivo de selección, así como 20 líneas de plantas adultas de lechuga, de las cuales cinco dieron resultados positivos para el transgén PG1 por técnicas de PCR. Se demostró la actividad antimicrobiana de callos de lechuga contra *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*.

Con el objetivo de lograr la transformación de cloroplastos de tabaco, se empleó el vector pKCZ en el que se clonaron el Promotor *Prrn*, la región 5'UTR de la proteína 10 del fago T7. A este vector por un lado se le adicionaron los genes de Protegrina (PG1, PG3cc y PGIB367) fusionados a Ubiquitina y demostraron ser funcionales mediante la inmunodetección de la ubiquitina. Por otro lado el vector con promotor y 5'UTR se le manipuló para agregarle genes reporteros GUS y GFP-GUS. La construcción conteniendo GFP-GUS demostró ser funcional al probarla en *E. coli*.

Se realizaron ensayos de biobalística con el co-bombardeo de la construcción pKCZ-PG1del y pKCZP5'UTR7G10, y se lograron obtener explantes con la capacidad de crecer en medio selectivo, lo cual sugiere que



contamos con explantes transplastómicos. Por otro lado se generó un vector con una construcción biscistrónica conteniendo la PG1 a el cual se le eliminó una región promotora de *Prrn* para que una vez que se integre, evitar posibles eliminaciones del transgén por recombinación de promotores en el plastoma, el cual se usó para ensayos de balística y se está en espera de resultados.

Este es el primer trabajo donde se obtiene una planta transgénica de lechuga expresando la protregrina PG1 con actividad antimicrobiana y además se generaron plantas de tabaco que se encuentran en medio de selección y son posiblemente transplastómicas.



I. SUMMARY

Infectious diseases are one of the main causes of mortality worldwide. The irrational use of antibiotics to face these diseases has led to the developing of resistance strategy in microorganisms against a broad range of antibiotics, therefore is necessary to have new approaches to control them. In this regard, the antimicrobial peptides are an effective alternative to control a wide number of microorganisms.

The use of transgenic plants for protein production of pharmaceutical importance is an excellent biotechnological option. Within the plant genetic transformation area, in the last 10 years was possible to introduce genes into the chloroplast genome. This emergent technology has advantages in comparison to the nuclear transformation such as: transgene flow by pollen is avoided; high expression levels of heterologous protein (up to 20% of total soluble protein); no epigenetic effects are known.

Particularly in antimicrobial peptides, good results have been reported in transgenic plants harboring synthetic genes which confer resistance to bacteria and fungi.

Based on the information above mentioned, the objective of the current work is the production of transgenic and transplastomic plants expressing protegrin (PG) antimicrobial peptides from pig. In the nuclear transformation process a PG1 synthetic gene optimized for plant expression was designed. This gene was fused to the signal peptide of the anti-fungi protein 2 of radish (Rs-AFP2); the gene was cloned in binary vectors pCAMBIA 1304 and 2201, driven by the constitutive promoter CaMV35S and the NOS terminator. The vectors were introduced in *Agrobacterium tumefaciens* and the nuclear transformation of the tomato, carrot and lettuce plant systems transformation was performed through co-cultivation. Carrot embryogenic calli were obtained and also tomato calli after 6 months under selection culture media. Additionally 15 lettuce adult plant lines we obtained, from these, five were positive for PG1 using PCR analysis. It was demonstrated the antimicrobial activity of the lettuce calli against *Escherichia coli* and *Lysteria monocytogenes*.

To achieve the tobacco chloroplast transformation, the pKCZ vector was employed where the *Prrn* promoter and the 5'UTR region of protein 10 from T7 phage were cloned. The protegrin genes (PG1, PG3cc and PGIB367) were added to this vector fused to ubiquitin and showed to be functional through the ubiquitin immunodetection. At the same time the pKCZ modified vector was manipulated to include the reporter genes GUS and GFP-GUS. The construct with the GFP-GUS showed to be functional in *E. coli*.

Several biolistic assay were performed with the co-bombardment of the constructs pKCZ-PG1del and pKCZp5'UTRT7G10. Explants were obtained in selective media which suggests the presence of transplastomic plants.

Additionally, a vector harboring a bicistronic construct with the PG1 gene and a deletion of the extra *Prrn* region was generated, in order to avoid a possible elimination of the PG1 gene by recombination with a promoter located in the



plastome. This vector was used for biolistic assay and we are waiting for the results.

This is the first work where a transgenic lettuce is obtained expressing the PG1 protegrin with antimicrobial activity and also tobacco plants were produced, which are under selection media and these may be transplastomic ones.



INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas son una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial, principalmente en las zonas rurales o las áreas marginadas de las grandes ciudades. Debido al uso indiscriminado de antibióticos para combatir estas enfermedades, han surgido microorganismos resistentes a una gran cantidad de antibióticos, motivo por el cual es necesaria la generación de nuevas estrategias para combatirlos (Kollef y Fraser, 2001).

Recientemente se ha estudiado una generación de péptidos conocidos como antimicrobianos, los cuales se encuentran en procariontes y eucariontes, y presentan una actividad de amplio espectro, es decir su actividad puede ser antibacteriana, antiviral, antifúngica y antiprotozoaria (Ganz y Lehrer, 1999).

Los péptidos antimicrobianos representan una alternativa muy eficaz para combatir un gran número de microorganismos, por lo que su expresión heteróloga en diferentes sistemas biológicos puede ayudar a combatir una gran cantidad de enfermedades de tipo infeccioso.

El uso de plantas transgénicas para la producción de proteínas de importancia farmacéutica es una excelente alternativa biotecnológica. En general las ventajas son: se pueden crecer fácilmente en grandes volúmenes, evitando el uso de fermentadores. Por otro lado, la purificación de la proteína heteróloga es económica o puede no ser necesaria, y se evitan las contaminaciones de toxinas o secuencias virales que pueden tener otros sistemas (Giddings, 2001).

Dentro del área de transformación genética de plantas, en los últimos diez años fue posible introducir genes al genoma del cloroplasto, organelo presente en células vegetales responsables de la fotosíntesis. Esta tecnología emergente cuenta con ventajas respecto a la transformación nuclear, tales como: 1-Ausencia de flujo de transgenes mediante polen, 2-Altos niveles de expresión, hasta 20% de la proteína total soluble, 3-No se conocen efectos epigenéticos (Maliga, 2002). Particularmente en el caso de los péptidos antimicrobianos se han reportado buenos resultados de plantas transplastómicas con genes sintéticos que proporcionan resistencia a bacterias y hongos (DeGray *et al.*, 2001). Los genes sintéticos optimizan el uso de codones por organismos de otros reinos y hacen eficiente la traducción.

Debido a las ventajas que representan la expresión heteróloga de proteínas en plantas. El objetivo del presente proyecto es lograr la expresión de genes antimicrobianos de Protegrina de cerdo en plantas de zanahoria, tomate y lechuga, empleando la transformación nuclear y en el caso de tabaco utilizando la transformación de cloroplastos.



III. Antecedentes

3.1. Enfermedades infecciosas y resistencia a antibióticos

A través de la historia, la humanidad ha sido víctima de pandemias, como el cólera, la peste, la tuberculosis y la tifoidea. Los microorganismos han influido en la historia de conquistas e imperios como la tifoidea que evitó la conquista de Rusia para Napoleón, o la viruela y la influenza transmitida por los conquistadores españoles y que influyeron en la desaparición del imperio Azteca (WHO, 2000).

Las contribuciones de Paul Ehrlich's con la teoría de las “balas mágicas” y su tratamiento contra la sífilis utilizando un agente químico, además del descubrimiento de la penicilina en 1928 por Alexander Fleming, aunado al acelerado desarrollo de vacunas, dieron esperanzas para lograr la erradicación de las enfermedades causadas por microorganismos infecciosos (Rappuoli, 2004). Sin embargo después del primer uso de la penicilina, en los años 50's se detectaron las primeras bacterias de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos (Leeb, 2004). Debido al uso indiscriminado de antibióticos en la práctica clínica, la agricultura y la ganadería (Ferber, 2003; Shea, 2003; Turner *et al.*, 2004; Turnidge, 2004), hoy en día, existe una extensa cantidad de literatura que documenta microorganismos resistentes a antibióticos. Lo que involucra a un gran número de enfermedades infecciosas causadas por hongos, virus, bacterias y protozoarios, representado un serio problema para la salud (Leeb, 2004).

En la actualidad, aún con todos los avances científicos y tecnológicos, según reportes de la Organización Mundial de las Naciones Unidas (OMS), las enfermedades infecciosas continúan siendo la principal causa de muertes a nivel mundial, en países en desarrollo (Fig. 1).

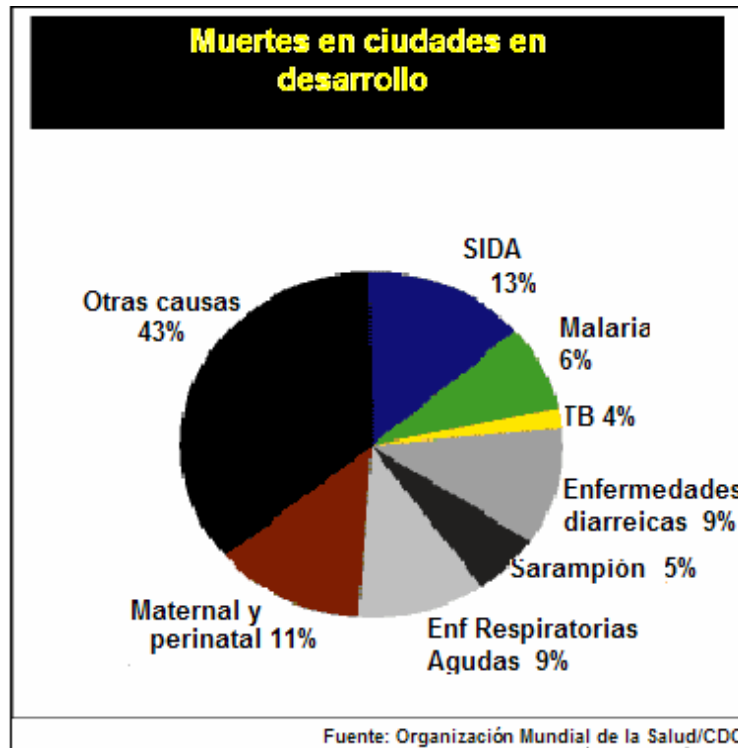


Figura 1. Principales causas de muerte en países en desarrollo.
Imagen tomada de la OMS/CDC

3.2. Inmunidad innata y péptidos antimicrobianos

La constante exposición a agentes infecciosos ha obligado a los organismos de todos los reinos a producir mecanismos de defensa que los mantengan protegidos del medio ambiente. Los seres vivos requieren de un sistema de defensa que actúe de forma rápida y efectiva contra microorganismos invasores y contra sus factores de virulencia. En términos evolutivos existe un elemento clave que le ha permitido sobrevivir a la mayoría de los organismos; este elemento se conoce como inmunidad innata (Hancock y Chapple, 1999; Wasserman, 2004). La inmunidad innata se refiere a todos los aspectos de protección contra la infección que se encuentran genéticamente predeterminados y que no requieren de una exposición previa a los patógenos (Booman, 1991; Izadpanah y Gallo, 2005).

Los péptidos antimicrobianos (Antimicrobial peptides AMPs), forman parte de la inmunidad innata. Estos péptidos reciben el nombre de antimicrobianos ya

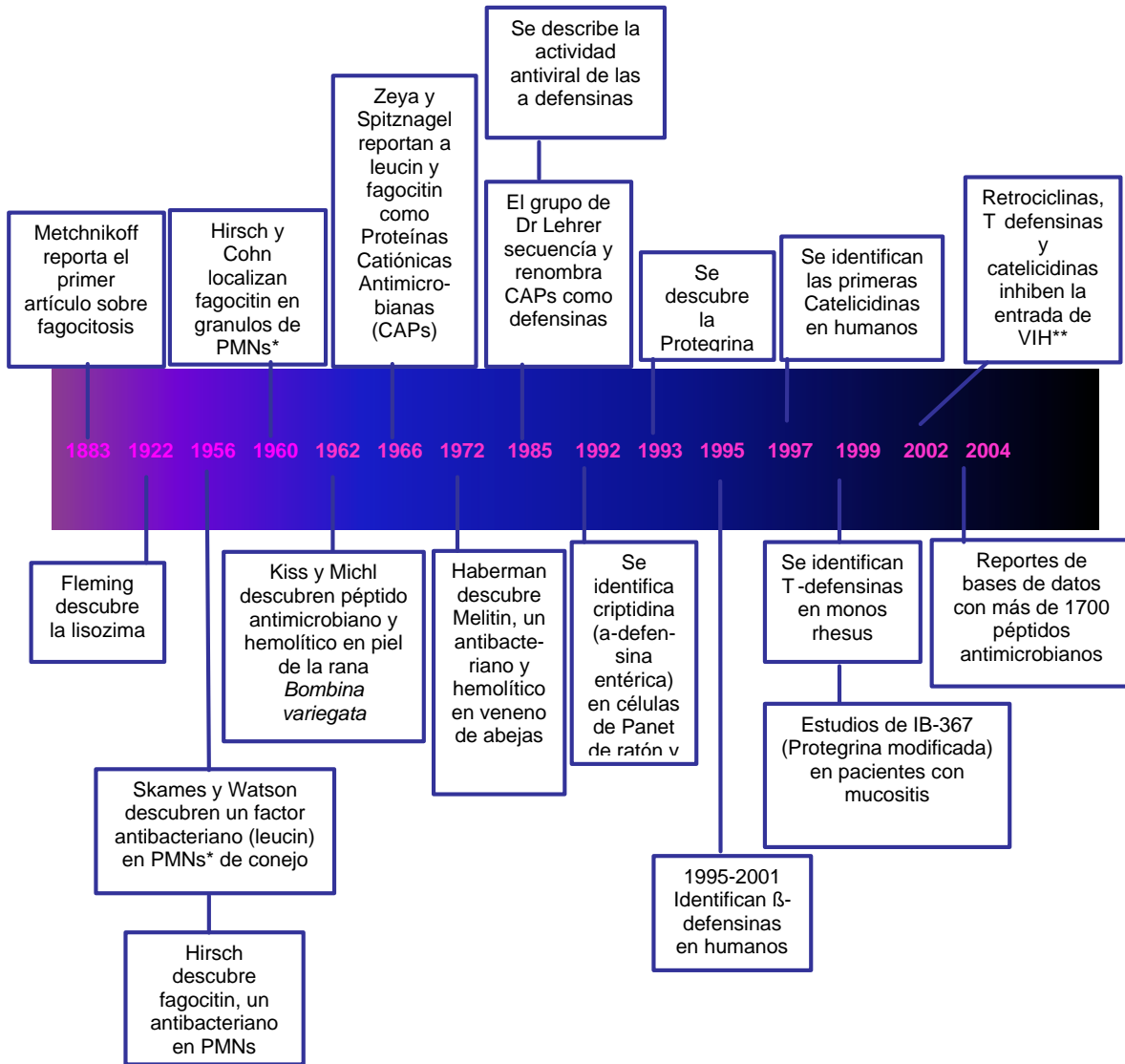


que son capaces de matar bacterias, levaduras, hongos, algunos protozoarios parásitos e inactivar virus. La distribución de los péptidos antimicrobianos incluye a eucariontes como mamíferos, anfibios, insectos y plantas, hasta procariontes como las bacterias lácticas (Clark *et al* 1994; Ra *et al.*, 1999; Destoumieuxa *et al.*, 2000; Lay *et al.*, 2003; Lehrer, 2004). Algunos de los trabajos más relevantes en el descubrimiento y la utilización de péptidos antimicrobianos se presentan en la Fig 2.

A la fecha se tienen bases de datos, en las que se han reportado más de 1,700 secuencias de AMPs. Estos péptidos se caracterizan por ser de bajo peso molecular, de acción rápida y eficaz contra un gran número de microorganismos, con baja toxicidad para células de mamíferos y en muchos casos son efectivos contra microorganismos que son resistentes a antibióticos tradicionales (Brahmachary *et al.*, 2004).



Resumen histórico de péptidos antimicrobianos



*PMNs: Leucocitos polimorfonucleares
 **VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana

Figura 2. Cronología del descubrimiento de los péptidos antimicrobianos y su utilización. En la flecha central se puede leer el orden cronológico en el estudio de los péptidos antimicrobianos. Figura modificada de Lehrer (2004), complementada con: Kokryakov *et al.* (1993), Andreu y Rivas (1998), Chen *et al.* (2000), Brahmachary *et al.* (2004), y Selsted y Ouellete (2005).



Debido al gran número de AMPs es importante contar con sistemas de agrupación que faciliten su estudio. Se han clasificado a los AMPs en dos grandes grupos, un grupo incluye a los péptidos sintetizados no ribosómicamente. Estos péptidos son sintetizados en complejos multienzimáticos, como es el caso de la polimixina B y Gramicidin S, entre otros producidos principalmente por bacterias (Saugar *et al.*, 2002).

El siguiente gran grupo corresponde a los péptidos que son producidos ribosómicamente, ya sea por organismos procarióticos como es el caso de las bacteriocinas (Ra *et al.*, 1999), o en organismos eucarióticos como las defensinas, catelicidinas, cecropinas, tioninas, entre otros (Zasloff, 2002). A los péptidos producidos ribosómicamente se les subdivide principalmente por sus características bioquímicas, como por ejemplo, el orden estructural de sus aminoácidos: si son lineales, circulares, alfa ó beta plegados; así como por su carga neta: como los péptidos catiónicos y aniónicos (Ganz y Lehrer, 1998; 1999).

3.2.1. Péptidos catiónicos antimicrobianos en mamíferos

En la naturaleza los péptidos antimicrobianos más abundantes son de carga neta positiva, conocidos como catiónicos, además son anfipáticos y pueden ser α ó β plegados. Ganz y Lehrer (1999), mencionan que el mecanismo por el que actúan los AMPs es rompiendo la membrana celular de los microorganismos, debido a que los microorganismos tienen una membrana con carga negativa. Tomando en cuenta que el tamaño de un residuo de aminoácido en un péptido a hélice es de $\sim 1.5 \text{ \AA}$, dos residuos en un β plegado miden $\sim 3.5 \text{ \AA}$, y que la membrana de fosfolípidos mide $\sim 30 \text{ \AA}$, 20 aminoácidos serían suficientes para atravesar la membrana celular. En la Fig. 3 se describen los dos principales mecanismos propuestos para la ruptura de la membrana por AMPs.

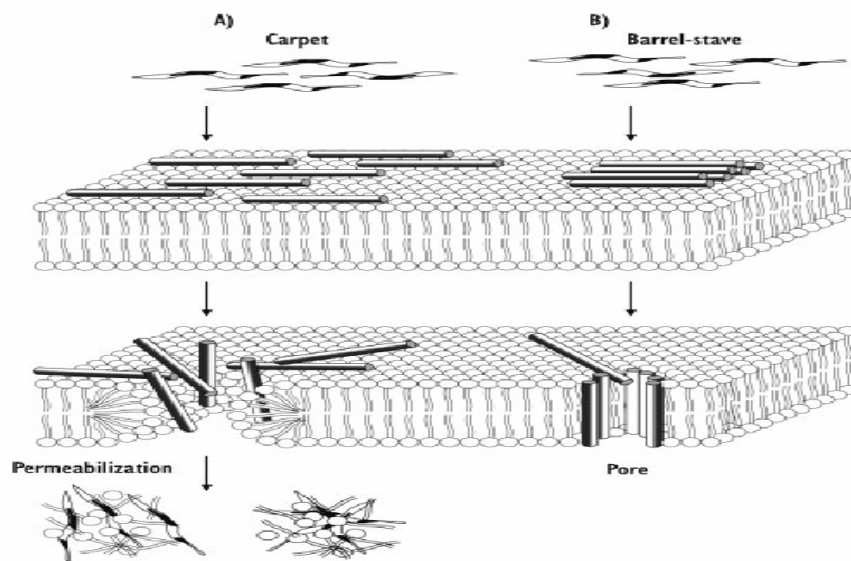


Figura 3. Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos. (A) El modelo de carpeta (Carpet) (Pouny *et al.*, 1992), donde la carga positiva del péptido interactúa con los fosfolípidos en la membrana, seguido por un “tirón”, de la parte hidrofóbica del péptido a través del núcleo hidrofóbico de la membrana, finalmente se rompe la membrana, por la translocación del péptido a través de la membrana. **(B)** Modelo de formación del poro (barrel-stave) (Gazit *et al.*, 1994). Los péptidos se pueden unir y formar una especie de “barril”, lo que forma un poro y la siguiente ruptura de la membrana. Figura tomada de Lundberg y Langel, 2000).

Los AMPs producidos por mamíferos pueden estar presentes dentro de gránulos de neutrófilos, en las secreciones de las células epiteliales de la piel y mucosas o como productos de degradación de proteínas. En los neutrófilos se encuentran gran cantidad de proteínas y péptidos con actividad antimicrobiana, como lisozima, lactoferrina, bacterenecinas, defensinas, indolicidinas y catelicidinas (Hancock y Lehrer, 1998). Los AMPs catiónicos más estudiados son las α , β , γ -defensinas y las catelicidinas con un tamaño de entre 12-50 aminoácidos. Diferentes funciones se han caracterizado en estos péptidos como son quimiotaxis, angiogénesis y promotores de la respuesta inmune, siendo la actividad antimicrobiana la más conocida (Andrew y Rivas, 1998; Kougias *et al.*, 2005).



3.2.1.1. Catelicidinas

Los miembros de la familia de antimicrobianos de catelicidina, fueron descubiertos en cerdos y en estudios recientes se han encontrado en gatos, conejos, cabras, ratones y humanos (Nizet y Gallo, 2003; Turner *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1999). Los genes de las catelicidinas son altamente homólogos y comprenden 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 del antimicrobiano (Shinnar *et al.*, 2003).

Los prepropéptidos son sintetizados en médula ósea y son dirigidos a los neutrófilos donde son almacenados como propéptidos. Como se muestra en la Fig 4, 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 ser de α hélice como LL-37/hCAP-18 en humanos (Turner *et al.*, 1998), β plegado como las protegrinas de cerdos (Shi y Ganz, 1998), o ricos en aminoácidos de prolina ó arginina como Bac7, en bovinos (Zanetti *et al.*, 1995).

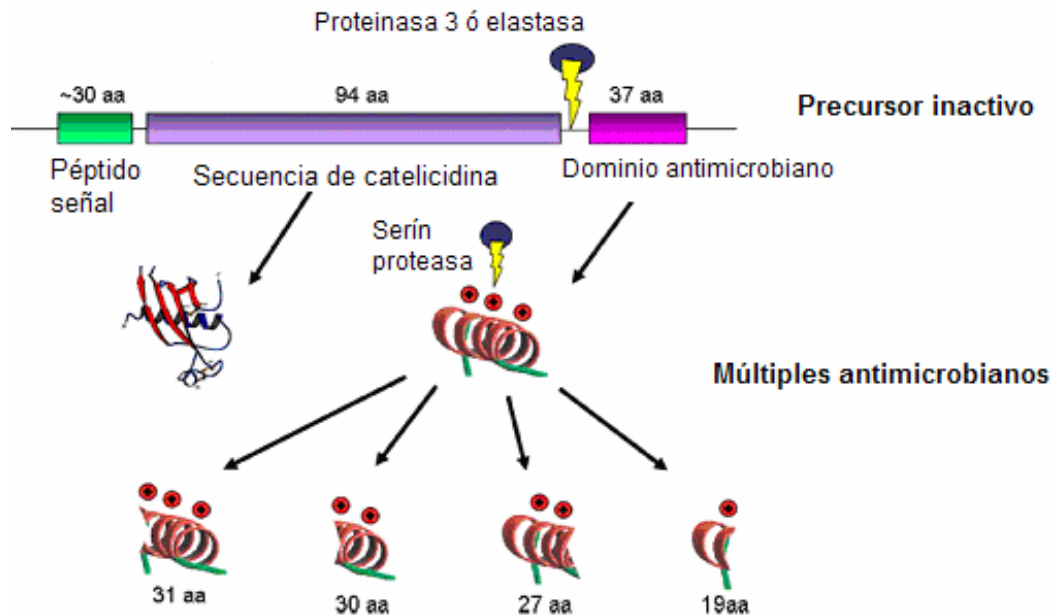


Figura 4. Ilustración de productos génicos de catelicidinas. El precursor inactivo corresponde al péptido señal, y al dominio de catelicidina unido al antimicrobiano, siendo un prepropéptido inactivo. La serin proteasa 3 ó la elastasa activan el péptido antimicrobiano, ya que liberan el dominio de catelicidina y dejan activo al antimicrobiano. Imagen modificada de Izadpanah y Gallo (2005).

3.2.1.1.1. Protegrinas

Las protegrinas (PG) <latín *protegere*>, son péptidos de la familia de las catelicidinas, 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 (Fig. 5). A la fecha se han identificado 5 protegrinas naturales en cerdos (*Sus scrofa*), con un amplio espectro de acción (Zhao *et al.*, 1995; Mangoni *et al.*, 1996).

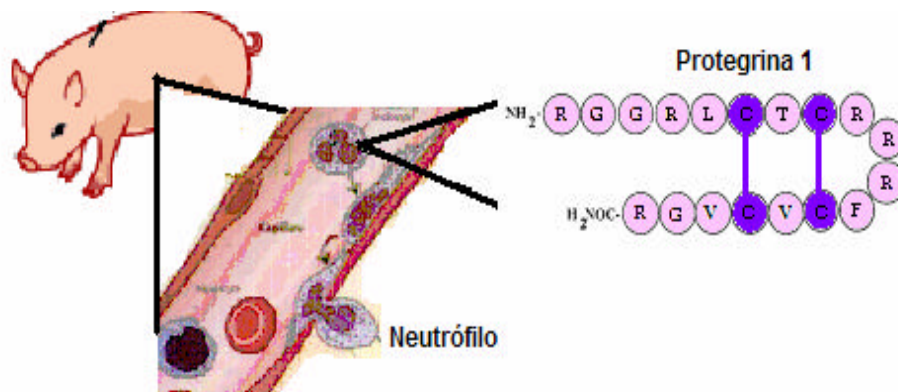


Figura 5. Protegrina 1. Representación esquemática de la protegrina 1 obtenida a partir de neutrófilos de cerdo (*Sus scrofa*). En la imagen de la protegrina se pueden ver los puentes disulfuro de las cisteínas, importantes para su actividad antimicrobiana.

A diferencia de las defensinas de humanos, las PGs conservan su actividad en presencia de NaCl a concentraciones fisiológicas, así como en presencia de cationes divalentes (Shi y Ganz *et al.*, 1998). Otra ventaja interesante es que algunos inhibidores presentes en el suero humano como α -macroglobulinas y serpinas tienen poco efecto inhibitorio en las protegrinas. 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 (Bellm *et al.*, 2000). Las protegrinas naturales son activas en concentraciones micromolares, sin embargo concentraciones muy altas, pueden generar actividad hemolítica contra eritrocitos de humanos. Por esta razón de forma sintética se han generado cientos de análogos de PGs con modificaciones en la quilaridad, el largo, la conformación, el estado de amidación y los puentes disulfuro (Chen *et al.*, 2000). La Tabla 1 resume la actividad antimicrobiana de las protegrinas.

**Tabla 1. Actividad antimicrobiana de las protegrinas**

Microorganismo	Gpo	Enfermedad	Protegrina MIC/IC ₅₀ (µg/ml)		Referencia
<i>Streptococcus</i> sp	G +	Artritis y mucositis	0.25-4	IB367	Chen <i>et al.</i> , 2000.
<i>Corynebacterium</i> sp	G +	Difteria y bacteriemia	0.13-.25	IB367	Chen <i>et al.</i> , 2000.
<i>Staphylococcus</i> sp <i>Staphylococcus aureus</i>	G +	Shock tóxico, artritis, meningitis	0.13-4 1.7	IB367 PG1	Chen <i>et al.</i> , 2000. Steinberg <i>et al.</i> , 1997.
<i>Moraxella</i> sp	G -	Infec. respirtatorias	0.2-0.8	IB367	Chen <i>et al.</i> , 2000.
<i>Enterococcus faecalis</i>	G +	Asoc a mucositis	2.7	PG1	Steinberg <i>et al.</i> , 1997.
<i>Streptococcus mitis</i>	G +	Asoc a mucositis	2-43	IB367	Mosca <i>et al.</i> , 2000.
<i>Streptococcus salivarius</i>	G +	Asoc a mucositis	0.2-5	IB367	Mosca <i>et al.</i> , 2000.
<i>Streptococcus sanguis</i>	G +	Asoc a mucositis	4-64	IB367	Mosca <i>et al.</i> , 2000.
<i>Streptococcus mutans</i>	G +	Asoc a mucositis	0.7-1.3	IB367	Mosca <i>et al.</i> , 2000.
<i>Enterococcus faecalis</i>	G +	Asoc a mucositis	2.7	PG1	Steinberg <i>et al.</i> , 1997.
<i>Listeria monocytogenes</i>	G +	Listeriosis	>10	PG1	Turner <i>et al.</i> , 1998
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	G -	Gonorrea	8 0.3-10	IB367 PG1	Chen <i>et al.</i> , 2000; Qu <i>et al.</i> , 1997; Shafer <i>et al.</i> , 1998.
<i>Serratia marcescens</i>	G -	Asoc a mucositis	16- 256	IB367	Mosca <i>et al.</i> , 2000.
<i>Haemophilus</i> sp <i>Haemophilus ducrei</i>	G -	Septicemias y neumonía	1-8 0.5-5	IB367 PG1	Chen <i>et al.</i> , 2000; Fortney <i>et al.</i> , 1998
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	G -	Neumonía e infecciones urinarias	1-5	IB367	Chen <i>et al.</i> , 2000.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	G -	Asoc a Fibrosis Quística (FQ)	1-8 0.5	IB367 PG1	Chen <i>et al.</i> , 2000; Albrecht <i>et al.</i> , 2002.
<i>Burkholderia cepacia</i>	G -	Asoc a FQ	6-10	PG1	Albrecht <i>et al.</i> , 2002.
<i>Escherichia coli</i>	G -	Diarreas y septicemia	0.25-1	IB367	Chen <i>et al.</i> , 2000.
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	M	Tuberculosis	~50	PG1	Miyakawa <i>et al.</i> , 1996.
<i>Leptospira interrogans</i>	E	Leptospirosis	4.3- 215	PG1	Sambri <i>et al.</i> , 2002
<i>Borrelia</i> sp	E	Enfermedad de Lyme	215.6	PG1	Sambri <i>et al.</i> , 2002
<i>Treponema pallidum</i>	E	Sífilis	32.3	PG1	Sambri <i>et al.</i> , 2002
<i>Candida albicans</i>	L	Candidiosis	4-16 4-16	IB367 PG1	Chen <i>et al.</i> , 2000; Yoon-Cho <i>et al.</i> , 1998.
<i>Chlamydia trachomatis</i>	P	Clamidiosis	1.76-2.40 6	PG1 PG1	Yasin <i>et al.</i> , 1996. Chong-Cerr <i>et al.</i> , 2003.
<i>Trypanosoma brucei</i>	P	Enf del sueño	107	PG1	Mc Gwire <i>et al.</i> , 2003.
VIH	V	SIDA	10-50	PG1	Tammamura <i>et al.</i> , 1995; Seinestraesser <i>et al.</i> , 2005.

G+: Bacterias Gram +; **G-**: Bacterias Gram-; **E**: espiroquetas; **L**:levaduras; **M**: Micobacterias; **P**: protozoarios; **V**: virus. **VIH** : Virus de Inmunodeficiencia Humana; **SIDA**: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida; **MIC**: Concentración Mínima Inhibitoria; **IC₅₀**: Concentración Inhibitoria del 50%.



En base a los análisis de los péptidos en modelos biológicos, Che *et al.* (2000) seleccionaron el péptido IB-367 para realizar estudios clínicos en pacientes con mucositis oral asociada al cáncer. El amplio espectro de acción de las protegrinas contra agentes infecciosos, además de la rápida acción para matar microorganismos de interés biomédico y su actividad en presencia de fluidos biológicos, las ubica como potentes antimicrobianos (Bellm *et al.*, 2000). Sin embargo, aún cuando se han realizado numerosos estudios de este péptido, sólo se tiene un reporte de su actividad antimicrobiana, contra microorganismos fitopatógenos. En el estudio de Kamiz *et al.* (2005) se reporta actividad antimicrobiana contra diferentes patovarietades de *Pectobacterium carotovorum* (*Erwinia carotovora*) y *Pectobacterium chrysanthemi* (*Erwinia chrysanthemi* *Dickeya* sp). Estos resultados son algunas de las razones importantes por las que es necesario contar con métodos alternativos de control de patógenos, a la síntesis química, que reduzcan los costos en la producción de protegrinas.

3.3. Agrobiotecnología

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 (Herrera-Estrella *et al.*, 1983). La producción heteróloga de proteínas en plantas ofrece ventajas con respecto a otros sistemas como: (1) bajos costos de producción en comparación con biorreactores, ó animales transgénicos, (2) la purificación de la proteína heteróloga es económica o puede no ser necesaria, (3) se evitan contaminaciones de 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*, virus 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). La mayoría de los protocolos para la transformación de plantas, tienen en común el uso de técnicas de cultivo de tejidos *in vitro*.



3.3.1. Cultivo de tejidos para la transformación de plantas

El cultivo de tejidos en condiciones asépticas *in vitro*, se ha logrado establecer en medios de cultivo que incluyen los macronutrientes (nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio, calcio, sulfuros y carbono) y micronutrientes (elementos adicionados en trazas como manganeso, yodo, cobre, molibdeno, hierro y zinc), los cuales la planta requiere para su desarrollo, así como condiciones controladas de luz y temperatura. Gracias a la plasticidad de las células vegetales en la que un tipo de tejido u órgano puede dar lugar a otro diferente, es posible alterar su metabolismo mediante fitohormonas, para iniciar divisiones celulares de algún tejido de la planta, y regenerar órganos en respuesta a la hormona utilizada. Esta capacidad de regeneración de plantas completas se basa en la premisa de que cualquier célula vegetal es capaz de generar una planta completa (célula totipotente).

Las fitohormonas más utilizadas en el cultivo de tejidos, para la diferenciación celular son: las auxinas (ej. AIA –ácido-indol acético), que promueven la división celular y el crecimiento celular, y las citocininas (ej. Zeatina), que promueven la división celular. La combinación de auxinas y citocininas es muy importante en la diferenciación celular, por ejemplo, mayores niveles de auxinas en relación a las citocininas se emplean para la obtención de raíz, y mayores niveles de giberelinas en relación a las auxinas favorece la formación de brotes, mientras que una concentración intermedia de estas fitohormonas, favorece la formación de callos (masas celulares no diferenciadas). La transformación de plantas involucra la utilización de un explante (pieza 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 logran el desarrollo de brotes, que después desarrollan 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.

3.3.2 Transformación nuclear mediante *Agrobacterium tumefaciens*

La capacidad de introducir material genético de diferentes organismos en el genoma de las plantas, fue posible hasta 1983, gracias a los avances en el cultivo de tejidos y al estudio y comprensión del sistema natural utilizado por la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (Argüello-Astorga y Herrera-Estrella, 1994).

Agrobacterium tumefaciens es una bacteria gram negativa del suelo que puede infectar diferentes especies de plantas dicotiledóneas. La infección que es iniciada en zonas heridas de la planta origina la formación de tumores (“agallas” o “tumores de corona”). La formación de tumores es debido a que *Agrobacterium* induce la producción de hormonas que a su vez, originan un crecimiento desordenado e indiferenciado de las células vegetales en la región dañada (de la Riva *et al.*, 1998). En la Fig. 6 se describen de forma muy resumida los mecanismos moleculares involucrados en la transferencia de ADN de la bacteria a la célula vegetal.

Los conocimientos generados del sistema de transformación natural de *A. tumefaciens*, permitieron la construcción de vectores que no contuvieran los genes involucrados en la formación del tumor y que permitieran la transferencia de ADN de la célula bacteriana a la célula vegetal de forma eficiente (Gelvin, 2000).

En la actualidad se cuenta con una amplia variedad de vectores que hacen de la transformación nuclear un sistema eficiente, en especies de plantas dicotiledóneas, e incluso algunas monocotiledóneas (Hellens y Mullineauz, 2000). Los vectores mas utilizados actualmente son los vectores binarios, que reciben este nombre debido que sus componentes se encuentran por separado.



Los genes *vir* se encuentran en un plásmido Ti desarmado (sin los genes involucrados en la formación de tumores), presente en la cepa de *Agrobacterium*, mientras que la región T-DNA involucrada en la transferencia del ADN, se encuentra en un vector que contiene un origen de replicación de *E. coli* y un origen de *A. tumefaciens*. Estas características del vector facilitan la manipulación genética en *E. coli* (Hennegan y Kathleen, 1998).

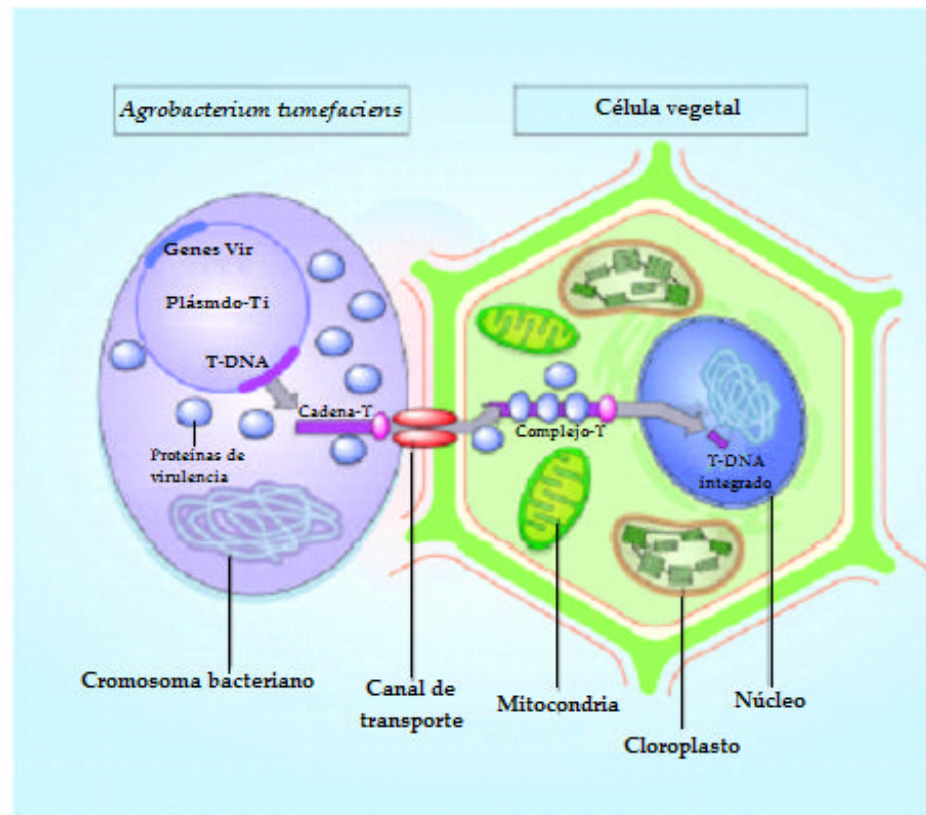


Fig. 6. Transferencia de genes por *Agrobacterium tumefaciens* a células vegetales.

Las cepas virulentas de *A. tumefaciens* contienen un plásmido de 200 kb denominado Ti (Tumor inducing). El plásmido Ti contiene dos regiones involucradas en la formación de tumores. La primera es la Región T (morado) que corresponde a un segmento de ~23 kb, flanqueadas por 25pb que constituyen sus bordes. La segunda región (celeste) denominada de virulencia (*vir*) abarca cerca de 35 kb y es responsable del procesamiento y transferencia del T-DNA. Cuando la célula vegetal es dañada, libera compuestos fenólicos de bajo peso molecular como la acetosiringona, los cuales son reconocidos por los productos de los genes *virA* y *virG*, que actúan como activadores de la transcripción del resto de los genes *vir*. El gen *virD* codifica una endonucleasa que corta específicamente dentro de la secuencia conservada de 25pb que constituye el borde derecho del T-DNA, y a partir de ese extremo se genera unidireccionalmente una hebra monocatenaria del T-DNA (T-strain), la que es transportada al interior de la célula vegetal por un mecanismo aparentemente análogo al de la conjugación bacteriana. El T-DNA transferido va recubierto por proteínas de unión a DNA de cadena sencilla, productos del gen *virE2* (círculos celeste), y llevan covalentemente unida a su extremo 5' la proteína Vir D2 (círculo rosa), la cual funciona como proteína piloto que dirige el complejo nucleoproteico (T-complejo) hacia el núcleo de la célula vegetal. El T-DNA se integra covalentemente al genoma de la planta en una o más copias distribuidas aleatoriamente (Argüello-Astorga y Herrera-Estrella, 1994; Gelvin 2000). Imagen tomada de Gelvin (2005).



La experiencia de más de 20 años de introducir material genético foráneo a las plantas (plantas transgénicas), ha permitido la generación de conocimientos, al realizar ciencia básica. Como resultado de la ciencia básica, se han generado innovaciones tecnológicas que permiten obtener cultivos con características nutricionales superiores a las tradicionales, cultivos resistentes a plagas y generación de vacunas en plantas, entre otras muchas aplicaciones de las plantas transgénicas, que permiten ó permitirán obtener beneficios sociales y económicos (Ortiz, 1998; Daniell, 2002).

3.3.3. Generalidades de la transformación de cloroplastos

La información genética en plantas se encuentra distribuida en tres compartimentos celulares: el núcleo, la mitocondria y los plástidos. Los plástidos tienen su propio genoma llamado plastoma, de un tamaño entre 120 y 180 kb (Sugiura, 2003). Las copias idénticas de plastomas por célula son de entre 1,000 a 10,000, lo que significa que en células vegetales puede haber 100 cloroplastos (plástidos verdes), que contienen 100 moléculas del plastoma. La dosis tan elevada de genomas idénticos hace a los plástidos un compartimento celular muy atractivo para la expresión en altas concentraciones de proteínas heterólogas (Maliga, 2003). Los plástidos tienen además otras ventajas para la ingeniería genética, por ejemplo no se conocen efectos epigenéticos como silenciamiento de genes y se pueden producir varias proteínas mediante operones, utilizando la misma maquinaria de regulación genética. Desde el punto de vista de bioseguridad, esta tecnología reduce significativamente la contaminación por polen transgénico, ya que los plástidos se heredan de forma materna en la mayoría de los cultivos, por lo que reduce el flujo genético de los transgenes mediante el polen (Bogorad, 2000). Desde hace 15 años se logró introducir ADN foráneo a los cloroplastos de plantas superiores. Daniel *et al.*, (1990) lograron transformar hojas de tabaco y detectar la expresión de la proteína GUS (β -glucuronidasa), de forma transitoria. En ése mismo año, Svab *et al.* (1990), lograron transformar cloroplastos de células de tabaco de manera estable. La investigación en la transformación de cloroplastos incluye trabajos en



ciencia básica y en ciencia aplicada (Maliga, 1993; 2002; 2003; 2004; Book, 2001; 2004; Daniell *et al.*, 2002). La transformación genética de los plástidos sigue los principios de la recombinación homóloga, por lo que para una transformación exitosa, el transgene tiene que estar flanqueado por secuencias que aseguren su integración en el plastoma (Bel *et al.*, 2001).

3.3.3.1. Métodos para la transformación de plástidos

A la fecha se han reportado dos métodos que permiten la transformación de cloroplastos de forma estable. El primer método reportado es el de biobalística que consiste en introducir ADN de interés adherido a microproyectiles (partículas de oro o tungsteno 0.6-1 μ m), de interés. Estos microproyectiles son disparados a alta velocidad utilizando helio, sobre hojas o células (Daniell *et al.*, 1990; Svab *et al.*, 1990). El segundo método consiste en introducir ADN dentro de protoplastos (células sin pared celular), de forma química, utilizando polietilenglicol (PEG) (Golds *et al.*, 1993; O'Neill *et al.*, 1993). El método más utilizado es el de biobalística, ya que es un método eficiente, rápido y reproducible (Golds *et al.*, 2004; Maliga, 2004) (Fig 7).

3.3.3.2. Transformación de plástidos de plantas superiores

La transformación de cloroplastos ha sido posible principalmente en tabaco debido a todas las ventajas de esta planta, que incluyen su facilidad para manipulación genética y la producción de un gran número de semillas (hasta un millón por planta). Son muy pocas las plantas en las que la transformación de cloroplastos ha sido estable (Maliga, 2004). Los puntos críticos en la transformación de cloroplastos son el diseño de vectores, ya que la integración del transgén ocurre mediante recombinación homóloga. Aún cuando se tienen reportes que vectores específicos de cloroplasto de tabaco pueden ser efectivos para transformar otros sistemas vegetales lo ideal es diseñar vectores específicos para cada especie a transformar a que la transformación de

plástidos esta mediada por un evento de recombinación homóloga (Bock y Khan, 2004).

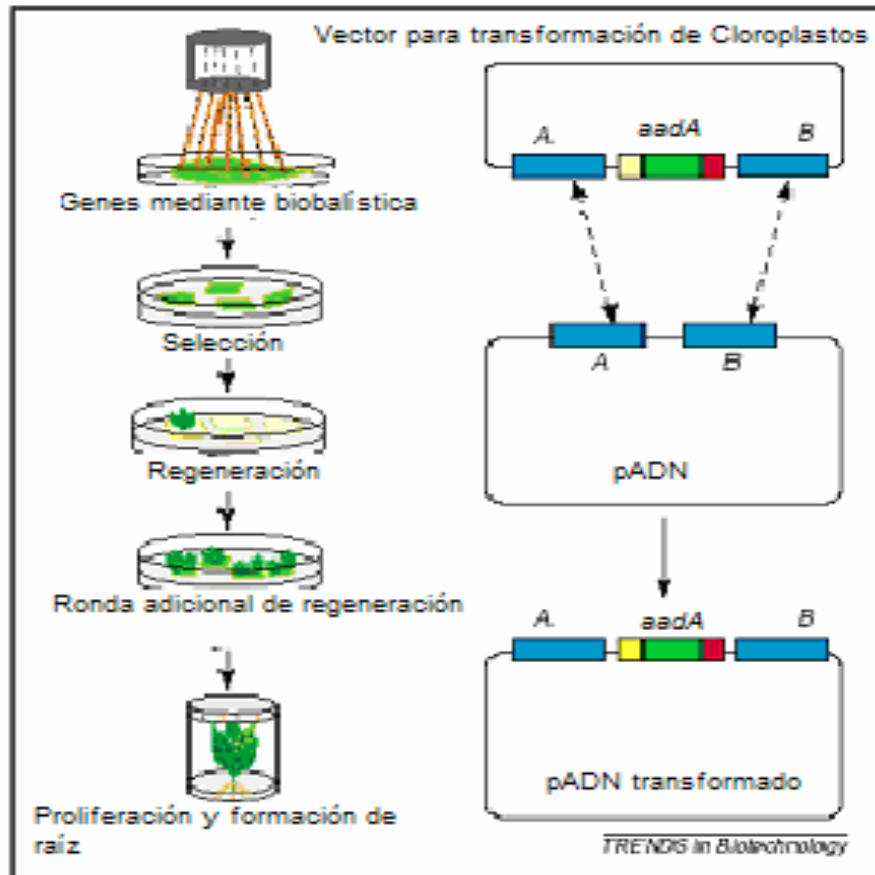


Figura 6. Transformación de cloroplastos mediante biobalística e integración del transgén en el genoma del cloroplasto por recombinación homóloga. A la izquierda: el vector de transformación, adherido a micropartículas de oro o tungsteno, es disparado a explantes de hoja. La hoja se corta en pequeñas piezas y se pone en un medio para regeneración que contiene el antibiótico espectinomicina. Debido a que no todos los cloroplastos de la célula son transformados por la biobalística, las transformantes primarias son heteroplásticas, por esto y gracias a que el vector de transformación contiene el gen de resistencia a espectinomicina (*aadA*), se realizan rondas adicionales de regeneración con este agente de selección (espectinomicina) hasta que los plastomas silvestres son eliminados. Finalmente los brotes homoplásmicos se transfieren a medio libre de fitohormonas, para inducir la formación de raíz. A la derecha: las letras A y B corresponden a las secuencias de las regiones intergénicas del genoma de los plástidos (pADN). El gen *aadA* se encuentra flanqueado por la región promotora y la secuencia Shine–Dalgarno y una región 3'UTR no traducible (rojo), que le confieren estabilidad al transgén. La integración del transgén al plastoma ocurre por dos eventos de recombinación homóloga (flechas punteadas). El cassette del transgén consiste de los siguientes componentes: Promotor → Shine–Dalgarno → Región codificante (*aadA*) → 3' UTR. **Imagen modificada de:** Bock y Khan (2004).



Las plantas superiores tienen varios tipos de plastidos: cloroplastos (plástidos con clorofila), cromoplastos (plástidos con carotenoides); los amiloplastos (plástidos con almidón), elaioplastos (plástidos con aceites), proplastidos (plástidos precursores) y finalmente etioplastos (cloroplastos parcialmente desarrollados). Bogorad (2000) sugiere que algunas proteínas se podrían almacenar de forma más estable en ciertos plástidos de acuerdo a sus características, es por esto que él sugiere transformar diferentes plantas superiores, con la certeza de que un vector específico de especie será suficiente para transformar cualquier plástido presente en la planta. La Tabla 2 resume las plantas en las que la ingeniería de cloroplastos ha sido posible.

Tabla 2. Transformación de cloroplastos de plantas superiores

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

Modificado de Heifetz, (2000)



3.4. Producción heteróloga de péptidos antimicrobianos en plantas

Se sabe que las plantas de forma natural tienen diferentes mecanismos de defensa contra los microorganismos invasores. Entre las formas de defensa de las plantas destaca la producción de péptidos catiónicos, conocidos como defensinas por su homología con las defensinas de mamíferos (Lay *et al.*, 2003).

Sin embargo, dado que las plantas no son resistentes a todos los microorganismos, mediante la introducción y expresión de genes heterólogos de péptidos antimicrobianos, actualmente se han obtenido plantas que son capaces de defenderse de microorganismos fitopatógenos, a los que de forma natural no les era posible. En la Tabla 3 se presentan algunos trabajos en los que se han obtenido buenos resultados al introducir genes antimicrobianos a las plantas. Sin embargo, no todas las plantas son resistentes a algunos microorganismos, por lo que en la actualidad se ha logrado introducir genes foráneos de péptidos antimicrobianos al genoma de las plantas. Se han obtenido plantas que son capaces de combatir microorganismos fitopatógenos, que de forma natural no les es posible. En la Tabla 3 se pueden ver algunos de los trabajos en los que se han obtenido buenos resultados al introducir genes antimicrobianos a las plantas.

**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 <i>et al.</i> , 1995.
Papa	Cecropina B	<i>H. cecropia</i> (I)	<i>Erwinia</i> sp.	Allefs <i>et al.</i> , 1995.
Tabaco	Rs-AFP2	<i>Raphanus sativus</i> (P)	<i>Alternaria longipes</i>	Epple <i>et al.</i> , 1997.
Tabaco	Cecropina B	<i>Hyalophora cecropia</i> (I)	<i>Pseudomonas solanacearum</i>	Jaynes <i>et al.</i> , 1993.
Tabaco	a-Tionina	<i>Hordeum vulgare</i> (P)	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	Carmona <i>et al.</i> , 1993.
Tabaco	D4E1	Sintético	<i>A. flavus</i> , <i>Verticillium dahliae</i> , <i>Colletotrichum destructivum</i>	Cary <i>et al.</i> , 2000.
<i>Arabidopsis</i>	RsAFP2 DmAMP1-	<i>Raphanus sativus</i> <i>Dahlia merckii</i> (P)	<i>Fusarium culmorum</i>	Francois <i>et al.</i> , 2002.
Tabaco	Esculentin-1	<i>Rana esculenta</i> (A)	<i>P. syringae</i> pv. <i>Tabaci</i> ; <i>P. aeruginosa</i>	Ponti <i>et al.</i> , 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	Osuski <i>et al.</i> , 2000.
Tomate	alf-AFP	<i>Medicago sativa</i> (P)	<i>Verticillium dahliae</i>	Gao <i>et al.</i> , 2000.
Rosa	Ace-AMP1	<i>Allium cepa</i> (P)	<i>Sphaerotheca pannosa</i>	Li <i>et al.</i> , 2003.

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

3.5. Características de sistemas vegetales de tomate, zanahoria y lechuga

La lechuga, el tomate y la zanahoria se encuentran entre los principales vegetales consumidos frescos, según reportes estadísticos del 2003 del Departamento de Agricultura en los Estados Unidos (USDA) (Canene-Adams *et al.*, 2005). La producción de estos vegetales se encuentra ampliamente



distribuída a nivel mundial. La producción de proteínas heterólogas en estos sistemas vegetales, ofrece ventajas como sistemas de producción sencilla, la distribución a nivel mundial y finalmente, que la proteína es funcional *in situ*. Las plantas pueden ser liofilizadas para su posterior utilización en la industria, la farmacéutica o el consumo alimenticio. A la fecha se han publicado varios trabajos donde el cultivo de tejidos y la producción de plantas transgénicas de estos sistemas vegetales, ha sido posible de forma eficiente (Pileggi *et al.*, 2001; Ruf *et al.*, 2001; Blouin *et al.*, 2003).

3.5.1. Tomate (*Lycopersicum esculentum*)

El tomate pertenece a la familia de las Solanaceas. Dado que México se considera el centro de domesticación de esta planta, se dice que el jitomate o tomate rojo, es la aportación vegetal de nuestro país más extensiva a nivel mundial. México ocupa el décimo lugar a nivel mundial como productor de jitomate, pero es el tercer comercializador del producto en el mundo (Claridades agropecuarias, 1998). A nivel nacional, ocupa el primer lugar de exportaciones hortícolas. Los principales productores a nivel nacional hasta el 2000 son: Sinaloa (39.9%), Baja California (14.7%) y San Luis Potosí (7.9%) (SAGARPA, 2000).

Las propiedades nutricionales del tomate, incluyen la presencia de minerales como fósforo, hierro, calcio, magnesio, manganeso, zinc, cobre, potasio y sodio, y es rico en Vitaminas A y C, además que contiene glutatión, un antioxidante natural. De los componentes del tomate, el que más destaca es el licopeno (carotenoide que confiere el color rojo). Se ha demostrado en diferentes estudios, que el licopeno entre otras características, es un anticancerígeno principalmente de cáncer de próstata (Canene-Adams *et al.*, 2005).



3.5.2. Zanahoria (*Daucus carota*)

La zanahoria pertenece a la familia de las Umbelliferae y es una especie originaria del centro asiático y del mediterráneo. Ha sido cultivada y consumida desde la antigüedad por griegos y romanos. Durante los primeros años de su cultivo, las raíces de la zanahoria eran de color violáceo. El cambio de éstas a su actual color naranja se debe a las selecciones ocurridas a mediados de 1700 en Holanda, lo que aportó una gran cantidad de caroteno, el pigmento causante del color, y que han sido base del material vegetal actual.

México se encuentra entre los principales 15 productores de zanahoria a nivel mundial (InfoAgro, 2002), donde Asia y Europa ocupan los primeros lugares en su producción.

Las cualidades nutricionales de las zanahorias son importantes, principalmente por la producción de β -carotenos que son productores de la Vitamina A, otros compuestos de la zanahoria incluyen potasio, fósforo, sodio, calcio y magnesio, además de vitaminas C, B6, niacina y ácido fólico (InfoAgro, 2003).

3.5.4. Lechuga (*Lactuca sativa*)

La lechuga es una planta herbácea, dicotiledónea 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 Luis 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 del cultivo de lechuga es que la parte consumible de la planta son las hojas, además que es una planta de rápido desarrollo, por lo que se obtiene un producto comestible y comerciable en un corto tiempo.



IV. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Obtención de plantas transgénicas y transplastómicas que expresen péptidos antimicrobianos de Protegrinas

4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir vectores binarios para la transformación nuclear mediante *A. tumefaciens* y expresión del gen antimicrobiano de PG1
- Transformación nuclear de zanahoria, tomate y lechuga mediante *Agrobacterium tumefaciens* y regeneración
- Demostrar la integración del transgén mediante PCR
- Evaluar la actividad antimicrobiana de extractos protéicos de las plantas transgénicas regeneradas
- Transformar cloroplastos de tabaco, con las construcciones generadas, utilizando el método de biobalística
- Construir vectores para la expresión de las protegrinas PG1, PGIB367 y PG3cc, fusionadas a ubiquitina, en cloroplasto.
- Regeneración de plantas transplastómicas



V. HIPÓTESIS

Es posible introducir genes sintéticos de péptidos antimicrobianos al genoma nuclear y de cloroplastos de sistemas vegetales, para desarrollar plantas transgénicas y transplastómicas con la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos.



VI. Material y Equipo

6.1. Material biológico

Material biológico	Proveedor
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> LB4404: Fondo cromosómico TiAch5 marcador de selección cromosómico a rifampicina, Plásmido Ti: pAL4404 marcadores de selección del plásmido Ti: espectinomycin y estreptomycin.	Cepario donado por el Dr. W. Cress al IPICYT.
<i>Escherichia coli</i> Top 10 F' : F' { <i>lacIq Tn10 (TetR)</i> } <i>mcrA</i> .(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) F 80 <i>lacZ</i> .M15 . <i>lac?</i> 74 <i>recA1</i> <i>deoR araD139</i> .(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK</i> <i>rpsL (StrR) endA1 nupG</i>	Donadas por el Dr. Gerardo Argüello Astorga del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.
<i>Escherichia coli</i> DH5a F' / <i>endA1 hsdR17 (r_k⁻ m_k⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA (Nal^r) relA1D (lacIZYA-argF)U169 deoR (j80dlacD(lacZ)M15)</i>	Donadas por el Dr. S.S. Korban de la Universidad de Illinois en Urbana-Champaign.
Semillas de Zanahoria (<i>Daucus carota</i>)	Donadas por la M.C. María Teresa Olivera de la Universidad Autónoma de México.
Semillas de Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)SR1 variedad Petite havana	Donadas por el Dr. S.S. Korban de la Universidad de Illinois en Urbana-Champaign, U.S.A.
Semillas de Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>) Variedad isogénica Ailsa Craig (AC) y la UC82B	AC, Donada por el Profesor Don Grierson de la Universidad de Nottingham UC82B, Donada por Dra. Carolina Cortina de la Universidad Politécnica de Valencia.
Semillas de lechuga (<i>Lactuca sativa</i>).Variedad Green Wave	Donadas por el Dr. Masaru Nakano de la Universidad de Niigata., Japón



6.2. Vectores utilizados

Vector y características	Proveedor
pBluescriptSKII(+) : Vector de clonación	Stratagene, Inc
Topo Zero Blunt End® : Vector de clonación.	Invitrogen.
TopoT4 cloning® : Vector de clonación	Invitrogen
pBI221 : Vector para expresión transitoria que incluye un cassette de expresión con el promotor 35S completo del virus del mosaico de la coliflor, fusionado al gen GUS y al terminador NOS. Agente de selección para Ampicilina en <i>E.coli</i> .	Clontech, Labs. Donado por Dr. S.S. Korban.
pBI121 : Vector binario que incluye un cassette de expresión con el promotor 35S completo del virus del mosaico de la coliflor, fusionado al gen <i>gusA</i> y al terminador NOS	Clontech, Labs. Cepario donado por el Dr. W. Cress al IPICYT
pCAMBIA1304 y pCAMBIA 2201 Vectores binarios que incluyen un cassette de expresión con el promotor 35S completo del virus del mosaico de la coliflor, fusionado al gen <i>mgfp5-gusA-His6</i> GUS-GFP y al terminador NOS.	Cepario donado por el Dr. W. Cress al IPICYT

6.3. Reactivos y suplementos

Reactivo	Proveedor
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)	Phyto Technology Lab
Ácido ascórbico	Sigma Chemical Co.
Ácido bórico	Sigma Chemical Co.
Ácido Indol Acético (AAI)	Phyto Technology Lab.
Ácido molíbdico	Sigma Chemical Co.
Ácido naftalenacético (ANA)	Sigma Chemical Co.
Ácido nicotínico	Sigma Chemical Co.
Acetato de potasio	Sigma Chemical Co.
Acido clorhídrico	Industrial Kem de León S.A. de C.V.
Ácido fosfórico	J.T. Baker



Adenina	Phyto Technology Lab
Agar grado bacteriológico	Invitrogen
Agar grado micropropagación	Phyto Technology Lab.
Agarosa	Promega
Albúmina de suero bovino	Sigma Chemical Co.
Alcohol isoamílico	Industrial Kem de León S.A. de C.V.
Ampicilina	Sigma Chemical Co.
Anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina	Sigma Chemical Co.
Anticuerpo monoclonal anti-Ubiquitina Cat sc-8017	Santa Cruz, Biotechnology
Bencilaminopurina	Sigma Chemical Co.
Bicarbonato de sodio	J.T. Baker
Bromuro de etidio	Promega
Buffer de reacción para PCR	Promega
Carbonato de sodio	Sigma Chemical Co.
Caseína	Phyto Tecnology Lab.
Cefotaxima	Laboratorios Kendrick
Cinetina	Phyto Tecnology Lab.
Cloroformo	Industrial Kem de León S.A. de C.V.
Cloruro de calcio	Riedel de Haen
Cloruro de cobalto	PhytoTechnology Lab.
Cloruro de magnesio	Promega
Cloruro de sodio	J.T. Baker
Desoxinucleótidos trifosfato (dATP,dCTP,dGTP,dTTP)	Promega
Dodecil sulfato de sodio (SDS)	USB
EDTA	Phyto Technology Lab.
Enzimas de restricción (<i>Bam</i> HI, <i>Nco</i> I, <i>Sac</i> I, <i>Spe</i> I, <i>Bsal</i> ,)	Promega, Roche y New England Biolabs
Espectinomicina dihidrocloruro	Sigma Chemical Co.
Etanol	Industrial Kem de León S.A. de C.V.
Extracto de levadura	Fluka
Fenol	Invitrogen
Fosfato de potasio	J.T. Baker



Fosfato de sodio	Sigma Chemical Co.
Fosfato monobásico de potasio	J.T. Baker
Glicerol	Sigma Chemical Co.
Glicina	Riedel de Haen
Hidróxido de sodio	Industrial Kem de León S.A. de C.V.
Higromicina B	Sigma
Hipoclorito de sodio	Cloralex
Isopropanol	Industrial Kem de León S.A. de C.V.
Kanamicina	GIBCO BRL
Kit QIAEXII® gel extraction kit (purificación de ADN de fragmentos de agarosa) Cat No. 20021	Qiagen
Kit Dig-Detection (Anti-digoxigenin) Cat. No. 1 531 042	Roche Diagnostic
Kit QIAquick® PCR purification Cat No. 28104	Qiagen
Kit QIAprep® spin miniprep Cat No. 27106	Qiagen
Kit Maxi Plasmid Qiagen® Cat No. 12162	Qiagen
Kit Biolistic Optimization Bio-Rad Cat No. 1652278	Bio-Rad
Kit Dura extendet duration substrate trial Super Signal West Cat No. 37071	Pierce
Kit Pico Green	Sigma Chemical Co.
Leupeptina	Sigma Chemical Co.
Manitol	Sigma Chemical Co.
Marcador de ADN de 1 kb	Invitrogen
Microdín	Laboratorio Lacami S.A. de C.V.
Myoinositol	Phyto Technology Lab.
Nitrato de amonio	Sigma Chemical Co.
Nitrato de potasio	Riedel de Haen
Oligonucleótidos	Invitrogen
Piridoxina	Sigma Chemical Co.
Plásmido pGem-T easy	Promega
PMSF	Sigma Chemical Co.
p-Nitro fenil fosfato	Sigma Chemical Co.
RNAsa	Roche



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

6.4. 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.
Espectrofotómetro, nanodrop ND1000	NanoDropTechnologies, U.S.A
Fluorómetro mod. Genios	TECAN, Austria
Fotodocumentador de geles mod. EpiChemi3 Darkroom	UVP, U.S.A.
Fotodocumentador de geles Kodak Imager mod. 2000R	Kodak, 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 biobalísticaPDS-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
Termociclador mod. PTC-100TM	MJ Research, U.S.A
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.

VII. Metodología

7.1. Preparación de soluciones y medios de cultivo

7.1.1. Medios de cultivo para plantas

Las plantas necesitan de macronutrientes y micronutrientes para su desarrollo. El medio base que se utilizó en el presente trabajo es el Murashige and Skoog (MS). Los compuestos para preparar el medio, se enlistan en el Apéndice 11.1, 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 80ml de cada una de las cinco soluciones (100X), se aforaron a 4 litros y se almacenaron a 4°C.

7.1.1.1. Procedimiento para preparar medios de cultivo para plantas

El medio de cultivo MS, se preparó pesando 4.3g de MS (Phytotechnology®) y se agregaron 800 ml de agua. Posteriormente se agregaron 30 gramos de sacarosa, los reguladores de crecimiento y las vitaminas necesarias, además de ajustar el pH a 5.7 o 5.8 de acuerdo a las necesidades de la planta. El pH fue ajustado con hidróxido de sodio 1.0 ó 0.1N y ácido clorhídrico 1.0 ó 0.1N y se ajustó el volumen a 1l.

Si no se contaba con las sales MS en polvo de Phytotechnology®, se midieron 500 ml de la mezcla de sales MS 2X descrita previamente, y se agregaron 300 ml de agua desionizada. Después de esto, se continuó con el mismo procedimiento empleado cuando se utiliza el polvo MS Phytotechnology®, finalmente se aforó a 1 litro 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 11.1 y 11.3 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.

7.1.2. Preparación de 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), *Lycopersicon esculentum* (tomate) y *Daucus carota* (zanahoria), se describen en las Tablas en el Apéndice 11.2.

7.1.3. Preparación de antibióticos, hormonas y agentes antioxidantes

El suministro de hormonas y agentes antioxidantes en los medios de cultivo para plantas, es un elemento muy importante en el cultivo de tejidos. Los antibióticos se utilizaron para realizar la selección de plantas transgénicas ó para la selección de bacterias que contuvieran el ADN de interés.

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 espectinomicina dihidrocloruro 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.

Cefotaxima: Se utilizó un antibiótico de marca genérica. Para un stock de 250 mg/ml, se agregó 1 gramo de Cefotaxima a cuatro mililitros de agua desionizada estéril.

Higromicina B: Para un stock de 50 mg/ml, se disolvieron 0.5 gramos de Higromicina B en agua desionizada. Se aforó a 10 ml, se esterilizó por filtración (filtro Miller-GP, 0.2 μ m) y se almacenó a -20 °C.

Hormonas

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 100ml 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.

Cinetina (Cin): Para un stock de 1.0 mg/ml, se pesaron 100 mg de cinetina 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.

Ácido Indol Acético (AAI): Para un stock de 1.0 mg/ml, se pesaron 100 mg de AAI 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.

Zeatina: Para un stock de 2.0 mg/ml, se pesaron 25 mg de Zeatina y se disolvieron en 1.0 ml de hidróxido de sodio 1N, se aforó a 50 ml con agua desionizada estéril. Se esterilizó por filtración (filtro Miller-GP, 0.2 µm) y se almacenó a -20°C.

Tidiazuron (TDZ): Para un stock de 1.0 mg/ml, se pesaron 50 mg de tidiazurón y se disolvieron en 1.0 ml de Dimetil sulfóxido (DMSO), se aforó a 50 ml con agua desionizada estéril y se almacenó a -20 °C.

Agentes antioxidantes

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

Adenina: Para preparar un stock de 10mg/ml se pesan 500mg de adenina y se aforan en 50 mililitros de agua desionizada estéril, y se almacenó a -20°C.

7.1.4 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 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 Mac Conckey:. Para preparar un litro de medio, se pesaron 50 g del polvo, se disolvió en desionizada, se aforó a un litro y se esterilizó en autoclave a 15 lb/pulgada² durante 15 minutos.

Medio de cultivo Agar Sangre: Para preparar un litro de medio, se pesaron 40 g de agar sangre base polvo, se disolvió en agua desionizada, se aforó a un litro y se esterilizó en autoclave a 15 lb/pulgada² durante 15 minutos. Después de esterilizar el medio, fue necesario esperar a enfriar a una temperatura de aproximadamente 50°C, para posteriormente agregar sangre humana aproximadamente al 5% ó hasta tener un color rojo brillante.

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 Tripticasa 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.

7.1.5. Preparación de soluciones

Las soluciones empleadas en la mayoría de los experimentos se prepararon de acuerdo a las instrucciones del manual de Sambrook *et al.* (1989).

TAE 50X: 242g 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 100ml, se añadió un gramo de agarosa y se aforó a 100 ml de

TAE 1X, se calentó en microondas hasta disolver y la agarosa no utilizada se almacenó a temperatura ambiente.

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 7.2 con ácido clorhídrico 1 N/hidróxido de sodio 1.0 N, se aforó con agua desionizada.

7.2. Aislamiento y purificación de ADN

7.2.1. 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. El método alternativo se describe a continuación:

Miniprep método de lisis alcalina de Birbioim (BD) Sambrook *et al.*, (1989).

Solución I

EDTA 10mM pH 8.0
Tris-HCl 25mM pH 8.0

Solución II

NaOH 0.2N
SDS 1%

Solución III

Acetato de Potasio 3M
Ácido acético glacial
5.75ml

Se tomó 1.5 ml de cultivo bacteriano crecido en el medio de selección apropiado durante 12 horas. Se centrifugó a 12, 000 rpm por 4 minutos, se eliminó el

sobrenadante. Se añadió 150 µl de la solución I de Birbioim (BD) se resuspendió la pastilla con vórtex. Se agregaron 300 µl de la solución II de BD recién preparada, se agitó por inversión 5 veces, hasta ver 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 se recuperó la fase acuosa.

Cuando fué necesario se agregó un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló suavemente y se centrifugó 5 minutos a 10,000 rpm de lo contrario se precipitó el ADN recuperando 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 12,000 rpm por 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 300 µl de etanol al 70 %, se centrifugó por 5 minutos a 12,000 rpm, se desechó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla por un periodo de aproximadamente 10 minutos. Se agregó RNAsa (20µg/ml), y se incubó a 37°C por 30 minutos, nuevamente se agregó fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y se precipitó el ADN con acetato de sodio 3M pH 7.0 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 20 µl de agua milli "Q".

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:

Maxiprep modificado de Sambrook *et al.*, (1989)

Se inocularon 2ml de un cultivo bacteriano fresco en un matraz con 200ml de LB con el antibiótico necesario y se incubó durante la noche a 37°C, con agitación

vigorosa a 300rpm. Se centrifugó el cultivo bacteriano a 6,000 rpm a 4 °C, durante 10 minutos.

Se añadieron 5ml de la solución I (BD) y se resuspendió la pastilla de bacterias utilizando la fuerza mecánica del vórtex, 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 13,000 rpm a 4 °C y se filtra el sobrenadante utilizando una gasa estéril en un tubo para centrífuga. Al sobrenadante filtrado se le agrega un volumen de isopropanol frío y se incuba a -20°C durante 20 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 1ml de TE1X ó agua destilada estéril con 20µg/ml de RNasa. Se incuba durante 1 hora a 37 C y se agrega un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se centrifuga 10 minutos a 5,000 rpm en una microcentrífuga, recupera la fase acuosa y se repite este lavado por segunda ocasión. Se recupera el sobrenadante y se agrega un volumen de isopropanol frío más 1 volumen de acetato de sodio 3M pH 7.0 Se incuba durante 1 hora a -20 C y se centrifuga durante 15 minutos a 12,000rpm. Se elimina el sobrenadante y se lava la pastilla con etanol al 70%, se seca la pastilla y se resuspende el DNA en agua destilada estéril ó en TE1X.

7.2.2. Extracción de ADN de plantas

Método de extracción de Michiels *et al.* (2002)

Buffer de extracción*
Tris 100mM pH 8
NaCl 1.4 M
EDTA 20mM, pH 8.0
Beta-Mercaptoetanol
0.2% (v/v)

Solución de lavado
Acetato de amonio
10mM
Etanol 70%

Buffer TE 1X
Tris 10mM, pH 8.0
EDTA 1mM

*Se esterilizan los componentes y se añade 2% de polivinilpirrolidona y 2% de CTAB inmediatamente antes de usarse.

Método de extracción de Michiels *et al.* (2002) modificado

Se congelaron 50 mg de tejido vegetal en nitrógeno líquido, se trituraron en un tubo eppendorff con un pistilo de plástico y se adicionaron 750 μ l de buffer de extracción a 60°C y se mezcló con cuidado. Se incubaron las muestras a 60°C por 60 minutos mezclando ocasionalmente para evitar agregaciones en el homogenizado. Se añadieron 750 μ l cloroformo-alcohol isoamílico (24/1) sobre el extracto, se agitó con vortex y se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 minutos. La fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo para repetir el lavado con cloroformo-alcohol isoamílico (24/1), hasta limpiar la fase acuosa. Se mezcló la fase acuosa con 2/3 de volumen de isopropanol frío, y se mezcló por inversión y se incubó a 25°C durante toda la noche (25°C es mejor que 4°C, utilizados comúnmente). Se centrifugó a 13,000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo y se añadieron 750 μ l de solución de lavado. Se resuspendió la pastilla en la solución de lavado y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se centrifugó a 10,000 rpm por 6 minutos y se repitió el lavado. Se eliminó el sobrenadante y se secó la pastilla al aire, se resuspendió la pastilla en 50 μ l buffer TE1X y se incubó a 37°C con RNasa en una concentración final de 10 μ g/ml, durante 30 minutos. Se añadió un volumen de fenol-cloroformo y se mezcló vigorosamente para formar una emulsión y se centrifugó durante 5 minutos a 10,000 rpm. Se transfirió la fase superior a un tubo de centrifuga estéril y se repitió la extracción con fenol cloroformo-alcohol isoamílico (25/24/1) y con cloroformo alcohol-isoamílico (24/1). Se añadió acetato de amonio, 7.5M a pH 7.7, en una concentración final de 2.5 M y dos volúmenes de etanol frío a la fase acuosa transferida. Se mezcló y se incubó en hielo por algunos minutos. Se precipitó por centrifugación a 13 000rpm, durante 10 minutos a 4°C. Se lavó la pastilla dos veces con etanol al 70%, se secó al aire y se resuspendió en 30 μ l de agua libre de nucleasas. El ADN se almacenó a -20°C.

7.2.3. Métodos de cuantificación de ADN

Nanodrop: Es un método espectrofotométrico de cuantificación en el que se utiliza el equipo Nanodrop (NanoDropTechnologies). Se utiliza 1µl de agua o buffer en el que se haya resuspendido el ADN, como blanco, se baja el detector para hacer la lectura, después se seca el detector y se agrega 1µl ADN a cuantificar, se pueden ver las lecturas directamente en la pantalla y finalmente se limpia el detector con agua destilada.

Espectrofotometría: La cuantificación se realiza utilizando un espectrofotómetro (Beckman). La muestra se prepara haciendo una dilución 1:200 con 5µl del ADN en 995µl 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/µl.

Fluorómetro: 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 µl de esta solución en placas de 96 pozos. Se añadieron 2 µl de la solución problema y se realizó la medición de fluorescencia (a 485nm excitación/535nm emisión). Para la curva de calibración se emplearon estándares de 1,10 y 50 ng/µl y los datos fueron analizados en el software Magellan 4.

Gel de calidad de DNA: 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 1kb, 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, lo cual no la hace tan confiable como las anteriores, pero es muy útil cuando se desea saber si el DNA no se encuentra degradado.

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

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

Las reacciones de amplificación de genes mediante PCR fueron aplicadas en diferentes experimentos de este trabajo. Las reacciones difieren en algunos parámetros modificados a partir del protocolo sugerido para la enzima Taq Platinum *Pfx* de Invitrogen, a continuación se presenta una tabla con los parámetros utilizados en cada caso particular.

Tabla 4. Condiciones para la amplificación mediante PCR

Componentes	Amplificación de DNA con alta fidelidad	Conc. Final	Identificación de plantas transgénicas ó transplastómicas	Conc. Final
Oligo F (10µM)	1µl	0.3µM	1µl	0.3µM
Oligo R (10µM)	1µl	0.3µM	1µl	0.3µM
dNTP's (10mM)	1µl	0.3mM	1µl	0.3mM
MgSO ₄ (50mM)	1µl	1mM	--	--
MgCl ₂ (50mM)	--	-	1µl	1mM
Buffer 10X Pfx polimerasa	5µl	1X	--	--
Buffer 10X Taq DNA polimerasa*	--	-	5µl	1X
PCRx Enhancer	1µl	1X	--	--
Platinum Pfx taq polimerasa 4U/µl	0.5µl		--	
Taq DNA polimerasa*	--		1µl	
H ₂ O	38µl			
ADN Plantas (50ng-200ng/µl) ó ADN plasmídico dil (~ 20ng/µl)	1µl		1µl	
Volumen Final	50µl		50µl	

* Taq Polimerasa expresada y purificada en el laboratorio de Biología molecular de plantas

Se llevaron a cabo las reacciones de PCR bajo condiciones controladas de temperatura de desnaturalización, hibridación y polimerización. Se utilizó el equipo TouchGene (Techne) ó el termociclador PTC-100TM de MJ Research (Tabla 5).

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	64	0.5	<i>Alineamiento</i>
4	68	3	<i>Extensión</i>
5		34 ciclos al paso 2	
6	68	7	<i>Extensión prolongada</i>

Condiciones de la reacción para la extensión de oligonucleótidos sintéticos

Cuando fue necesario alinear y extender los oligos sintéticos para la secuencia promotora y región 5'UTR, se utilizaron los oligonucleótidos a una concentración de 100µM. Para favorecer la extensión de los primers se utilizaron condiciones de temperatura similares a las utilizadas para realizar el PCR, la única temperatura diferente fue la de alineamiento, en la que se utilizaron 57°C.

Componentes de reacción para la extensión de oligonucleótidos

Oligo F (100µM)	5µl	10µM
Oligo R (100µM)	5µl	10µM
dNTP's (10mM)	1.5µl	0.3mM
MgSO ₄ (50mM)	1.0µl	1.0mM
Buffer Amp 10X	5µl	1X
Platinun Pfx taq polimerasa	0.5µl	1U/µl
H ₂ O	32.5µl	
Volumen final	50µl	

7.4. Manipulación enzimática del ADN

7.4.1. Reacciones de digestión y purificación de ADN

Digestión para caracterización de clonas positivas:

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

Purificación de fragmentos de DNA, a partir de un producto de digestión

Se realizaron digestiones utilizando aproximadamente de 1 a 5µg de DNA, 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 37° C por espacio de 4 horas o durante toda la noche a la temperatura sugerida por el proveedor. Posteriormente el producto de la digestión fue corrido en geles de agarosa del 1-2% dependiendo del tamaño del fragmento de ADN de interés y la banda de interés observada brevemente con intensidad baja de luz UV fue cortada utilizando un bisturí limpio, finalmente se utilizó el QIAquick Gel Extraction kit de Qiagen, y siguiendo las instrucciones del proveedor, se purificó el ADN.

7.4.2. Reacciones para generar extremos romos

El procedimiento para generar extremos romos con el fragmento Klenow de la Polimerasa fue el siguiente de acuerdo a las recomendaciones del fabricante: aproximadamente 800ng de ADN con extremos cohesivos 5', 2µl de Buffer 10X, 1µl de dNTP's 10mM, 1µl de Klenow (2U/µl) y agua desionizada estéril para 20µl de volumen de reacción y se incubó 20 min a 37°C.

7.4.3 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 de Gibco o de alguna otra compañía, se agregó el Buffer de reacción 10X, en un volumen total de 20 µl de reacción.

Ejemplo de reacción común:

Inserto.....x µl
Vectory µl
10X Bufer de ligación.....2µl
H₂O destilada(7-x-y) µl
T₄ DNA ligasa (1u/µl).....1µl
Volumen final20µl

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

Métodos para desalar productos de ligación

Posterior a la ligación fue necesario eliminar las sales remanentes de la ligación, para disminuir la conductancia y así reducir el shock durante la electroporación del ADN en la célula electrocompetente, a continuación se presentan los dos métodos empleados:

Método de diálisis con membrana Millipore® : Se enjuaga una caja petri con agua estéril, y se llena con agua desionizada estéril y se coloca una membrana de diálisis de Millipore® de 0.25µm con el producto de la ligación. Se deja dializar durante 20 minutos y se recolecta el DNA.

Método de diálisis utilizando Agarosa: Se prepara agarosa 1% en agua con 100mM de glucosa. Se disuelve la agarosa y se vacía en tubos Eppendorf de 1.5 o 2ml, con mucho cuidado antes de que solidifique se pone una punta de micropipeta de 200µl, para que se forme un pocito. Cuando la agarosa solidifica se retira la puntilla y en el pocito se agrega el producto de la ligación. Se dejan en hielo durante una hora y treinta minutos. Finalmente se recupera el producto de la ligación y este se encuentra listo para ser electroporado. Este DNA sólo funciona hasta 10 días después de haber sido desalado.

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

Transformación mediante electroporación

El método de electroporación permite la introducción del ADN, mediante la formación de poros en la membrana celular, utilizando un choque eléctrico

Preparación de células electrocompetentes

Se prepararon células competentes a partir de un cultivo de *E. coli* DH5a ó de Top10´F. Se crecieron las bacterias durante toda la noche, en 500ml de caldo LB a 37°C. Se centrifugó el cultivo bacteriano a 5000 rpm a 4°C. La pastilla del cultivo

bacteriano se resuspendió en 100 ml de agua destilada estéril fría, se centrifugó nuevamente a 5,000 rpm a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 100 ml de glicerol al 10% estéril, este paso de centrifugación y resuspender en glicerol al 10% estéril, se repitió durante 3 veces. Después de la última centrifugación se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en glicerol 10% en un volumen de 3 a 5 ml. Finalmente se hicieron alícuotas de 100µl, en tubos de 1.5ml y se congelaron con nitrógeno líquido, para mantenerlos a -70°C.

Método de electroporación

Las cubetas para electroporación de 1mm (Bio-Rad) y el ADN se depositan en hielo, las células competentes se depositan en la cubeta previamente enfriada. Se agrega 1µl de ADN purificado ó 3-5µl de ADN proveniente de un producto de ligación previamente desalado. Se da un pulso de corriente eléctrica con el equipo Gene Pulser II de Bio-Rad (25µF, 200Ω, 2.0 kV). Después de la transformación se agrega inmediatamente 1ml de LB y se incubó durante 40 minutos a 37°C y 150 rpm. Se tomaron 100 µl del cultivo y se inocularon en agar LB con 100 mg/l de kanamicina o ampicilina, según el caso.

Transformación mediante choque térmico

En el método de choque térmico, las bacterias son tratadas con Cloruro de Calcio, para tener una membrana celular que puede permitir la formación de poros, estas células son sometidas a choque térmico, para introducir el ADN de interés dentro de la célula (Sambrock *et al.*, 1989).

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 250 µl y se añadieron a 25 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 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 μ l de cloruro de calcio 0.1 M + 15% glicerol y se almacenaron a -70 °C en alícuotas de 30 μ l.

Método de transformación mediante choque térmico

Para realizar la transformación, las células competentes se descongelaron sobre hielo y se añadió 3.0 μ l del ADN, 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 de kanamicina o ampicilina, según el caso.

7.6. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* con los plásmidos recombinantes

Medio de cultivo YM:

Extracto de levadura 400 mg
Manitol 10 g
Cloruro de sodio 100 mg
Sulfato de magnesio 200 mg
Fosfato de potasio 500 mg
Se disolvieron en agua desionizada, el pH se ajustó a 7.0 con hidróxido de sodio 1.0 N.
Se aforó con agua desionizada a 1l y se esterilizó en autoclave.

HEPES 1mM

Hepes 0.238g
Se disolvió en agua desionizada, el pH se ajustó a 7.0 con hidróxido de sodio 1.0 N. Se aforó con agua desionizada a 1l y se esterilizó en autoclave.

Preparación de Células electrocompetentes

Se prepararon de acuerdo al protocolo de Cangelosi *et al.* (1991). La cepa LBA4404 se inoculó en medio de cultivo YM por dos días, de este cultivo (D.O. 0.04-0.08 a 600nm), se tomaron 5 ml y se les agregó medio YM hasta 100 ml 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 400 µl de buffer HEPES y 10% de glicerol, se tomaron alícuotas de 50µl y se almacenaron a -80°C.

Electroporación de *A.tumefaciens*

Para transferir la construcción de interés a *Agrobacterium tumefaciens*, se empleó la técnica de electroporación. Se prepararon células competentes de la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens*, de acuerdo al protocolo de Cangelosi *et al.* (1991). Se agregaron 3.0 µl de ADN (1µg/µl), a 50µl de células competentes y después de incubar en hielo por 2 minutos se transfirieron a una cubeta de electroporación de 2mm (Bio-Rad), para aplicar corriente bajo los parámetros establecidos por el proveedor Bio-Rad (25µF, 400Ω, 2.5kV por 8-9 milisegundos) en un equipo Gene Pulser II. Inmediatamente se añadió 1.0 ml de medio de cultivo YM, se transfirió la solución a un tubo eppendorff y las células se recuperaron a 28°C por dos horas. Finalmente se centrifugó a 12,000 rpm por 2 minutos, se resuspendió la pastilla en 200 µl de medio de cultivo YM y se inocularon en el medio de selección (YM con el antibiótico de selección) para su cultivo por 3 días a 28°C y 150 rpm.

7.7. Detección de la proteína recombinante en *E.coli*

7.7.1. Métodos de extracción de proteína en *E.coli*

Solución A

Urea 8M

Tris-HCl 0.1M

EDTA 4.0mM

DTT 27mM

El método utilizado para la extracción de proteína de *E.coli* fue el reportado por Falconer *et al.* (1999). En este método se utilizó 5 ml de una suspensión bacteriana crecida durante toda la noche, se centrifugó a 10,000g por 15 minutos

a 4°C, la pastilla fue resuspendida en 1.23ml de Tris-HCl 0.1M (pH 9.0) y 3.76 ml del Buffer A concentrado más 27mM de ditioneitol, (DTT). La solución fue incubada durante 30 min a 37°C. La solución fue centrifugada a 10,000g durante 15 min a 4°C. La proteína recombinante se encontraba en el sobrenadante.

Tinción con Ponceau para análisis cualitativo de Proteína

Con el objetivo de ver si se había logrado una buena purificación de proteína, se realizó una tinción con el colorante Rosa de Ponceau S. Este colorante se une a las proteínas de forma reversible. En una membrana PVDF se depositaron gotas de la proteína a analizar, posteriormente se dejó incubando la membrana durante una hora, con la solución de tinción (0.1% de Ponceau S en ácido acético al 5%). Se realizaron lavados de la membrana, con agua destilada, hasta que las manchas rosas de la proteína eran visibles, una vez observada la proteína, se continuó con los lavados con agua destilada, hasta que el color rosa desapareciera de la membrana.

7.7.2. Ensayo de Inmunoblot para la detección de la proteína heteróloga

El primer paso en el ensayo de inmunoblot es unir la proteína a la membrana, con este objetivo, la membrana PVDF fue cargada al adicionar metanol durante 30 segundos, se desechó el metanol y se realizaron dos lavados con agua destilada durante dos minutos. Antes de que la membrana se secase, se depositaron gotas de la proteína a analizar (10µl). Una vez unida la proteína a la membrana se procedió a bloquear la membrana con la solución bloqueadora del Kit Dig Detection de Roche, y se procedió a unir el primer y segundo anticuerpo, siguiendo las instrucciones del Dig Detection Kit de Roche. Finalmente la detección de la proteína se realizó utilizando el Kit para quimioluminiscencia Kit Super Signal West de Pierce, mediante el equipo Kodak mod 200R.

7.8. Métodos de transformación en plantas

En el presente trabajo, se utilizaron dos métodos para la transformación de plantas. Para introducir material genético foráneo a los cloroplastos, se utilizó el

método de biobalística. En el caso de introducir ADN al núcleo, se utilizó el sistema de co-cultivo de explantes vegetales con *A. tumefaciens* como se describe a continuación.

7.8.1. Transformación nuclear mediante *Agrobacterium tumefaciens*

7.8.1.1. Esterilización y germinación de semillas

En todos los 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 de acuerdo al sistema vegetal utilizado. A continuación se presenta una Tabla con el resumen del método de transformación de los sistemas vegetales, los medios de cultivo son descritos en el Apéndice 11.3.

Tabla 6. Transformación de sistemas vegetales

Variable	Protocolo		
	Cortina <i>et al.</i> , (2003), Krasnyanski <i>et al.</i> , (2001)	Com. personal Olivera, 2004	Curtis <i>et al.</i> (1994); Nakano <i>et al.</i> , (2003)
Sistema Vegetal	Tomate (<i>L. esculentum</i>)	Zanahoria (<i>D. carota</i>)	Lechuga (<i>L. sativa</i>)
Explante utilizado	Cotiledones heridos con aguja, por la cara abaxial	Hipocotilos de 15 días en oscuridad, heridos con un bisturí	Cotiledones heridos con aguja, por la cara abaxial
Carga bacteriana medida en DO _{600nm}	Aproximadamente 0.2	Aproximadamente 0.2	1.1-1.6
Tiempo de exposición a la bacteria	20 minutos	5-10 minutos	5-10 minutos
Tiempo y medio de cocultivo	3 días en TCM	5 días en MYTm	2 días en UM
Medio de regeneración	2-Z	MYT	MS104
Medio de enraizamiento	MSO	MSO	MSO

7.8.1.2. Transformación nuclear de zanahoria (*Daucus carota*)

Se utilizaron hipocotilos de 3 semanas etiolados (crecidos en oscuridad), se cortaron en 1.5 cm, y se hicieron heridas con el bisturí, a lo largo del tallo, evitando que se secaran, poniendolos en sanitas con medio MS. Los hipocotilos se sumergieron en el cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* que contenía el plásmido con la construcción del gene sintético antimicrobiano de Protegrina 1. Las bacterias fueron crecidas en medio YM con el agente de selección.

Los hipocotilos se dejaron en contacto con la bacteria durante 10 minutos, después fueron lavados con medio MS y se secaron en sanitas estériles. Se realizó el cocultivo en el medio MYTm, durante 2 días en oscuridad. Después de los dos días de cocultivo se cambiaron a un medio MYT con Cefotaxima (500mg/l), durante 5 días. Se cambiaron a medio MYT con Cefotaxima (500mg/l), más 20mg/l

de Higromicina y se resembraron cada 15 días dos veces. Posteriormente se sembraron en MYT con la mitad de la concentración de los reguladores, más Higromicina 10mg/l (durante 1 semana). Finalmente se cambiaron a medio MYT sin reguladores de crecimiento y con 1.5% de sacarosa. Todos estos cultivos se mantuvieron en un fotoperiodo (16 h luz / 8 h oscuridad) y a una temperatura de 25 +/- 2°C.

7.8.1.3. Transformación nuclear de tomate (*Lycopersicon esculentum*)

Para transformar tomate, se utilizaron cotiledones jóvenes de 8 días, antes de obtenerse las hojas verdaderas, los cotiledones fueron cortados y se les hicieron heridas con una aguja en la parte abaxial del cotiledón. Se utilizó una suspensión de *A. tumefaciens* que contenía el vector con el gen de la PG1. La OD a 620 nm del cultivo celular fue alrededor de 0.2. La bacteria se puso en contacto con los cotiledones en un periodo de 20 minutos y se lavaron con medio MS líquido. Después de los lavados, los cotiledones se pusieron con la cara abaxial hacia abajo, en contacto con el medio TCM, para cocultivar durante 2 días a un fotoperiodo (16 h luz / 8 h oscuridad) y a una temperatura de 25 +/- 2°C. Los cotiledones se cambiaron al medio MS-2Z, con Cefotaxima (500mg/l), más 20mg/l de Higromicina ó 50mg/l de Kanamicina.

Se realizaron cambios de medio a MS-1Z (Apéndice 11.3.3), para inducir brotes, finalmente, los brotes se cambiaron a medio MS con antibióticos, para inducir la formación de raíz. De la misma forma se continuó con las mismas condiciones de foto período.

7.8.1.4. Transformación nuclear de lechuga (*Lactuca sativa*)

Plántulas con siete días de germinación se utilizaron para cortar las hojas cotiledonarias, las cuales se emplearon para los ensayos de regeneración y transformación genética. Los cotiledones fueron heridos con un bisturí, y fueron colocados en el medio MSO, para evitar deshidratación. Posteriormente se colocaron en una solución de *A. tumefaciens* que portaba el plásmido de interés.

Después de eliminar el exceso de bacteria con papel absorbente estéril, se colocaron en el medio UM de cocultivo, durante 2 días. Pasado el periodo de cocultivo, los explantes se transfirieron al medio de selección (con 10 mg/l de Higromicina), adicionado con 500 mg/l de cefotaxima para eliminar a la agrobacteria. Los tejidos fueron subcultivados cada dos semanas, seleccionando solo los explantes resistentes a la selección. En todo el procedimiento se utilizó un foto periodo (16 h luz / 8 h oscuridad) y una temperatura de 25 +/- 2°C. Los brotes de aproximadamente unos 2 cm de largo se pasaron al medio MSO para enraizamiento y sy posterior pase a tierra.

7.8.1.5. Tinción histológica para actividad de β -glucoronidasa (GUS)

Para confirmar los eventos de transformación, se realizó un ensayo para detectar el gen reportero de la β -glucoronidasa (GUS) mediante tinción histológica de los tejidos resistentes a kanamicina. Para ello, se empleó el protocolo de Jefferson *et al.*,(1987); el material vegetal se puso en contacto con buffer de reacción y posteriormente incubado a 37°C por 24 horas (Apéndice 11. 4). Después, el tejido fue desteñido con etanol absoluto a 37°C hasta eliminar la clorofila, finalmente se conservó en glicerol al 50%. Fueron consideradas positivas las muestras que adquirieron una coloración azul en algún tejido, lo cual confirma la acción de enzima expresada en la planta ya que transforma el sustrato X-gluc en esta reacción colorida.

7.8.2. Transformación de cloroplastos de tabaco mediante biobalística

7.8.2.1. Preparación de la suspensión de micro partículas de oro

Protocolo de Daniel *et al.*, (2004).

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%.

7.8.2.2. Preparación de material consumible 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.

7.8.2.3. Metodología para el bombardeo de hojas de tabaco

Cobertura de microacarreadores con ADN (para 5 bombardeos):

Se usaron 50 μ l 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 par unir el ADN a las micropartículas de oro. Todo el tiempo las partículas se estuvieron mezclando con vórtex durante 5 segundos entre cada componente: se agregaron 10 μ l de ADN (1 μ g/ μ l), 50 μ l de CaCl₂ 2.5M, (recién preparado), 20 μ l de espermidina 0.1M. Se mezcló con vórtex durante 20 min a 4°C. Se agregaron 200 μ l de etanol absoluto a temperatura ambiente y se aplicó vortex, durante 5 segundos, la mezcla fue centrifugada durante 30s a 800g. 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 μ l de etanol al 100% y se dejan en hielo hasta su uso. Este material se utilizó para 5 bombardeos.

Preparación del material biológico

Se utilizaron hojas provenientes de plantas de tabaco de 6 semanas (Var Petit habana, SR1) crecidas en MS en condiciones de esterilidad. Las hojas debían ser uniformemente verdes y carnosas, y no debían superar los 2.5 cm de largo por 4 cm ancho. Las hojas fueron puestas sobre medio RMOP (Apéndice 11.3.2), en cajas de Petri con la cara abaxial hacia arriba para realizar el bombardeo.

Bombardeo de las hojas de tabaco (Pistola Bio-Rad)

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.

A continuación se describe el procedimiento para realizar el bombardeo de las hojas de tabaco, 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 1,400 psi (libras por pulgada cuadrada). 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 1,100 psi. La suspensión de micropartículas con ADN se depositó en los macroacarreadores a razón de 6 μ l por disparo. Se colocó la caja petri con la hoja, 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 y se le colocó la tapa. Las hojas bombardeadas se incubaron durante 48h a 27 °C en la obscuridad. Después de este periodo, cada hoja se cortó en piezas de alrededor de 2mm² y se depositaron en medio RMOP con espectinomicina 500mg/l para inducir la selección de las plantas transplastómicas.

7.9. Ensayos de actividad biológica de plantas transgénicas

7.9.1. Extracción de proteína total soluble de tejidos vegetales

Buffer de extracción de Proteínas

Fosfato de sodio 25mM

Cloruro de Sodio 100mM

Tritón 100X 0.5%

Leupeptina 10µg/ml

PBS

Buffer de Fosfatos PBS pH 7.4 con

Leupeptina 10µg/ml

Se congelaron 100mg 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 10,000rpm 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 10µl de la solución problema en tubos de ensayo, se añadió 1ml del reactivo de Bradford y se midió la absorbancia a 595nm. Se empleó albumina de suero de bovino como estándar (5-20ng/µl).

7.9.2. 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 7.1.4.

Para evaluar la actividad antimicrobiana de de los extractos proteicos de las plantas transgénicas, se emplearon dos metodologías, que se describen a continuación.

7.9.2.1. Método de antibiograma

El método de antibiograma estima la concentración de antibiótico necesaria para inhibir el crecimiento de una cepa bacteriana. La bacteria se siembra homogéneamente en una placa 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:

Preparación del inóculo

Al menos 3 a 5 colonias bien aisladas y del mismo tipo de morfología se seleccionaron de un agar de cultivo. Se tocaron las colonias por arriba con un asa y fueron transferidas a un tubo con 4 a 5 ml de caldo tripticasa de soya (TSA). El caldo de cultivo fué incubado a 37°C hasta que alcanzó o excedió la turbidez del estándar de 0.5 de McFarland, 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 (Sigma) al 1%. 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 constante 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.

Aplicación de los discos a las placas inoculadas

Los sensidiscos consistieron en discos de papel filtro de 6 mm de diámetro impregnados con 5µl de antibiótico ó del péptido a analizar. Los siete sensidiscos se dispensaron por caja petri sobre la superficie del agar. Cada disco fué presionado para asegurar contacto pleno con la superficie del agar. Las placas fueron invertidas e incubadas 37°C en el lapso de 15 minutos después de aplicados los discos.

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.

7.9.2.2 Método ultrasensible de difusión radial

Nos basamos en el método descrito por Lehrer *et al.*(1991).

De 3 a 5 colonias de la cepa a analizar se utilizaron como pre-inóculo, se crecieron las bacterias durante 18h a 37°C en 50 ml de caldo TSA. Después de las 18h se inocularon 50 μ l de este cultivo en 50ml de caldo TSA y se incubaron durante 2.5h a 37°C. Se centrifugaron a 4,000rpm durante 10 min a 4°C y se lavaron con 10ml de PBS pH 7.4, para posteriormente centrifugar a 4,000 rpm durante 10min a 4°C. Se repitió el lavado con PBS pH 7.4 y la pastilla bacteriana se resuspendió en 10ml de PBS pH 7.4 frío.

Se midió la OD a 620nm, con la regla de que 0.20 de absorbancia equivale a 5X10⁷ UFC/ml, de esta suspensión bacteriana se tomó un volumen que contuviera de 1 a 4 X10⁶ UFC/ml (Aprox 15 μ l).

El volumen con 1 o 4 X10⁸ UFC/ml se agregó a 10 ml de un medio previamente preparado el cual contiene: 3 mg del medio TSA y agarosa de bajo grado de electroendosmosis (Sigma) al 1%. Este medio se esterilizó y cuando alcanzó una temperatura alrededor de 42°C, se agregó 0.02% de Twen-20. Las bacterias se mezclaron utilizando vórtex, esta mezcla se vació en cajas petri, formando una capa de alrededor de 1mm y se utilizó una punta de micropipeta para hacer perforaciones al medio de alrededor de 3mm (la puntilla es cortada para alcanzar esta medida y esterilizada, previamente). En los pozos generados se agregaron 5 μ l de la muestra que contiene el antimicrobiano, además de los controles negativos y como positivo la Cefotaxima. Las placas se incubaron durante 3h a

37°C. Posteriormente las placas con las bacterias crecidas durante este periodo, son cubiertas con otros 10ml de medio que contiene 6mg del medio TSA y agarosa de bajo grado de electroendosmosis (Sigma) al 1%, la cual fue agregada a 42°C aproximadamente. Finalmente las bacterias se dejaron creciendo de de 18 a 24h a 37°C. El diámetro de la zona clara se midió y se consideró 0.1mm como el equivalente a una Unidad de actividad antimicrobiana (ej. 3mm equivalen a 30 U). Los geles debieron ser teñidos durante 24hrs en una solución que contiene Azul de Comassie brillante R-250 (2 mg del colorante, 27 ml de etanol, 63 ml de agua y 15 ml de Formaldehído 37%).



VIII. Resultados y Discusiones

8.1. Estrategia general en la transformación nuclear utilizando *Agrobacterium tumefaciens*

La transformación nuclear mediante *A. tumefaciens* requiere de varios pasos, en la Fig 8 se puede ver de forma esquematizada, los pasos que involucra, uno de ellos es la construcción de los vectores para la transformación de la bacteria *A. tumefaciens*, la cual se utiliza para introducir los genes de interés a las células vegetales, mediante co-cultivo con la bacteria. Las células que logran captar e integrar el material genético en su genoma se crecen en medio selectivo y a partir de ellas se regeneran plantas completas que finalmente son caracterizadas para demostrar la presencia del transgén y la evaluación de su actividad biológica.

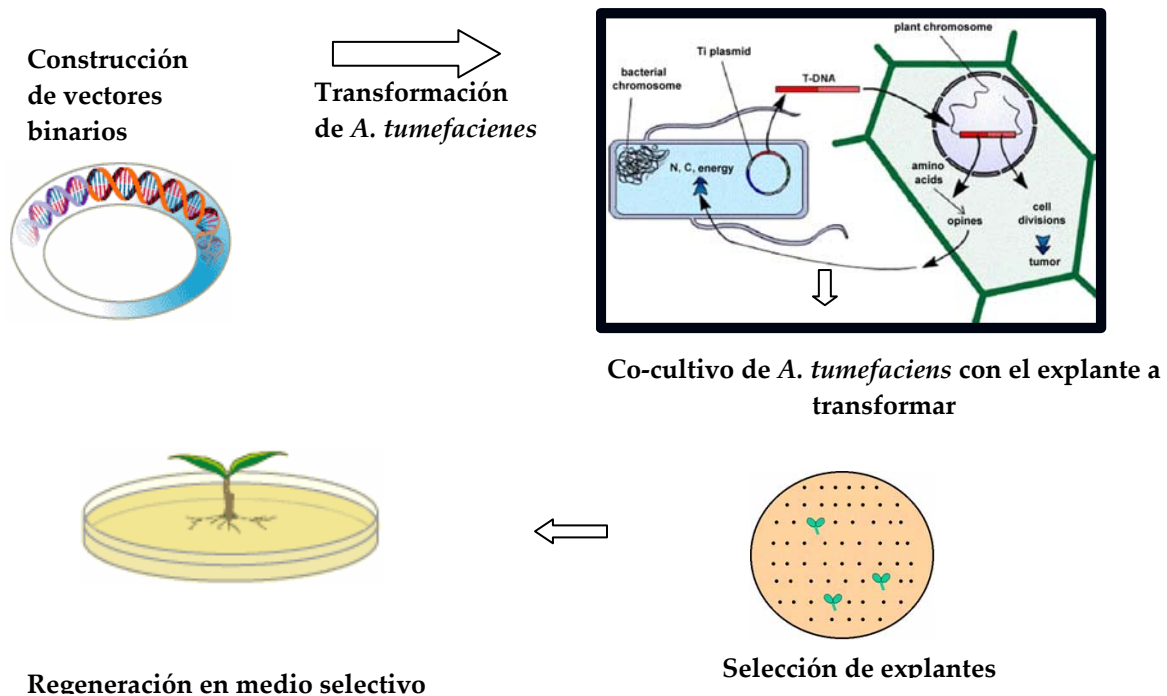


Figura 8. Transformación nuclear mediante *A. tumefaciens*



8.1.1. Optimización del gen sintético de Protegrina (PG1) para la transformación nuclear

El gen de Protegrina se mandó sintetizar a la compañía Entelechon (Alemania) tomando en cuenta el uso de codones preferenciales de tomate y zanahoria. Además se le adicionó la secuencia del péptido señal de la proteína antifúngica 2 de rábano (Rs-AFP2), para dirigir su transporte hacia el espacio intercelular (Terras *et al.*, 1995), y sitios de restricción para su clonación en un vector binario para transformar *A. tumefaciens*. Este gen sintético fue clonado en el vector Topo-T4 clonig® (TOPO-PG1n).

8.1.1.1. Clonación de PG1n en el vector de biobalística pBI221

Se utilizó el vector pBI221® para facilitar los pasos de la subclonación en el vector binario pCAMBIA®. El vector pBI221® es un vector pequeño que se utiliza para realizar ensayos de biobalística, ya que tiene el gen reportero de la enzima β -glucuronidasa (GUS) bajo el promotor CaMV35S (Cauliflower Mosaic Virus 35S) y el terminador NOS (Nopaline synthase). La Fig 9 muestra el mapa de restricción del vector pBI221®.

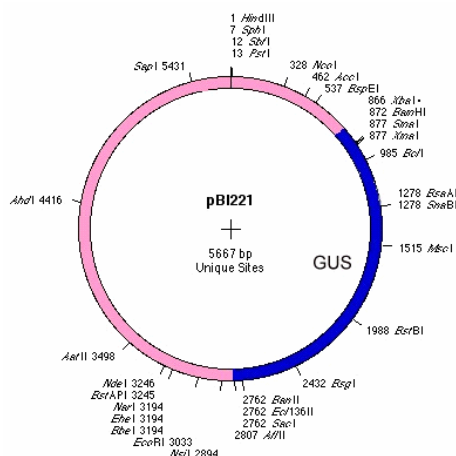


Figura 9. Mapa de restricción del vector pBI221.

El vector *Topo-PG1n* fue digerido con las enzimas *SpeI-SacI*, para purificar el gen sintético *PG1n*. Por otro lado el vector *pBI221* fue digerido con las enzimas *XbaI-SacI*, para quitar el gen de *GUS*, y en su lugar subclonar el gen *PG1n*.

Una vez purificados los productos de la digestión, se realizó la ligación de los fragmentos con la enzima *T4 DNA ligasa*, el producto de la ligación se utilizó para electroporar la cepa *DH5α* de *E. coli* y las clonas que crecieron en medio selectivo fueron caracterizadas mediante análisis de restricción utilizando las enzimas *EcoRI* y *HindIII* como se muestra en la Fig 10.

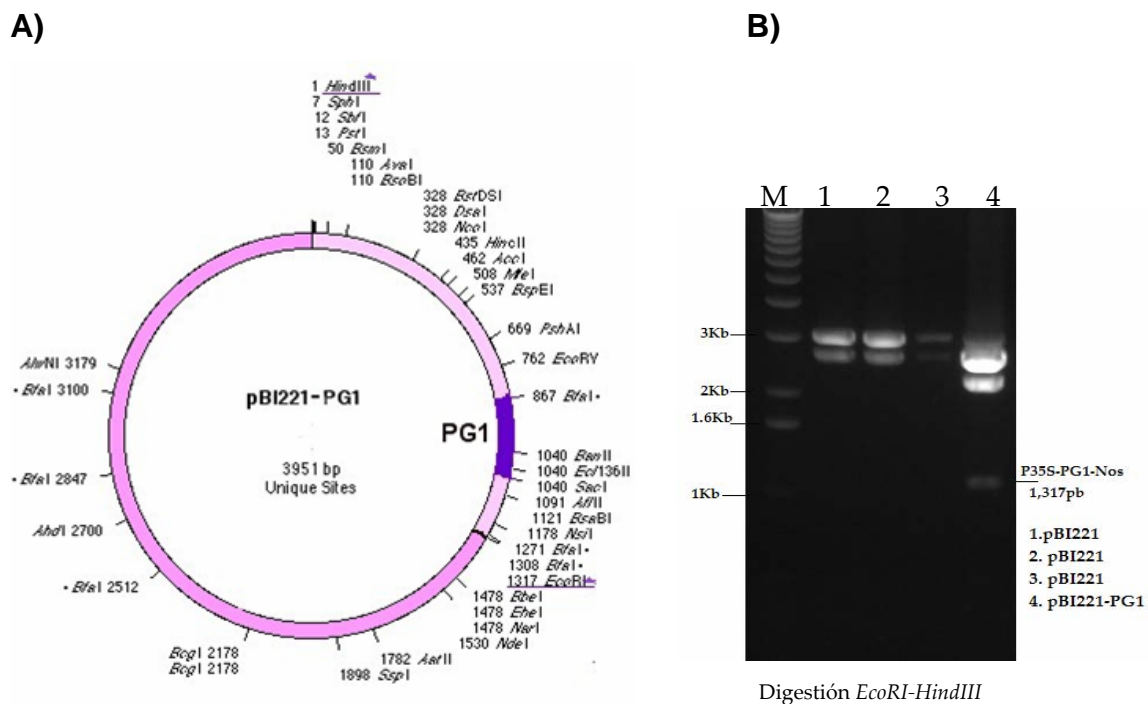


Figura 10. Análisis de restricción del vector pBI221-PG1. A) Mapa de restricción del vector pBI221-PG1. B) Resultado de la digestión enzimática del vector pBI221-PG1 con las enzimas *EcoRI-HindIII*. M). Marcador de peso molecular 1Kb. Gel de agarosa 1%.



8.1.1.2. Subclonación de PG1n en los vectores binarios pCAMBIA 1304 y pCAMBIA 2201

Para la transformación nuclear se utilizaron los vectores pCAMBIA1304 y pCAMBIA2201. El vector pCAMBIA1304 confiere resistencia a la planta a higromicina ya que contiene el gen *hpt* de la higromicina fosfotransferasa, mientras que el vector pCAMBIA2201 confiere resistencia a kanamicina por contener el gen *nptII* de la neomicina fosfotransferasa (Fig 11), (Brasileo y Aragao, 2001).

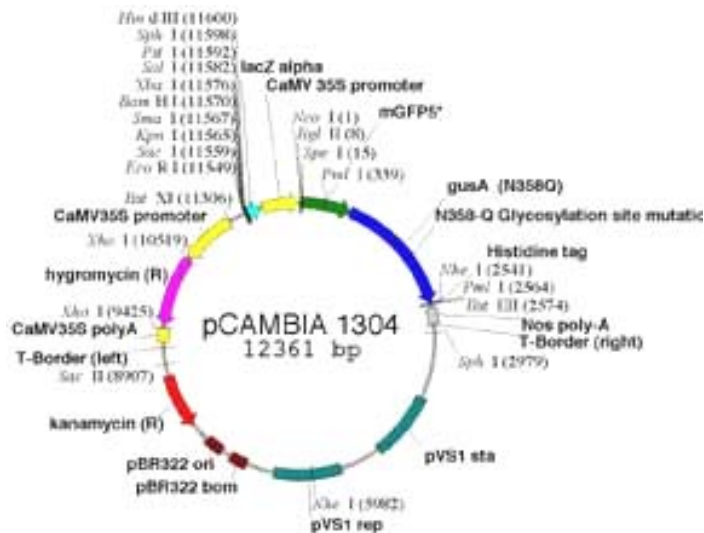


Figura 11. Representación esquemática del vector pCAMBIA1304

A partir de la construcción pBI221-PG1 se purificó el producto de la digestión *EcoRI-HindIII*, que contenía la región promotora 35S, unido al gen de Protegrina y al terminador NOS. El vector pCAMBIA1304 se digirió con las mismas enzimas y se realizó la ligación de los fragmentos con la T4 DNA ligasa, para obtener el vector pCAMBIA1304-PG1. El producto de la ligación se utilizó para electroporar la cepa DH5α ó Top10'F de *E. coli*, se seleccionaron las clonas transformantes y se les aisló el plásmido para realizar el análisis de restricción



con las enzimas *EcoRI-HindIII*, en el cual se espera la liberación de un fragmento de 1,317pb (Fig 12). El mismo procedimiento de digestión y caracterización se empleó para construir el vector pCAMBIA2201–PG1 (datos no mostrados)

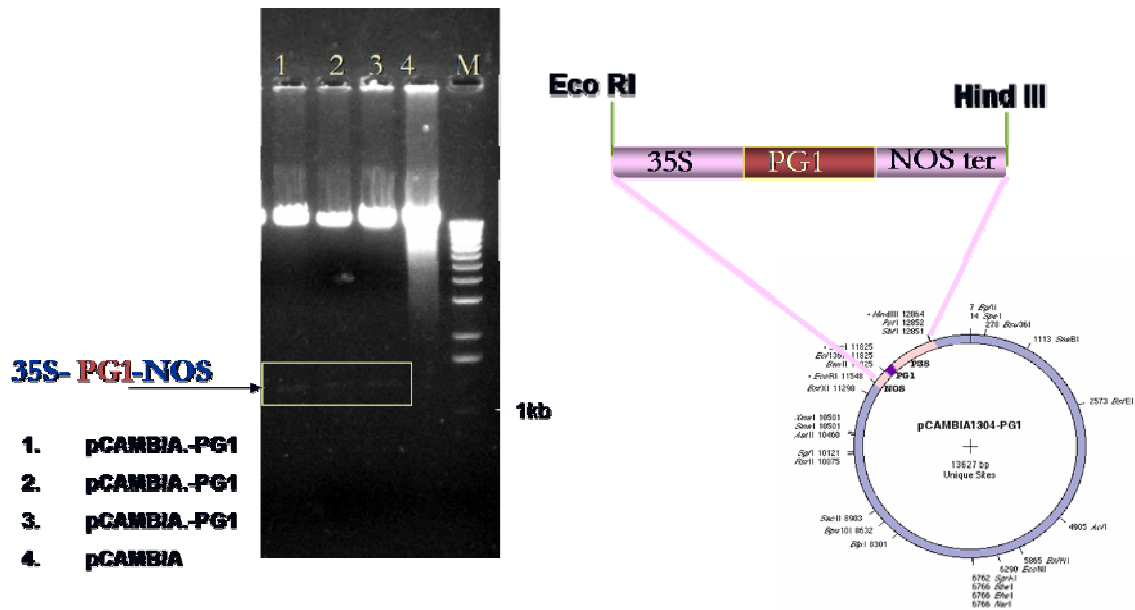


Figura 12. Análisis de restricción del vector pCAMBIA1304 –PG1. A) Resultado de la digestión de los vectores con las enzimas *EcoRI-HindIII*, en el recuadro se ve el producto de la digestión. Marcador de peso molecular 1Kb. Gel de agarosa 1%. B) Mapa de restricción del vector pCAMBIA1304–PG1.

Una vez construidos los vectores binarios, estos fueron utilizados para electroporar la cepa de LB4404 de *A. tumefaciens* como se describe en la sección 7.6 de metodología y se obtuvieron clones con la capacidad de crecer en medio selectivo.



8.1.2. Transformación nuclear de tomate (*Lycopersicon esculentum*) mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

La transformación de tomate de las variedades española (UC82B) y de la variedad isogénica ACC fue realizada mediante *A. tumefaciens* se realizó primero con la construcción del vector pCAMBIA1304-PG1, como se describe en la sección 7.8.1.3 de metodología, sin embargo los primeros brotes que se obtuvieron no mostraron resistencia al agente de selección higromicina. Dado que le mayoría de los protocolos para la transformación de tomate, emplean kanamicina como agente de selección (Cortina y Culiñáez-Macia, 2003), fue necesario repetir el experimento de transformación utilizando el vector pCAMBIA2201-PG1, el cual contiene el gen *nptII* que le confiere resistencia a kanamicina. Bajo estas condiciones se obtuvieron 14 brotes resistentes a kanamicina de la variedad UC82B Y 7 brotes de la variedad AC, además de contar con callo a partir de organogénesis somáticas, como se muestra en la Fig 13.

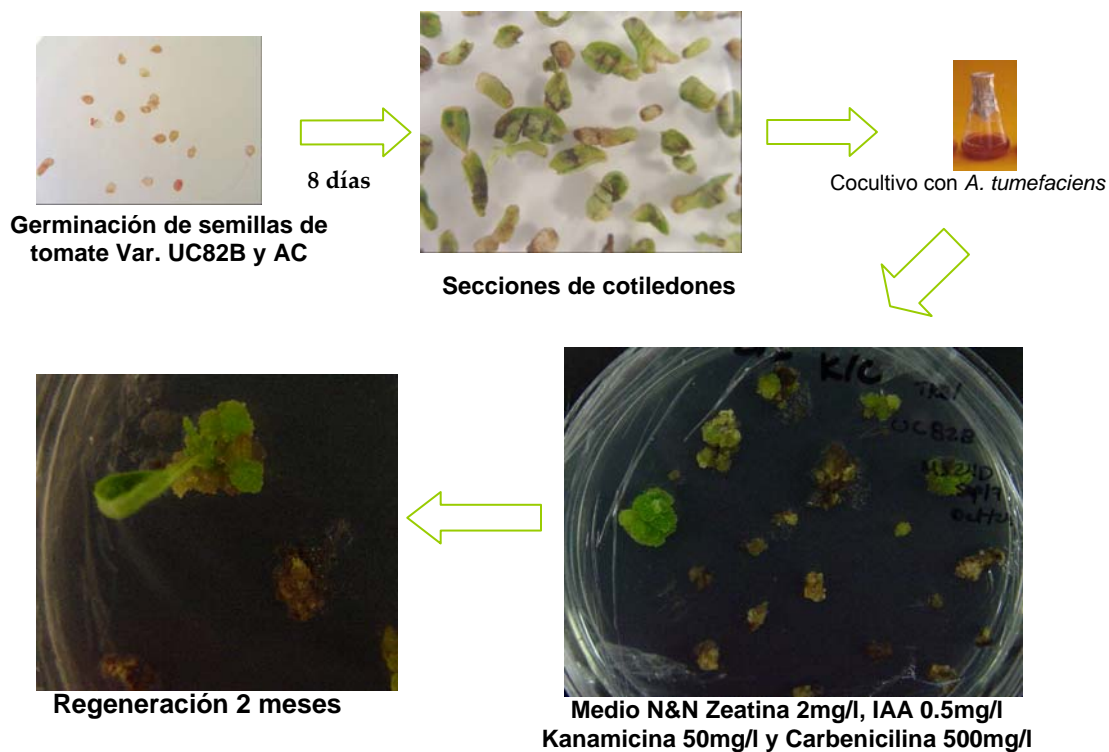


Figura 13. Reultados de la transformación nuclear de tomate



8.1.3. Transformación nuclear de zanahoria (*Daucus carota*) mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

La transformación de zanahoria mediante *A. tumefaciens* se realizó con la construcción del vector pCAMBIA1304-PG1, como se describe en metodología. A la fecha se cuenta con callo embriogénico generado en medio de selección con higromicina a partir de hipocotilos etiolados. Para inducir la maduración y germinación de los embriones somáticos, estos callos fueron sometidos subcultivos en medio MYT con concentraciones decrecientes de reguladores de crecimiento. Sin embargo después de 6 meses en medio MYT con 0.25mg/l de 2-4D y 0.075 de BA, los callos presentan escasos embriones en estado globular y de corazón. La Fig. 14 muestra los resultados obtenidos a la fecha en el cultivo de tejido de zanahoria.

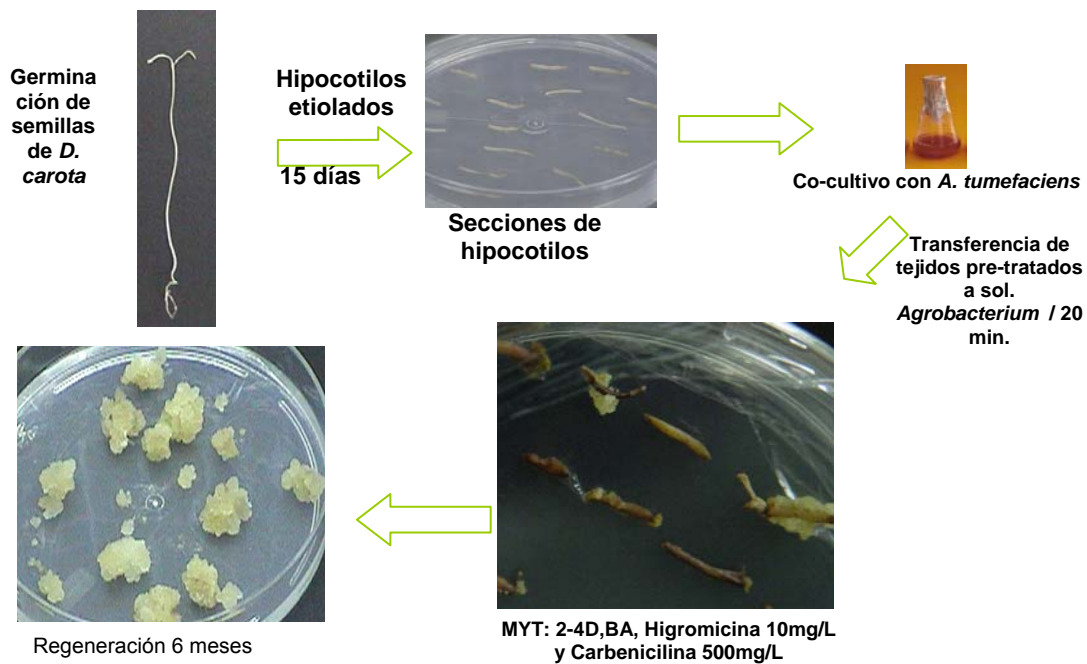


Figura 14. Resultados de la transformación nuclear de zanahoria



8.1.4. Transformación nuclear de lechuga (*Lactuca sativa*) mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

La transformación nuclear de lechuga representa varias ventajas, respecto a otros sistemas vegetales, ya que es de fácil cultivo *in vivo* e *in vitro*, además de presentar rápido crecimiento comparado a otros sistemas vegetales (Pileggi *et al.*, 2001). En presente trabajo se transformaron cotiledones de lechuga con el vector pCAMBIA-1304-PG1 como se describe en la sección 7.8.1.4. La selección con higromicina a diferencia de la de tomate, fue muy efectiva como se muestra en la Fig 15 y permitió obtener 25 líneas, de las cuales 15 líneas fueron regeneradas a plantas adultas



Figura 15. Resultados de la transformación nuclear de lechuga



8.1.4.1. Análisis mediante PCR de la transformación nuclear de *L. sativa*

Una vez que las plantas de lechuga habían sido transferidas a tierra, al menos a 10 plantas, se le realizó la extracción de ADN como se describe en la sección 7.2.2, y se estandarizaron las reacciones de PCR para amplificar el gene de PG1 (Sección 7.3). Se utilizó como control positivo el vector pCAMBIA-1304-PG1 y como controles negativos DNA de plantas de lechuga no transformadas. Los resultados del PCR fueron positivos para 4 plantas, sin embargo es necesario repetir la reacción de PCR, ya que se tenía un exceso de ADN en algunas de las plantas en las que el resultado fue negativo. La Fig 16 muestra los resultados de PCR, positivos para una de las plantas de lechuga

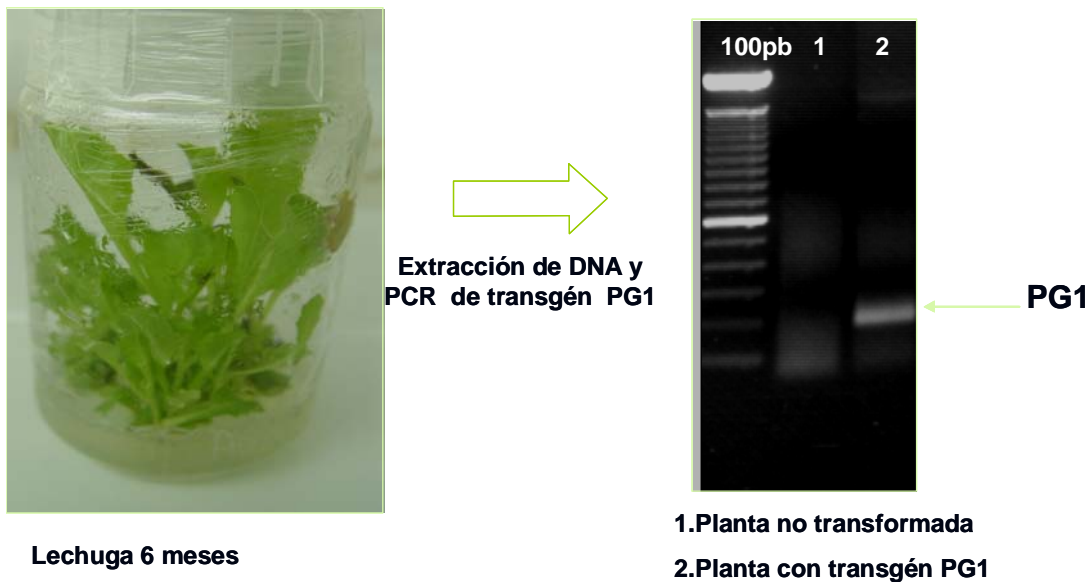


Figura 16. Resultado del PCR de plantas de lechuga para el gene de PG1.

8.1.4.2. Análisis de la actividad antimicrobiana de plantas que contienen el gen de PG1

Se realizaron ensayos de actividad antimicrobiana de extractos proteicos (Sección 7.8.4) de callos de lechuga positivos por PCR para el gen de PG1, así como otros callos de plantas que crecían en medio de selección. Se utilizaron



como control negativo callos de lechuga que no habían sido transformados, el control positivo consistió en el péptido puro de la Protegrina 1, donado por el Dr. Lehrer de la UCLA y el antibiótico de Carbenicilina. En la Figura 38 se pueden ver los halos de inhibición de los diferentes extractos proteicos, es posible observar que no existe una relación directamente proporcional entre la actividad antimicrobiana y la concentración de proteína, ya que como se puede en la Figura 17, en el caso de las línea 7R (1.6mg) y la 12R (2.76mg), el halo mas grande de inhibición se presenta en la línea 7R a pesar de estar menos concentrada. Los resultados para *L. monocytogenes* fueron similares.

	Conc prot
1. Planta no transgénica	(0.6mg)
2. Planta transgénica 7R	(1.6mg)
3. Planta transgénica 12S	(1.62mg)
4. Planta transgénica 11S	(1.49mg)
5. Planta transgénica 4R	(2.72mg)
6. Planta transgénica 12R	(2.76mg)
7. Control positivo PG1 pura	(0.5µg)

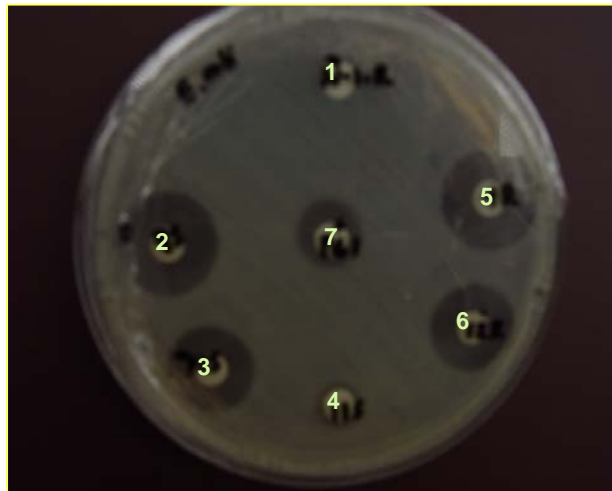


Figura 17. Ensayo de actividad antimicrobiana de extractos proteicos de lechuga transgénica para PG1. A la izquierda se presenta la línea de la planta y la concentración de proteína total soluble excepto para la PG1pura.

Es necesario señalar que el tamaño del halo de inhibición puede estar influenciado por diversos factores tales como: el medio de cultivo en que se realiza la prueba, la estabilidad del antibiótico, la capacidad de difusión del antibiótico. Con respecto a la capacidad de difusión Albrecht *et al.* (2002) sugieren que las protegrinas difunden mejor en medios que contienen agarosa de bajo grado de electroendosmosis y no así en medio con agar, debido a los polisacáridos presentes en este último.



Se realizó la tinción de GUS para plantas adultas de lechuga, las plantas con actividad positiva para GUS (Fig 18), fueron utilizadas para realizar ensayos de actividad antimicrobiana, sin embargo no se obtuvieron resultados positivos, es decir solo se detectó actividad contra *L. monocytogenes* y *Escherichia coli* en extractos proteicos de callos.

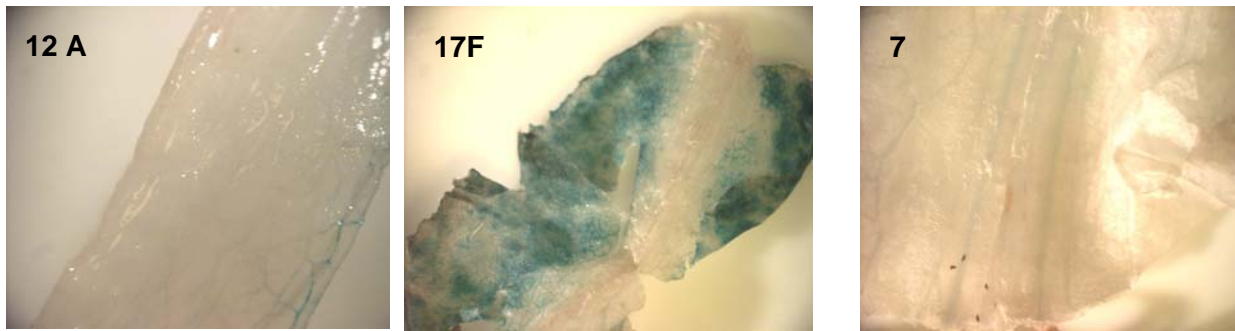


Figura 18. Resultados de tinción histológica de GUS. El número de la izquierda corresponde a la línea analizada.

Los resultados obtenidos requieren de estudios posteriores como RT-PCR para PG1 en hojas adultas para saber si se está transcribiendo el gen. En caso de que se transcriba, sería interesante determinar si algún otro factor no deja que sea activo el péptido antimicrobiano en hoja adulta de lechuga.

8.2. Estrategia general en la transformación de cloroplastos mediante biobalística

La introducción de información genética heteróloga al genoma del cloroplasto, requiere de varios pasos esenciales. Como se puede apreciar en la Fig 19 es necesario construir vectores específicos (1), obtener hojas o callos crecidos en condiciones de esterilidad (2), introducción del gen de interés (transgén) por biobalística(3), seleccionar plantas que hayan captado el transgén (4), y finalmente se determina si el transgén es funcional (5).

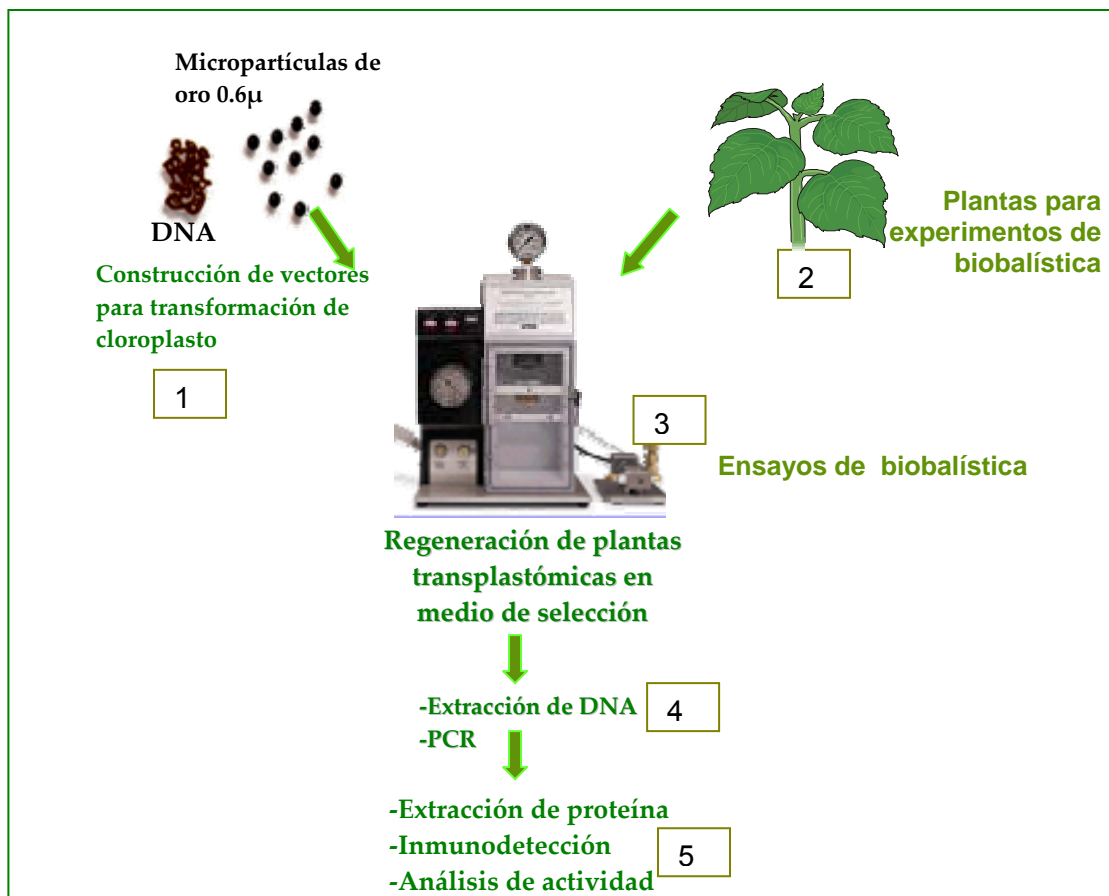


Figura 19. Pasos en la transformación de cloroplastos

8.2.1. Modificación de un vector para la transformación de cloroplastos

La transformación genética de los plástidos sigue los principios de la recombinación homóloga, por lo que el transgén tiene que estar flanqueado por



secuencias homólogas al genoma del cloroplasto (Maliga, 2002). La integración de genes foráneos, en las regiones repetidas invertidas del plastoma duplica las copias del transgén, por lo que se obtiene mayor expresión de proteínas heterólogas. En el presente trabajo se utilizó el vector pKCZ, (donado por el Dr Koop), el vector pKCZ contiene regiones que permiten la integración del transgén entre los genes *trnR-ACG* y *trnN-GUU*, en la región de repetidos invertidos (IR) (Fig 20).

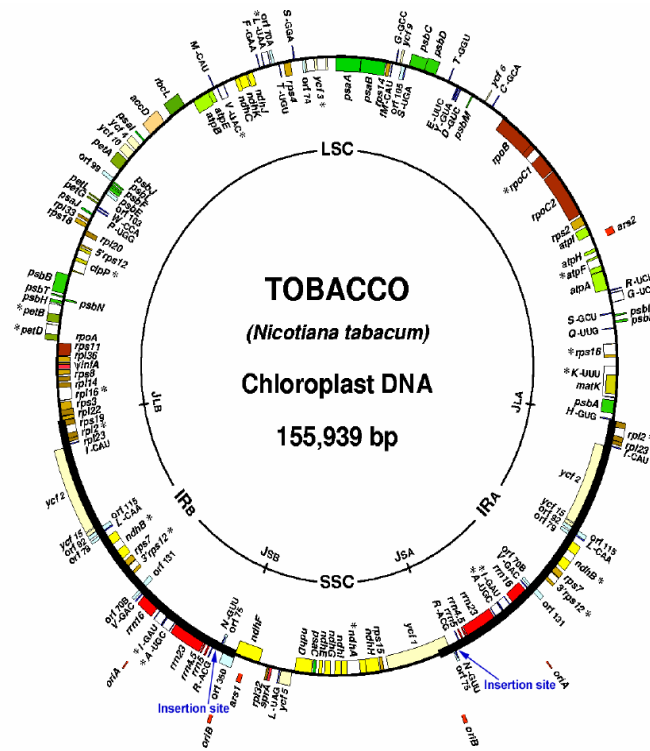


Figura 20. Mapa del genoma de Cloroplasto. Las flechas indican el sitio de la inserción, del transgén, IR (Repetidos Invertidos). Imagen de Zou (2001).



El vector pKCZ como se muestra en la Fig 21, no contenía una región promotora y una región 5' no traducible ("UTR", por sus siglas en inglés) para la expresión del transgén. Por tal motivo para poder expresar los genes de interés en el cloroplasto, fue necesario primero construir e introducir estas secuencias en el vector.

En diferentes trabajos se ha demostrado que el Promotor fuerte tipo σ^{70} del operón de RNA ribosomal de plastidos (*Prnn*), unido a la región 5'UTR del gen 10 del fago T7 (T7-g10) que provee mayor estabilidad al RNA mensajero, permite obtener una gran expresión de proteína heteróloga de hasta un 23% de la Proteína Total Soluble (TSP) (Kuroda y Maliga, 2001; Tregoning *et al.*, 2003).

En base a esto, se sintetizaron dos oligonucleótidos conteniendo uno el promotor *Prnn* y el otro la secuencia 5'UTR del T7-g10. Estos oligos se diseñaron de manera que sus extremos fueran complementarios y que cada uno sirviera de templado para que al sintetizar sus cadenas complementarias quedaran unidas en un solo fragmento de 153 pb (*Prnn*5'UTR).

P5UTR-F

NheI

5'cta**gctagc**tagctccccgccgctcgttcaatgagaatggataagaggctcgtgggattgacgtgagggggc
agggatggctatatttctggg 3'

P5UTR-R

BglII

5'gga**agatc**tcttaaagttaaacaaaattatttctagtgggaaaccgttggtctccct**cccagaaatagc**
catccc 3'

Estos oligonucleótidos, sintetizados por el Centro de Biotecnología de la Universidad de Illinois en Urbana-Champaign, se mezclaron para que se hibridaran a través de sus extremos complementarios (Fig 21 A) y para llevar a cabo la reacción de extensión se adicionó *Taq* Polimerasa Platinum *Pfx* (se usó esta polimerasa para disminuir la posibilidad de introducir errores al momento de sintetizar la doble cadena). En la Fig 21 B se muestra el producto de la reacción que corresponde a un fragmento del tamaño esperado (153pb) de la unión de *Prrn* con el 5'UTR (*Prrn*5'UTR).

Para introducir esta secuencia *Prrn*5'UTR al vector pKCZ, originalmente se planteó digerir este producto con las enzimas flanqueantes (Figura 22 A) y clonarlo directamente en el vector pKCZ, sin embargo se realizaron varios intentos y no se obtuvieron resultados positivos. Por lo que se recurrió a una

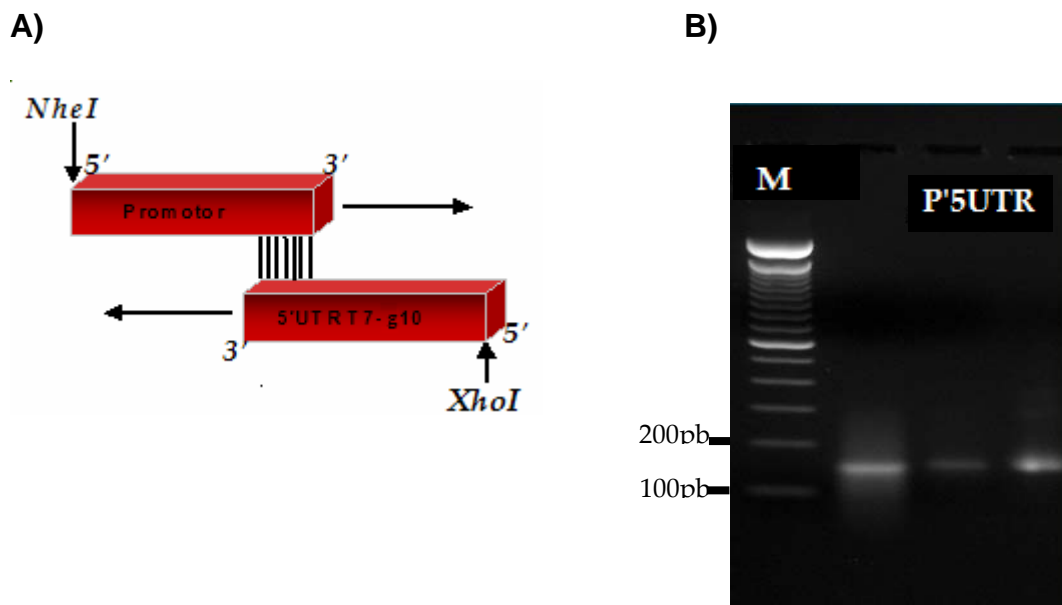


Figura 21. Síntesis del Promotor *Prrn* unido a la región 5'UTR T7-g10. (A) Representación esquemática de los oligonucleótidos, donde hacia sus extremos 3' (rayas verticales) son complementarios y ocurre la reacción de extensión con la *Taq* Polimerasa *Pfx*. Las flechas verticales indican la posición de los sitios de restricción del producto, utilizados para su posterior subclonación en el vector de cloroplastos pKCZ. (B) Productos de la reacción de extensión de los oligonucleótidos para el promotor fuerte *Prrn* y la región 5'UTR T7-g10. M) Marcador de peso molecular 100pb. Gel de Agarosa al 2.5%.



segunda estrategia, en la que primero se clonó el producto Prrn5'UTR en el vector TOPO Zero Blunt End® (Invitrogen), para productos de PCR y posteriormente transferirlo al vector pKCZ.

Para esto el producto Prrn5'UTR se ligó con el vector TOPO y se transformó *E. coli*, de acuerdo con las condiciones recomendadas por el proveedor. A las colonias que crecieron en medio selectivo con Kanamicina se les realizó una extracción de DNA plasmídico. Para comprobar que efectivamente el fragmento Prrn5'UTR se había integrado al vector TOPO, los plásmidos se digirieron primeramente con *EcoRI* y posteriormente con las enzimas *NheI* y *BglII*. El resultado se muestra en la Figura 22 en donde se observa que efectivamente los plásmidos TOPO contenían un fragmento del tamaño esperado correspondiente al Prrn5'UTR (TOPO-Prrn5'UTR). En este caso en particular la visualización del fragmento Prrn5'UTR se realizó con SYBR®Green I 1X concentrado, que es más sensible que el bromuro de etidio (Fig 22).

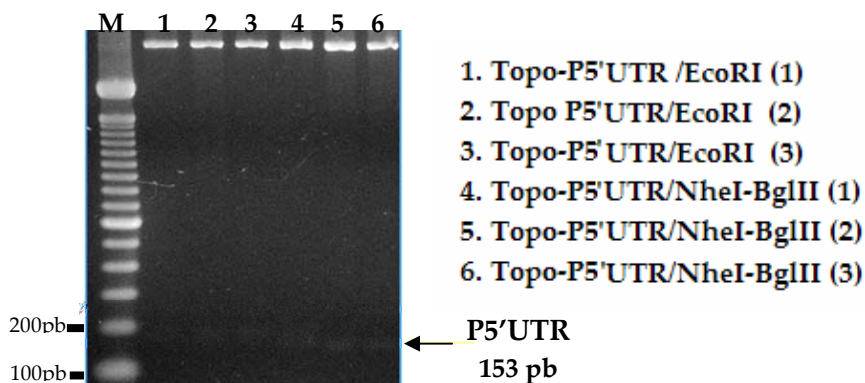


Figura 22. Caracterización de clonas positivas TopoZero Blunt end®-Prrn5'UTR. Análisis de restricción con las enzimas *EcoRI* y *NheI-BglII*. M. Marcador de peso molecular 100 pb. Gel de agarosa 2.5%, Teñido con SYBR®Green 1X

8.2.2 Clonación del promotor *Prrn* y la región 5'UTR (T7-g10) en pKCZ

Una vez que se confirmó la integración de la región Prrn5'UTR al vector Topo, se escogió una clona positiva y se realizó una preparación a gran escala de ADN plasmídico. El vector TOPO-Prrn5'UTR se digirió con las enzimas *NheI* y *BglII*

para obtener el fragmento *Prrn5*'UTR de 153 pb (Fig 23 B) y clonarlo dentro del vector pKCZ que es digerido con las mismas enzimas (Figura 23 C).

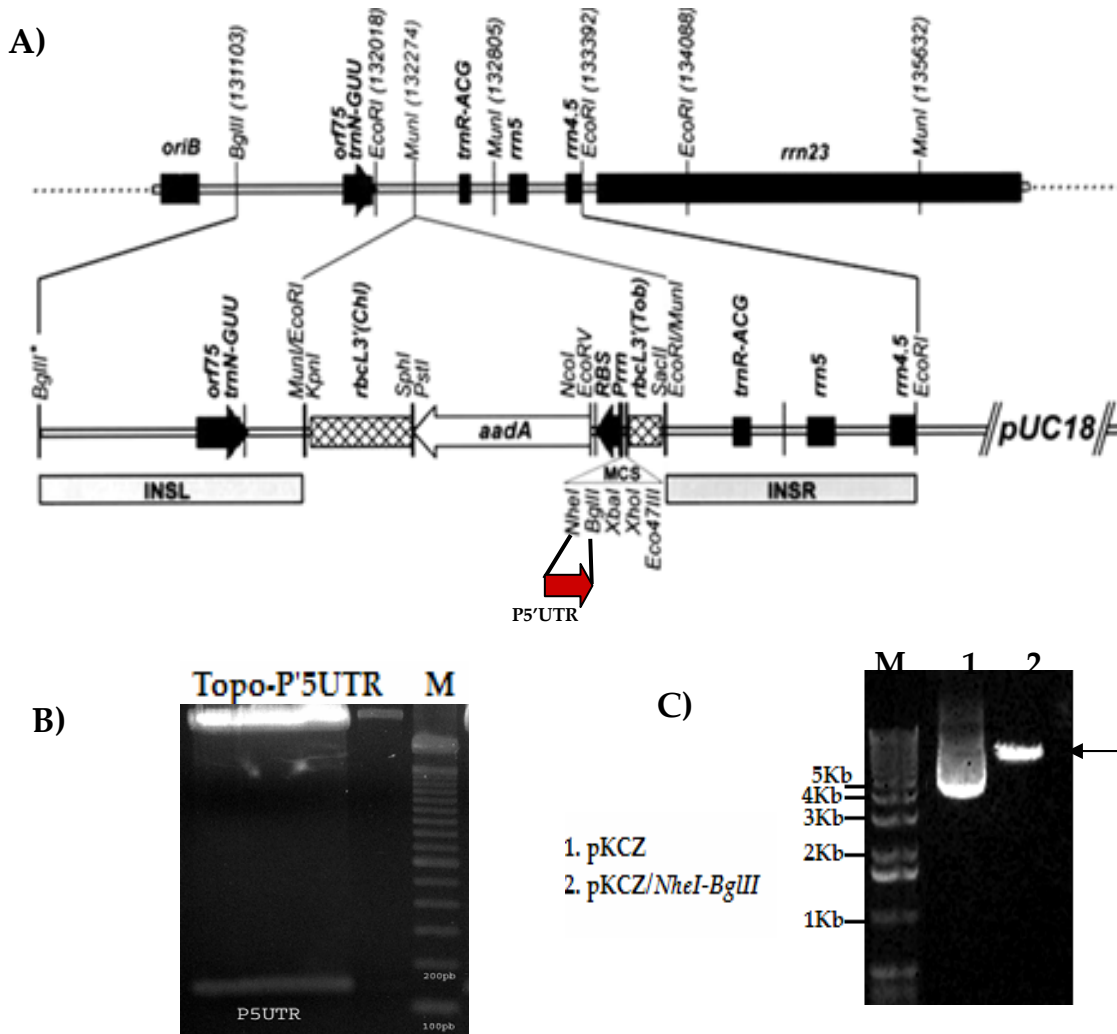


Figura 23. Purificación del vector pKCZ y la región P5'UTR. A) Representación esquemática del vector pKCZ, donde se indica la región (flecha), en la que se realizó la introducción de la secuencia P5'UTR. Las regiones INSL-INSR corresponden a las regiones homólogas al genoma del cloroplasto; la región ptDNA indica la región en el plastoma donde se inserta el transgén. Imagen de Zou *et al.* (2003). B) Resultados de la digestión *NheI-BglIII* del vector Topo-P5'UTR. M) Marcador de peso molecular 100pb. Agarosa 2.5%. C) Resultado de la digestión *NheI-BglIII* del vector pKCZ. M) Marcador de peso molecular 1Kb. Gel de agarosa 1%.



Los fragmentos purificados de la región Prn5'UTR y pKZC digeridos con *NheI*-*BglII*, fueron utilizados para realizar las reacciones de ligación con la enzima T4 DNA ligasa, como se indica en metodología. El producto de la ligación se utilizó para electroprorar la cepa DH5 α de *E. coli*, y las células transformadas se crecieron en medio LB con ampicilina. Las clonas que crecieron en medio selectivo se les extrajo su ADN plasmídico y éstos se digirieron con la enzima de restricción *BsaI*, para comprobar la integración de la secuencia Prn5'UTR en el vector pKZC. Cada uno de ellos presenta un sitio *BsaI* y por lo tanto si se unieron, como resultado de la digestión de los plásmidos deberían de observarse tres fragmentos, en el que el fragmento de 1,111pb es el fragmento clave que indica que efectivamente el fragmento Prn5'UTR se integró en el vector pKZC. Figura 24, carriles 1 y 2.

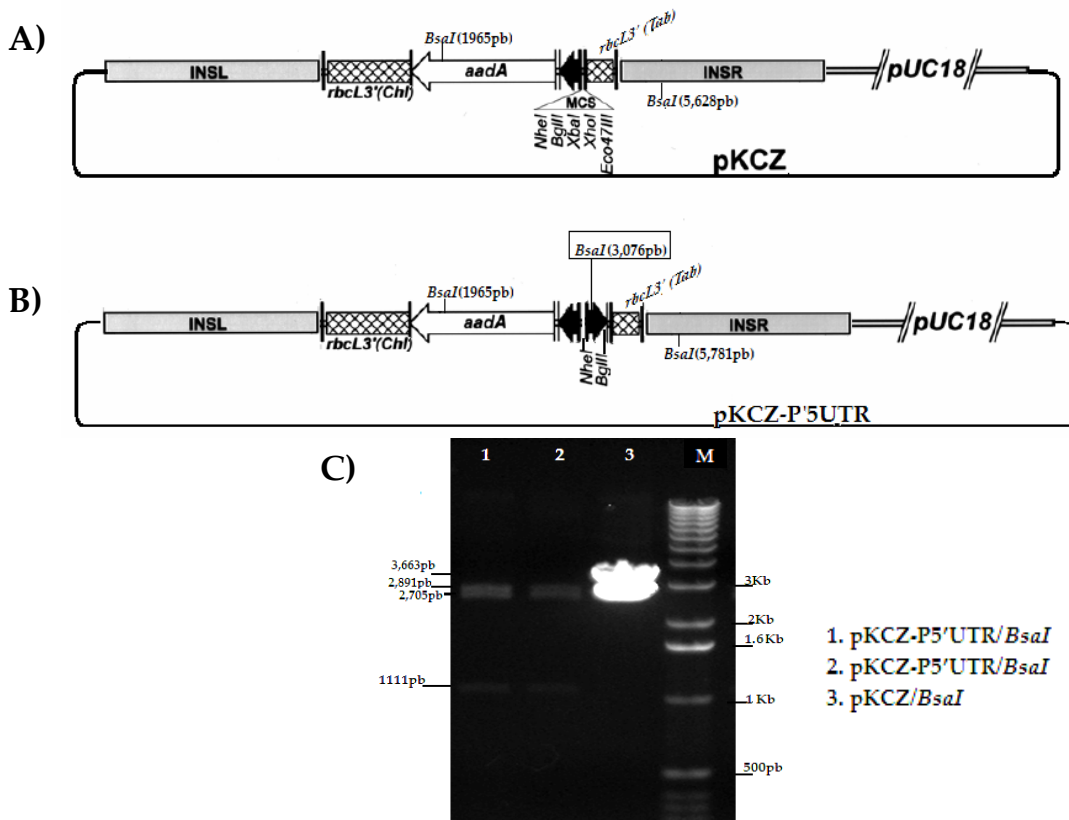


Figura 24. Análisis de restricción del vector pKCZ-P5'UTR. A) Mapa del plásmido pKCZ indicando los sitios de restricción del sitio múltiple de clonación y los sitios *BsaI* para el análisis de restricción. **B)** Mapa del plásmido modificado pKCZ con la región P5'UTR, indicando en el recuadro el sitio interno *BsaI*. **C)** Resultado de la digestión con *BsaI*, los carriles 1 y 2 corresponden al mapa mostrado en el inciso B, el carril 3 corresponde al mapa A. M) Marcador de peso molecular de 1Kb. Gel de agarosa 1%.

8.2.3. Generación de vectores de expresión de Protegrinas en cloroplasto

8.2.3.1. Diseño y optimización de genes sintéticos de Protegrina

Se realizó una búsqueda bibliográfica de proteínas con actividad antimicrobiana. En base a la eficiencia, y el amplio rango de acción, se seleccionaron tres péptidos antimicrobianos de Protegrina. El primer péptido seleccionado, fue la Protegrina 1 (PG1), descubierta en cerdos (Kokryakov *et al.*, 1993). La PG1 es la más ampliamente caracterizada (Bellm *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2000; Mosca *et al.*, 2000; Shi y Ganz *et al.*, 1998), sin embargo debido a que la Protegrina 1 puede tener actividad hemolítica, se seleccionaron dos



Protegrinas sintéticas que conservan la actividad antimicrobiana, sin la actividad hemolítica. La Protegrina IB367 (PG-IB237) que ya ha sido utilizada en pacientes con fibrosis quística y en pacientes con mucositis y se encuentra en fase III (Chen *et al.*, 2000) y finalmente en base a la selectividad antimicrobiana, se eligió la Protegrina cíclica con tres cisteínas (PG3cc) sintetizada por Tam *et al.* (2003) ya que se desea investigar si puede tener la capacidad de ciclarse y ser activa en plantas. La Fig 25 muestra la homología en aminoácidos de las protegrinas seleccionadas.

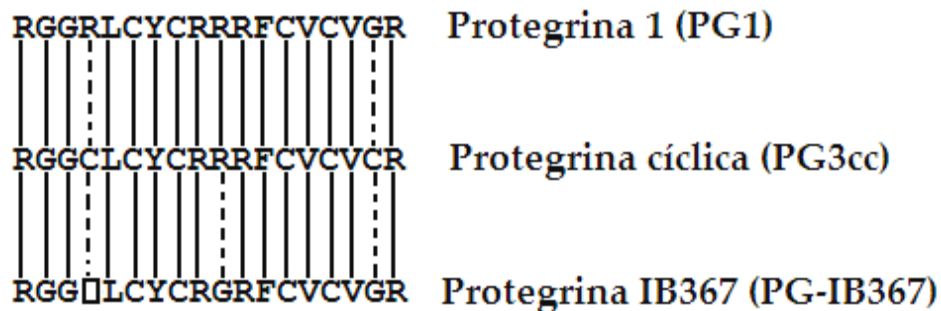


Figura 25. Homología en aminoácidos de protegrinas.

Se ha demostrado que la carga positiva de las Protegrinas (dada por las argininas), así como los puentes disulfuro entre Cisteínas, son muy importantes para la actividad antimicrobiana (Yasin *et al.*, 1996).

En el 2000 fue posible producir en cloroplastos de tabaco una proteína que al igual que las protegrinas, 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 *et al.*, 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 *et al.*, consistió en fusionar un gen de Ubiquitina al gene de interés (somatotropina), y aún cuando no se conocen ubiquitin proteasas en cloroplastos, el procesamiento de la somatotropina 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, que la Ubiquitina funcionó como chaperona para formar los puentes disulfuro, lo que les permitió obtener una proteína biológicamente activa.

En base a los resultados obtenidos por Staub *et al.* (2000), en el presente trabajo, se diseñaron genes de protegrina fusionados a Ubiquitina, con la finalidad de obtener protegrinas con puentes disulfuro y que iniciaran con arginina en la parte amino terminal.

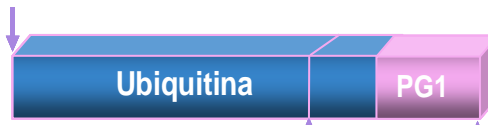
Se mandó a sintetizar a la compañía Entelechon (Alemania), un gen con la secuencia de Ubiquitina fusionada a la Protegrina1. La estrategia para fusionar la secuencia de Ubiquitina a las otras dos Protegrinas, consistió en que sin modificar la secuencia de aminoácidos de la Ubiquitina, se introdujo un sitio de restricción *Sal I* en la posición 200 a 206 del gen de Ubiquitina. Los genes de la Protegrina 3cc y la Protegrina IB367, se mandaron sintetizar con una parte del gen de Ubiquitina, a partir del sitio de restricción *Sal I*, lo que permitió experimentalmente fusionar el gene de Ubiquitina a los genes de las Protegrinas IB367 y 3cc (Fig 26).

Debido a que originalmente, no se contaba con un vector específico de cloroplastos, se agregaron varios sitios de restricción en los flancos de los genes antimicrobianos, como se muestra en la Fig 26. Como lo sugiere Arakawa *et al.* (1999), para obtener una mayor eficiencia en la expresión de los péptidos recombinantes, se mandaron sintetizar los genes de acuerdo al uso preferencial de codones en cloroplastos de tomate y zanahoria sin cambiar la secuencia de aminoácidos, los sitios de restricción no fueron modificados. La síntesis fue realizada por la compañía Entelechon en Alemania.



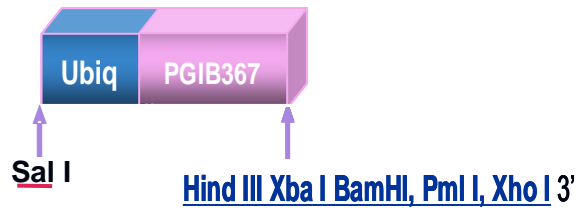
A)

5' Sal I Sac I, KpnI, NheI, StuI, EcoRV, PaeI



Sal I Hind III Xba I BamHI, Pml I, Xho I

B)



C)



Figura 26. Representación esquemática del diseño de genes sintéticos. A). El gen de protegrina fusionado a Ubiquitina fue clonado en el vector pBlueScriptIIISK(+) el sitio *Sal I* (subrayado en rojo), ya se encontraba en el extremo 5' del vector. Se muestra además el sitio *Sal I* que fue introducido en la secuencia de la Ubiquitina y los sitios de restricción adicionales en los extremos 5' y 3'. **B)** El gen de la Protegrina IB367 fusionado a la parte 5' de la Ubiquitina, con el sitio *Sal I* en el extremo 5' y los sitios de restricción adicionales en el extremo 3', clonado en el vector Topo T4 **C).** El gen de la Protegrina 3cc fusionado a ubiquitina presenta los mismos sitios que los descritos en el inciso B. Todos los genes fueron clonados por la compañía Entelechon, (Alemania).

8.2.3.2. Fusión del gen de Ubiquitina a las Protegrinas: PG3cc y PGIB367

La compañía Entelechon clonó los genes sintéticos optimizados en diferentes vectores, un vector TopoT4 clonación®, contenía la protegrina PG3cc, otro TopoT4 clonación® contenía PGIB367 y la fusión de los genes de Ubiquitina-

PG1 fueron clonados en el vector pBluescriptSKII(+). Con el objetivo de ligar el gen de Ubiquitina a los dos genes de Protegrina, todos los vectores fueron electroporados en la cepa DH5 α de *E. coli*, y para obtener altas concentraciones de plásmido se realizaron maxipreparaciones de ADN y una vez obtenido el ADN plasmídico a gran escala, se realizó la digestión con la enzima *Sal I*, tal como se describe en metodología. El vector pBSKII(+) contenía un sitio interno *SalI* que fue utilizado para la purificación del gen de Ubiquitina de 299 pb, como se muestra en la Fig 27.

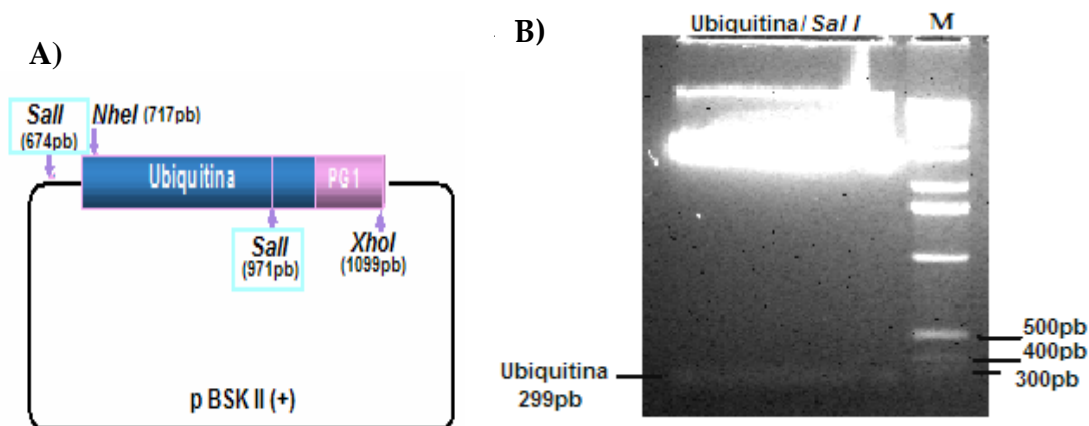


Figura 27. Purificación del gen de Ubiquitina. A) Representación esquemática del vector pBluescriptSKII (+), que contiene la fusión Ubiquitina-PG1. **B)** Producto de la digestión con la enzima *Sal I*, del vector pBluescriptSKII(+)-PG1, el gen de Ubiquitina es señalado con un tamaño de 299pb. M) Marcador de peso molecular 1Kb. Gel de agarosa al 2%.

Los vectores Topo-PG3cc y Topo-PGIB367 fueron linealizados y purificados después de ser digeridos con *Sal I*. La ligación se realizó utilizando la T4 DNA ligasa en presencia del fragmento del gen de Ubiquitina purificado (Fig 27) y los vectores linealizados de Topo-PG3cc y Topo-PGIB367 (Fig 28). Los productos de la ligación fueron electroporados en la cepa DH5 α de *E. coli*, las bacterias se crecieron en medio selectivo con Kanamicina. Se recuperaron las clonas que crecieron en medio selectivo, y se realizó la caracterización mediante análisis de restricción con las enzimas *NheI* y *XhoI*. Debido a que la clonación del gen de



Ubiquitina se realizó en el sitio *Sall*, el inserto de la Ubiquitina podía quedar en ambas orientaciones [(5'→3' (~430pb) ó 3'→5' (~150pb)], por lo que se seleccionaron las clonas positivas para la orientación deseada 5'→3 mediante el tamaño de banda de 430 pb observado al digerir con las enzimas *NheI* y *XhoI* (Fig 28 B).

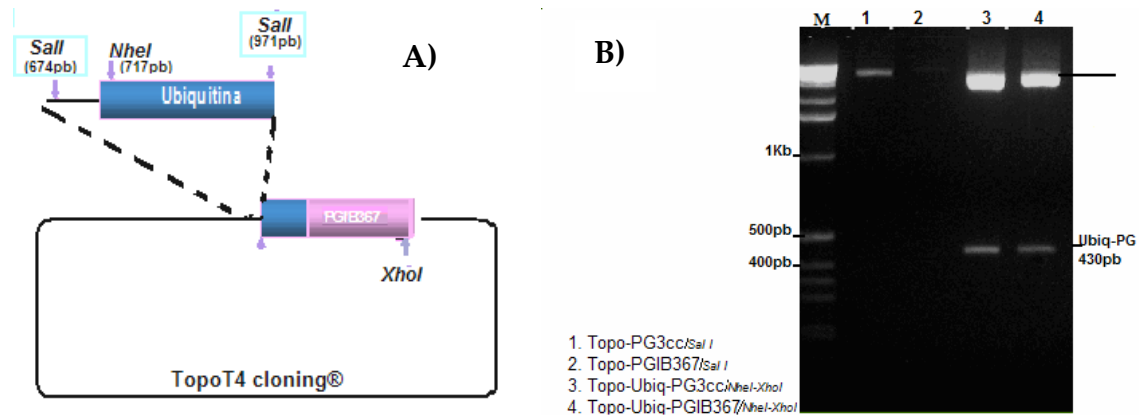


Figura 28. Unión de los genes PG3 y PGIB367 a Ubiquitina. A) Diagrama esquemático de la ligación de Ubiquitina en el vector Topo T4 cloning-PGIB367 (ó Topo T4® cloning-PG3cc). **B)** Análisis de restricción de Topo T4 cloning. Carriles 1 y 2 digestiones con *Sall*, carriles 3 y 4 digestiones *NheI* y *XhoI* de la ligación con el gen de Ubiquitina a PG3 y PGIB367. M) Marcador de peso molecular 1Kb. Gel de agarosa 2%.

8.2.3.3. Subclonación de los genes de Ubiquitina-Protegrina en el vector pKCZ para la transformación de cloroplastos

Los genes de Ubiquitina-Protegrina, fueron purificados de agarosa, después de ser digeridos con las enzimas *NheI* y *XhoI*, y se ligaron con los sitios *XbaI* y *XhoI* del vector pKCZ previamente digerido con estas enzimas. A las bacterias resultantes de la transformación de *E. coli* con el producto de la ligación se les realizó extracción del ADN plasmídico, y éstos se digirieron con las enzimas *NheI* y *XhoI* para determinar si efectivamente los genes ubiquitina-protegrina se habían clonado adyacentes a la región P5'UTR del plásmido pKCZ. Esto se demostró al observar el producto de las digestiones con bandas de 560pb (Fig 29 B).

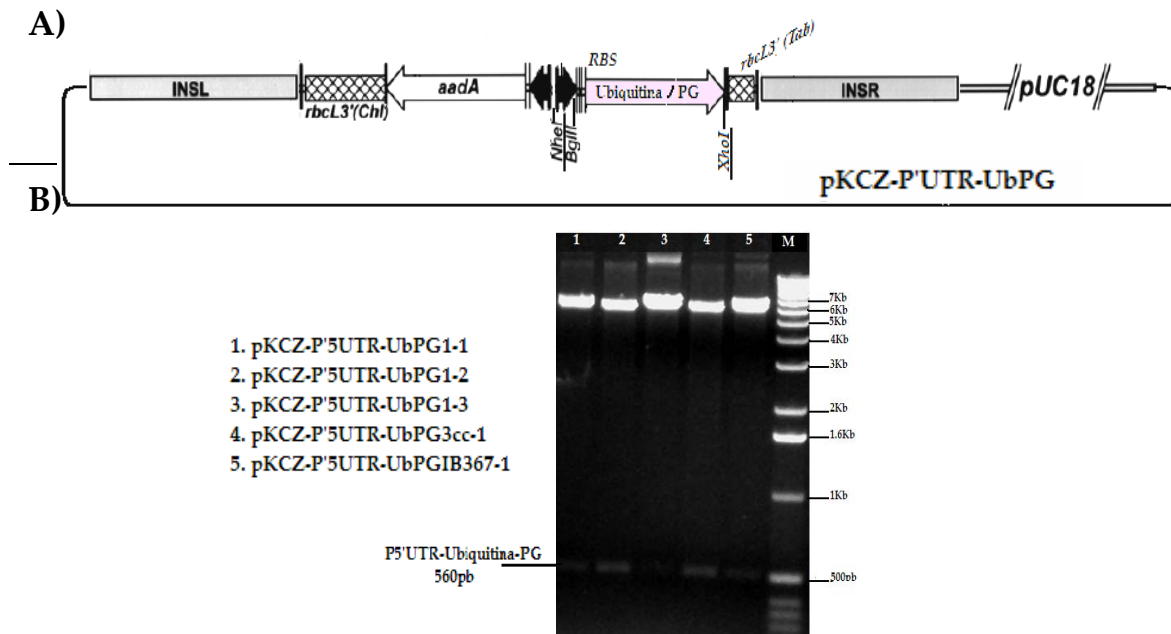


Figura 29. Análisis de restricción de vectores de expresión de Protegrinas en cloroplastos. A) Mapa del vector PKCZ con un gen de Protegrina fusionado a Ubiquitina, se muestran subrayados los sitios *NheI-XhoI*. B) Análisis de restricción con las enzimas *NheI-XhoI* del vector pKCZ-P'5UTR con cada uno de los genes de Protegrina. M) Marcador de peso molecular 1Kb. Gel de Agarosa al 1%.

8.2.4. Vectores para transformación de cloroplastos con genes reporteros

8.2.4.1. Amplificación de los genes reporteros para GUS y GFP-GUS

Una herramienta útil para demostrar la eficiencia de los métodos de transformación, es la utilización de genes reporteros. En el presente trabajo se construyeron vectores de expresión para cloroplasto con los genes *uidA* (GUS) para la enzima beta glucuronidasa, y la fusión *gfp-uidA* (GFP-GUS) para la proteína verde fluorescente fusionada a GUS (Hibberd *et al.*, 1998). Los genes reporteros para GUS y GFP-GUS fueron amplificados mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), a partir de los vectores pBI121 y pCAMBIA 1304 respectivamente. Debido a que los genes reporteros se encontraban en vectores para la transformación nuclear de plantas fue necesario introducir secuencias regulatorias específicas de cloroplasto como el Sitio de Unión al Ribosoma para cloroplasto (RBS) (Maliga, 2003). Esto se realizó amplificando



con oligos que portaban la secuencia RBS y sitios de restricción para su clonación (Fig 30).

GUS-F

5' gc tctagag agagttgtag ggagg gattt **ATG** ttacgtcctgtagaaacccaaccctga 3'
Xba I RBS Gene *uidA*

GFP-F

5' gc tctagag gcagttgtag ggagg gattt **ATG** gtagatctgactagtaaaggagaagaactt 3'
Xba I RBS Gene *gfp*

GUS-R

5' ccg ctcgag cgg **TCA** ttggttgccctccctgctgcggttttca 3'
Xho I Gene *uidA*

Figura 30. Diseño de oligonucleótidos para genes reporteros. Se indican los sitios de restricción para su posterior subclonación, el RBS y la secuencia del gen a amplificar. En mayúsculas se indica el codón de inicio (ATG) y el codón de paro (TCA). Los oligos se sintetizaron en el Centro de Biotecnología de la Universidad de Illinois en Urbana-Champaign

Resultado de PCR de los genes reporteros

Para realizar la amplificación de los genes reporteros, es necesario contar con ADN de buena calidad. Los plásmidos pBI121 y pCAMBIA1304, se utilizaron para transformar cepas de *E. coli* DH5 α , (Sección 7.3), y se realizaron minipreparaciones de ADN con la finalidad de obtener ADN puro y en cantidad suficiente.

Se estandarizaron las condiciones de PCR utilizando la Polimerasa *Taq* Platinum *Pfx*. La enzima *Pfx*, es una enzima de alta fidelidad, por lo que el rango de error es mínimo y se encuentra alrededor de 3.5×10^6 pb (Arezi *et al.*, 2003). La Fig 31 muestra los productos de amplificación de los genes reporteros.

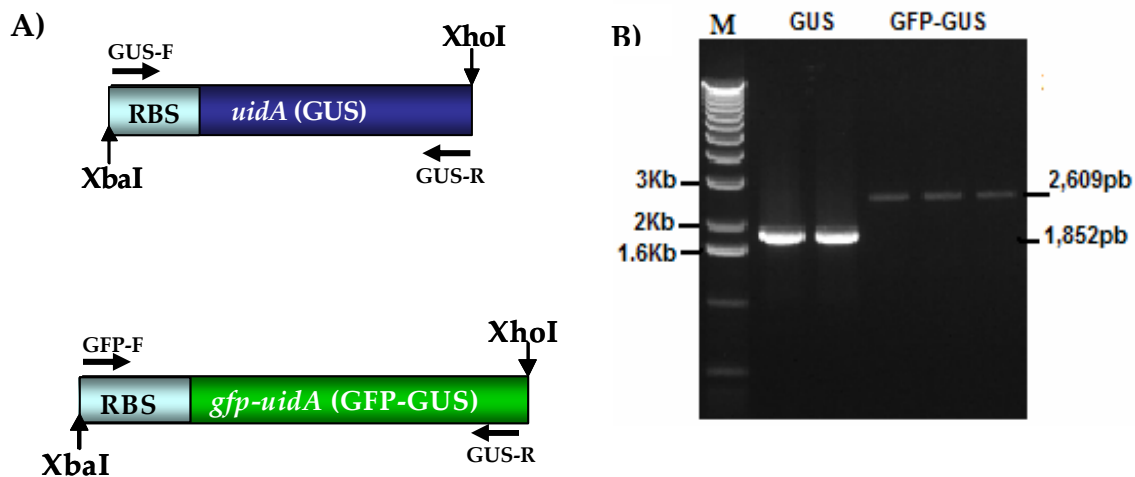


Figura 31. Amplificación mediante PCR de genes reporteros para GFP y GFP-GUS. A) Diagrama esquemático de los productos de PCR obtenidos, indicando los elementos clave para su posterior subclonación en el vector para cloroplastos. **B)** Productos de PCR de los genes *uidA* (GUS) y *gfp-uidA* (GFP-GUS). M) Marcador de peso molecular de 1Kb. Gel de Agarosa 1%.

8.2.4.2. Clonación del gen *uidA* (GUS) en el vector pKCZ para la transformación de cloroplastos

El producto de PCR del gene *uidA* se digirió con las enzimas *NheI-XhoI* y se purificó utilizando un Kit de QIAGEN® para fragmentos de PCR, el vector pKCZ-P'5UTR se digirió con las enzimas *XbaI-XhoI* y se purificó de la misma forma. Ambos fragmentos compatibles, fueron ligados utilizando la enzima T4 DNA ligasa, el producto de la ligación se utilizó para electroporar una cepa DH5 α de *E. coli*. A las bacterias resultantes de la transformación se les realizó extracción del ADN plasmídico, y se digirieron con la enzima *BsaI* para determinar si el gen *uidA* se había clonado adyacente a la región P5'UTR del plásmido pKCZ. Esto se demostró al observar que el producto de las digestiones del vector pKCZ-P'5UTR-GUS, libera una banda de 4,551 pb (Fig 32 B).

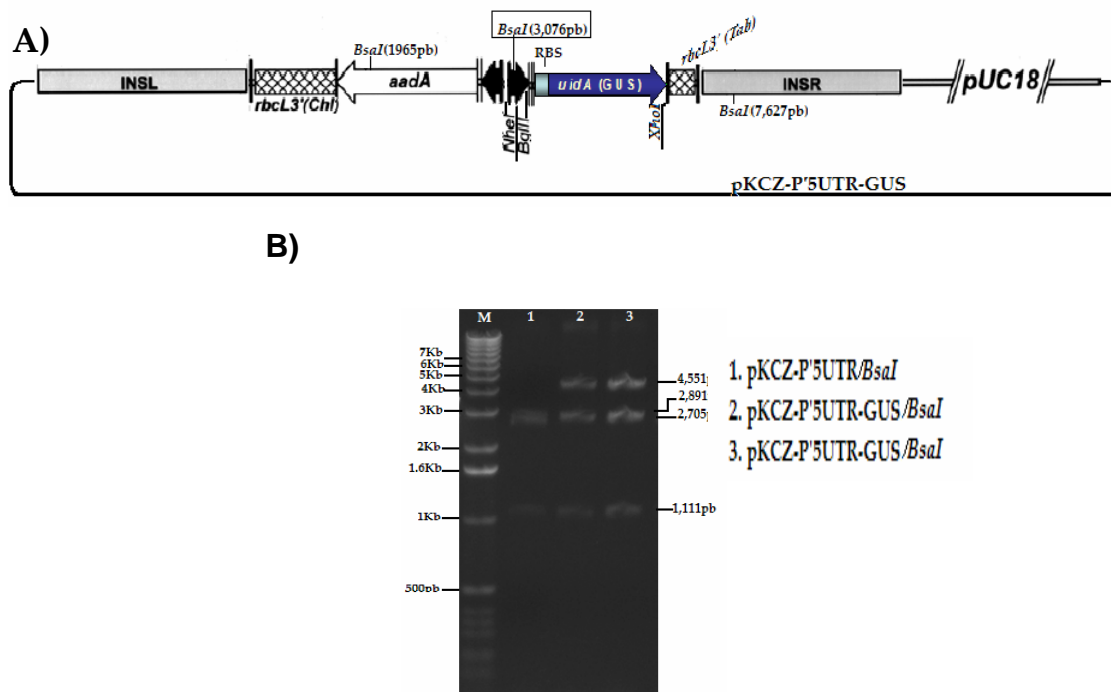


Figura 32. Análisis de restricción del vector pKCZ-P'5UTR-GUS A) Mapa de restricción pKCZ-P'5UTR-GUS, indicando los sitios de restricción *BsaI*. B) Análisis de restricción de productos de la ligación pKCZ-GUS con la enzima *BsaI*. M) Marcador de peso molecular 1 Kb. Gel de agarosa 1%.

8.2.4.3. Clonación del gen *uidA-gfp* (GFP-GUS) en el vector pKCZ para la transformación de cloroplastos

El producto de PCR de los genes fusionados *uidA-gfp* se digirió con las enzimas *NheI-XhoI*, se purificó utilizando un Kit de QIAGEN® para fragmentos de PCR, el vector pKCZ-P'5UTR se digirió con las enzimas *XbaI-XhoI* y se purificó de la misma forma. Ambos fragmentos compatibles, fueron ligados y el producto de la ligación se utilizó para electroporar una cepa DH5 α de *E. coli*, las bacterias se crecieron en medio selectivo, se les realizó una mini preparación de ADN plasmídico y se caracterizaron con las enzimas *NheI-XhoI* para demostrar la ligación del gen fusionado GFP-GUS en el vector pKCZ-P'5UTR se detectó una banda de 2,757 pb como se observa en la Fig 33 B.

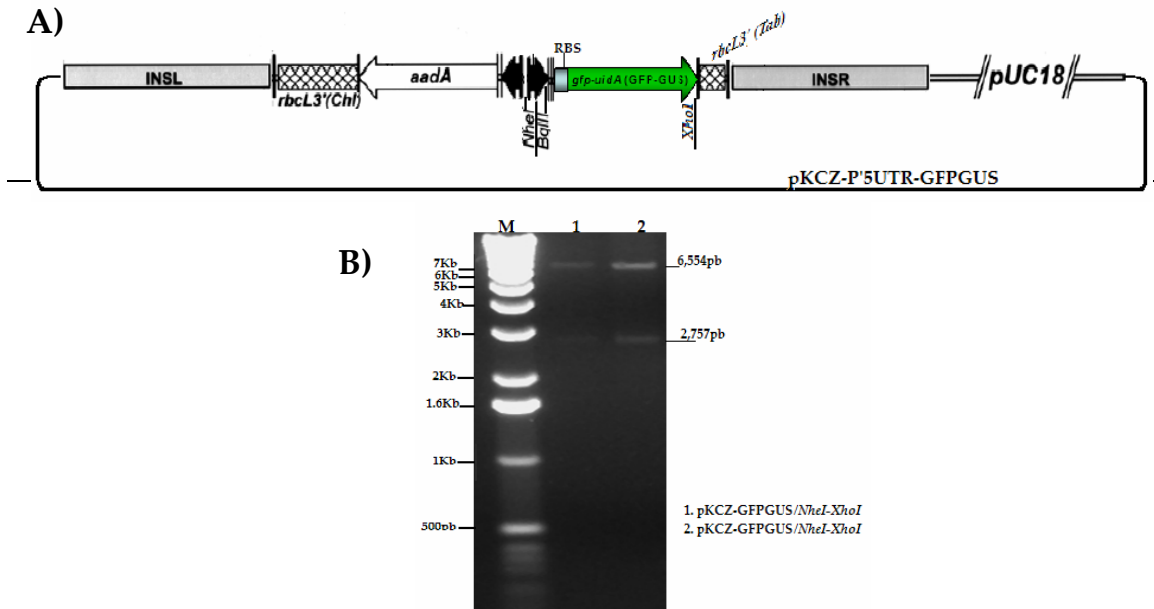


Figura 33. Análisis de restricción del vector pKCZ-P'5UTR-GFPUGS A) Mapa de restricción pKCZ-GFPUGS, indicando los sitios de restricción *NheI-XhoI*. B) Análisis de Restricción de productos de la ligación pKCZ-GFPUGS con las enzimas *NheI-XhoI*. M) Marcador de peso molecular 1Kb. Gel de agarosa al 1%.

8.2.5. Análisis de expresión de vectores para transformación de cloroplasto en *Escherichia coli*

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, 2001; Chin *et al.*, 2003; Fernández-San Millan *et al.*, 2003). En contraste existe un reporte en el que se sugiere que las pruebas preliminares en *E. coli* no son confiables (Magee *et al.*, 2003).



8.2.5.1. Detección de la proteína verde fluorescente (GFP) de *Aequorea victoria* en *E. coli*

En el presente trabajo se realizaron pruebas preliminares en *E. coli* con el objetivo de evaluar la funcionalidad de las construcciones para la transformación de cloroplastos. Para detectar la proteína verde fluorescente (GFP) en *E. coli* fue necesario someter la cepa DH5 α transformada con el vector pKCZ-P'5UTR-GFPGUS, a cambios de temperatura como los sugieren Penna e Ishii (2002). Las bacterias fueron crecidas a 37°C y después de 24 hrs se dejaron a 4°C durante 4 días. La expresión de la proteína GFP se detectó en un transiluminador con luz ultravioleta (Fig 34), demostrando que la construcción pKCZ-P'5UTR-GFPGUS es funcional.

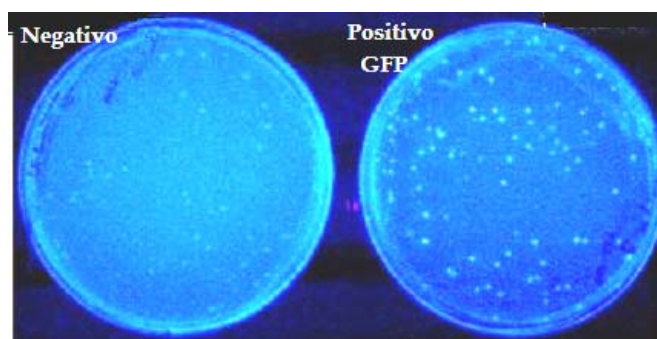


Figura 34. El vector de expresión pKCZ-GFPGUS es funcional en *E. coli*. Análisis de expresión de la proteína verde fluorescente. Cultivos de *E. coli* crecidas en cajas de Petri durante 24hrs a 37°C y posteriormente incubados durante 4 días a 4°C. Las cajas se expusieron a luz ultravioleta utilizando un Transiluminador FBTIV-88 Fischer Scientific.

8.2.5.2. Inmunodetección de la proteína de Ubiquitina en *E. coli*

Se realizó una extracción de proteínas de las cepas DH5 α transformadas con los vectores pKCZ-P'5UTR-UbPG. Posterior a la extracción de proteína (Sección 7.5), se realizaron ensayos para la inmunodetección de la Ubiquitina, utilizando un anticuerpo monoclonal contra Ubiquitina de levadura. Como se muestra en la Fig 35, los resultados fueron positivos para las cepas que contenían las construcciones de Ubiquitina-PG, pero no así para los controles negativos, demostrando que nuestra construcción es funcional.

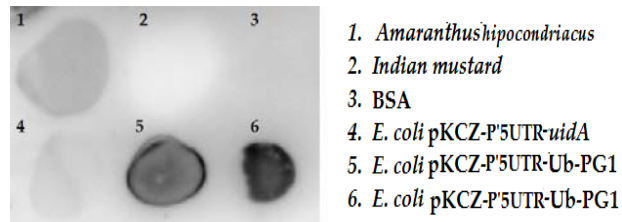


Figura 35. Inmunodetección de Ubiquitina en extractos proteicos de *E. coli*. En la imagen se muestran los resultados positivos para los números 5 y 6 que corresponden a las construcciones que contienen el gen de la Ubiquitina, los controles negativos (1-3), confirma la especificidad del anticuerpo monoclonal de ubiquitina.

8.2.6. Construcción de un vector bicistrónico con la fusión Ubiquitina-PG1 para la transformación de cloroplastos

Como ya se mencionó el vector pKCZ, tiene secuencias homólogas al plastoma, por lo que la inserción del transgén ocurre en la región de repetidos invertidos por una doble recombinación homóloga, de forma que el gen de interés queda flanqueado por el promotor *Prrn* dos veces, además de que este promotor se encuentra en dos copias en el vector pKCZ. En algunos casos las secuencias repetidas directas, que flanquean a un gen o grupo de genes, al recombinar eliminan dichos genes, originando deleciones intersticiales o intragénicas (Griffiths *et al.*, 1998). Además por comunicación personal con el Dr Koop (donador del vector pKCZ) se sugiere que en alguna etapa del desarrollo de la planta, ésta podría perder el transgén por eventos intramoleculares de recombinación homóloga (Zou *et al.*, 2003).

Debido a este inconveniente con los vectores generados, existen dos alternativas para evitar este problema, la primera consiste en eliminar la región del promotor junto al gen de selección *aadA* en el vector pKCZ-P'5UTR-UbPG y dejar solo el gen de interés bajo la región *Prrn*-5'UTR, este vector con la deleción puede ser utilizado para realizar co-bombardeos con el vector original pKCZ, en una relación 10:1. Las células que sean capaces de crecer en presencia del agente de selección, se asume también contendrán el gen antimicrobiano. La segunda alternativa consiste en generar un vector bicistrónico, en el que un solo promotor dirigiera la expresión tanto del gene de



la protegrina como el del marcador de selección a espectinomicina (*aadA*). Existen varios reportes en donde se demuestra que la expresión de genes en cistrones es funcional en cloroplastos. En diversos trabajos se ha utilizado el promotor *Prrn* para dirigir la expresión de dos cistrones separados por una región 3'UTR y un sitio de unión a ribosoma (Staub y Maliga, 1995; Lössl *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2004). En otros trabajos se demostró que se puede prescindir del uso de la región 3'UTR entre los dos cistrones, como fue el caso de la expresión del gen *aadA* (“aminoglycoside adenylyl transferase” que confiere resistencia a espectinomicina) y de un gen de interés separados únicamente por el sitio de unión a ribosoma (RBS) bajo la regulación de un promotor *Prrn*. (Kota *et al.*, 1999; DeGray *et al.*, 2001; Fernández-San Millan *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003; Ruiz *et al.*, 2003; Jeong *et al.*, 2004; Molina *et al.*, 2004; Watson *et al.*, 2004). Ruiz *et al.*, sugieren que aunque se sabe que la región 3'UTR es importante para la estabilidad del RNA mensajero y la expresión de los transgenes, según sus resultados es prescindible colocarla entre los cistrones cuando se expresan en el cloroplasto, ya que inclusive en el mismo existen alrededor de 60 policistrones similares en el genoma del cloroplasto (Sugita y Sugiura, 1996).

En base a lo anterior, la estrategia que se utilizó para la construcción del vector bicistrónico se describe a continuación.

El primer objetivo fue generar un vector que no contuviera el Promotor *Prrn*, que dirige la expresión del gen de selección (*aadA*) para lo que se realizaron digestiones con las enzimas compatibles *NheI* y *SpeI*. El sitio *SpeI* se localiza en las posiciones 1,614 y 2,877 del vector, por lo que al realizar la digestión con *NheI* (2,985pb), se espera obtener una combinación de bandas de 5,788pb; 5680pb; 1,371pb; 1,263pb y 108pb que pueden ser observadas en las Figuras 36 A y 36 C. Se purificaron las bandas de 5,780pb y 5,680pb y se realizó una reacción de ligación del vector para obtener un vector que solo contuviera un promotor unido al gen Ub-PG1. El vector religado pKCZ-P'UTR-UbPG1del (Fig



36-A), se utilizó junto con el vector pKCZ (Fig. 36 A) para realizar co-bombardeos en hojas de tabaco.

Por otro lado se purificó el gen de *aadA* junto a su promotor y regiones 5' y 3'UTRs el cassette se obtuvo con las enzimas *KpnI* y *EcoRV* (Fig 36 B). El fragmento obtenido de 1,295pb fue purificado del gel de agarosa 1% (Fig 36 D). El sitio *KpnI* fue rasurado para generar extremos romos con una enzima Klenow para generar un casete de extremos romos portando el gen de selección Sección 7.4.2 (Fig 36).

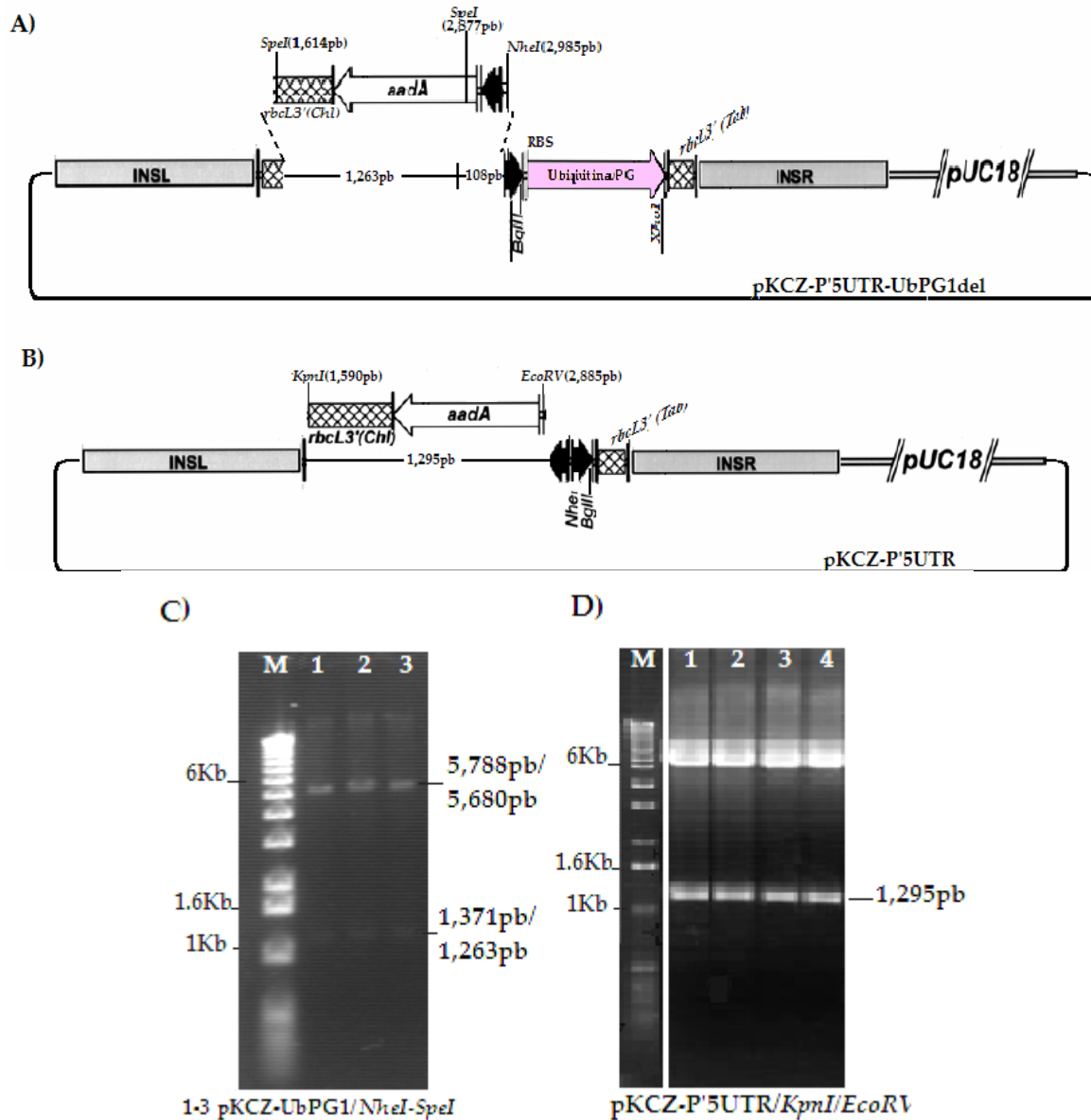


Figura 36. Estrategias de restricción y ligación para la generación del vector bicistónico conteniendo la PG1. A) Mapa de restricción del vector pKCZ-UbPG1 para eliminar el promotor unido al gen *aadA*, con las enzimas *NheI* y *SpeI* y generar el vector pKCZ-P'5UTR-UbPG1del, utilizado para co-bombardeo. **B)** Mapa de restricción del vector pKCZ-P'5UTR, indicando los sitios de restricción *KpnI* y *EcoRV* para purificar el gen *aadA* unido a sus elementos regulatorios como RBS (sitio de unión a ribosoma) y la región 3'UTR del gen de rubisco de *Chlamydomonas*. **C)** Resultado de la digestión con las enzimas *NheI* y *SpeI* del vector pKCZ-UbPG1 para purificar el vector con la deleción indicada en el mapa A. Marcador de peso molecular 1Kb. **D)** Resultado de la digestión con las enzimas *KpnI* y *EcoRV* del vector pKCZ-P'5UTR, para purificar el gen *aadA* indicado en el mapa B. M) Marcador de peso molecular 1Kb. Gel de Agarosa 1%.



Una vez que se tenía el vector pKCZ-UbPG1 con la delección de la región promotora, se seleccionaron las clonas caracterizadas como positivas (datos no mostrados), y se les realizó una digestión con la enzima *PmlI* como se muestra en la Fig 37, para obtener un vector con extremos romos en la parte 5' de UbPG1, para la subclonación del gene *aadA* (Fig 37).

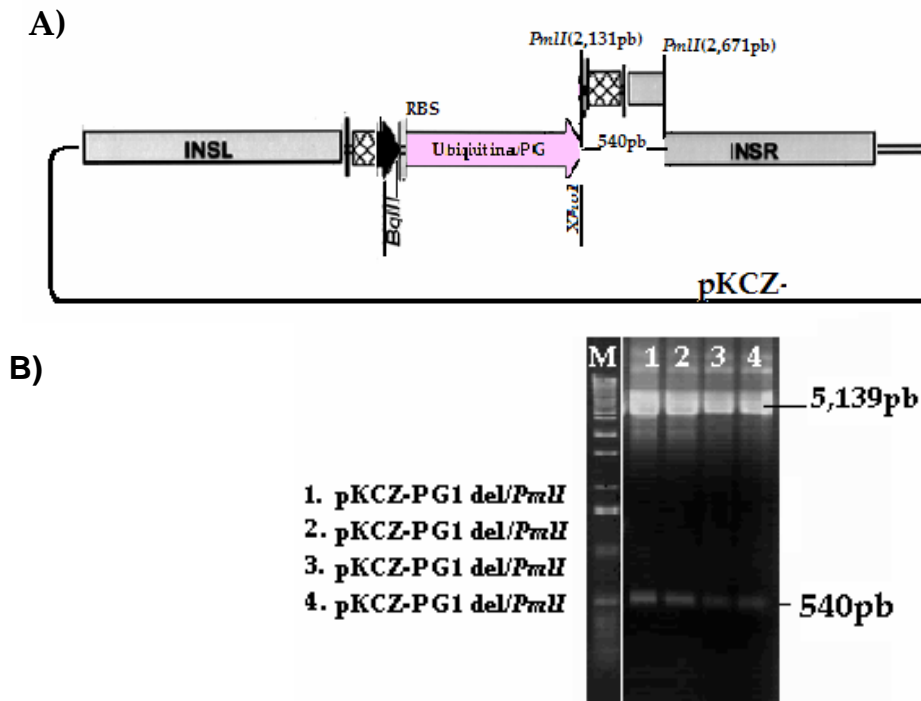


Figura 37. Purificación del vector pKCZ-UbPG1 con extremos romos para la subclonación del gen *aadA*. A) Mapa de restricción del vector pKCZ-UbPG1 del, indicando la posición de los sitios de restricción *PmlI*. B) Resultados de la digestión con la enzima *PmlI* del vector pKCZ-UbPG1. M) Marcador de peso molecular 1Kb. Gel de agarosa 1%

Una vez purificado el vector con los extremos romos y fue posible realizar la ligación con el gen *aadA* (flanqueado en 5' por el RBS y la región 3' UTR de *RbcL* de tabaco), el cual previamente había sido tratado con Klenow, para dejarlo con extremos romos.

La ligación se realizó con la enzima T4 DNA ligasa, como se describe en la sección 7.3 de metodología. Se obtuvieron clonas positivas del producto de la ligación y fueron caracterizados con diferentes enzimas. Debido a que la ligación



es en extremos romos, el gen puede quedar en la dirección $5' \rightarrow 3'$ ó $3' \rightarrow 5'$. En la Fig 38 se muestra el análisis de restricción con las enzimas *NotI*, y con *SmaI* en la que se pueden ver resultados para la orientación $5' \rightarrow 3'$. En el caso de cortar con *NotI* la orientación $5' \rightarrow 3'$ del bicistrónico liberaría dos fragmentos, uno de 4,630pb y otro de 1,802 pb como se muestra en la Fig 38 B carril 3. En el caso de digerir con la enzima *SmaI* los fragmentos esperados del bicistrónico corresponden a 4,538pb y 1,905pb para las dos orientaciones, como se muestra en los carriles 1-3 de la Fig 38 C.

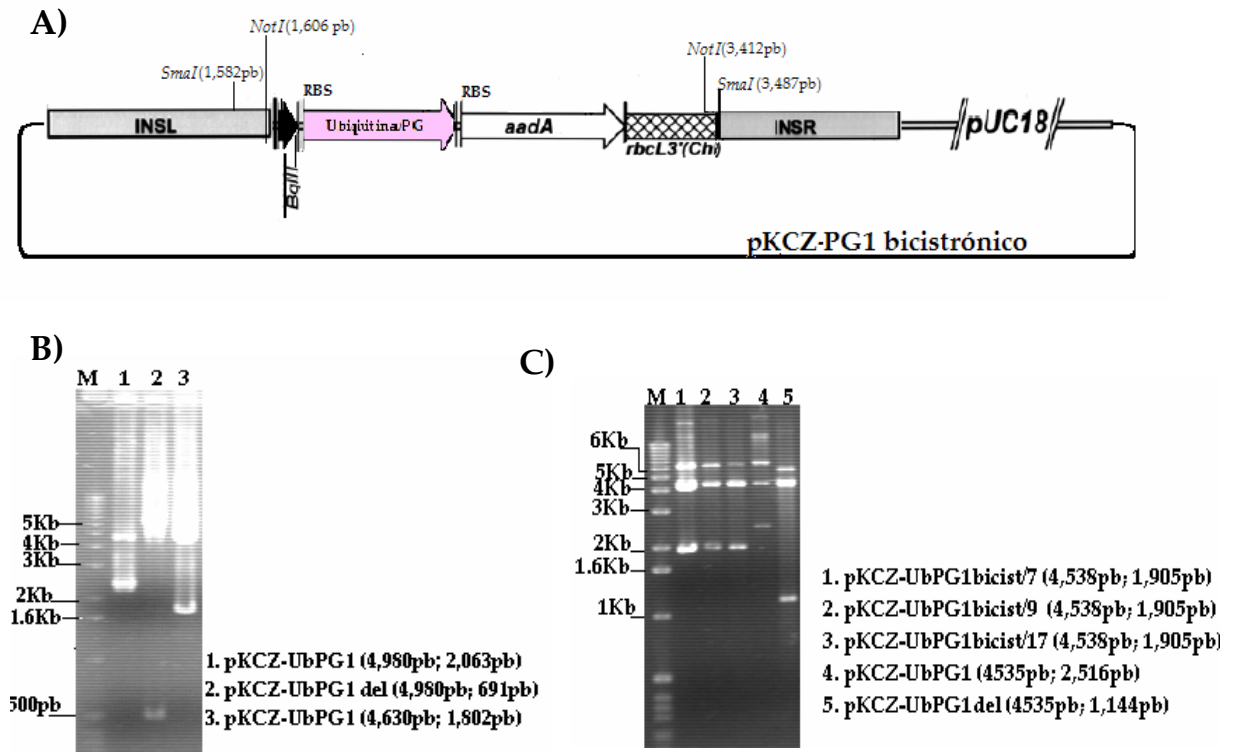


Figura 38. Análisis de restricción del vector bicistrónico para la PG1. A) Representación esquemática del vector pKCZ-PG1 bicistrónico, indicando la forma en la que se clonaron los genes, en la orientación 5'→3'. **B)** Resultado de la digestión enzimática con la enzima *NotI*; en la imagen se indican los tamaños esperados para cada vector digerido. **C)** Resultado de la digestión enzimática con la enzima *SmaI* en la imagen se indican los tamaños esperados para cada vector digerido. M) Marcador de peso molecular 1Kb. Ambos geles de agarosa 1%.



8.2.7. Ensayos de biobalística para la transformación genética de cloroplastos

Durante la construcción de los vectores para transformación de cloroplastos, se germinaron y crecieron plantas de tabaco en medio MS en condiciones de esterilidad. Las hojas de tabaco fueron utilizadas para realizar experimentos de biobalística con las construcciones del vector pKCZ-P5'UTR-UbPG1 bicistrónico y por otro lado se realizaron co-bombardeos con las construcciones pKCZ-P5'UTR-PG1del y pKCZ (Fig 39) como se describe en la sección 7.8.2 de metodología. Se realizaron los experimentos de biobalística con 10 repeticiones para el vector bicistrónico y 10 repeticiones con los vectores para co-bombardeo. A la fecha solo en una de las repeticiones del experimento de co-bombardeo se han obtenido brotes verdes (Fig 39 B) creciendo en medio selectivo con espectinomicina y solo se han obtenido brotes blancos (Fig 39 A), en los disparos con el bicistrónico. Estudios previos sugieren que por hoja bombardeada se espera una planta transplastómica (Comunicación personal Amith Dhingra).

Los experimentos de biobalística de hojas de tabaco deben realizarse a una distancia de 9cm y con una presión de 1100psi con 28 mg de Mercurio para la bomba de vacío (Svab, 1990), sin embargo en el presente trabajo fallas técnicas en la bomba de vacío, no permitieron alcanzar los 28mm y se utilizaron 23mm, por lo que se considera este factor como uno de los principales determinantes en la poca eficiencia obtenida de transformación.

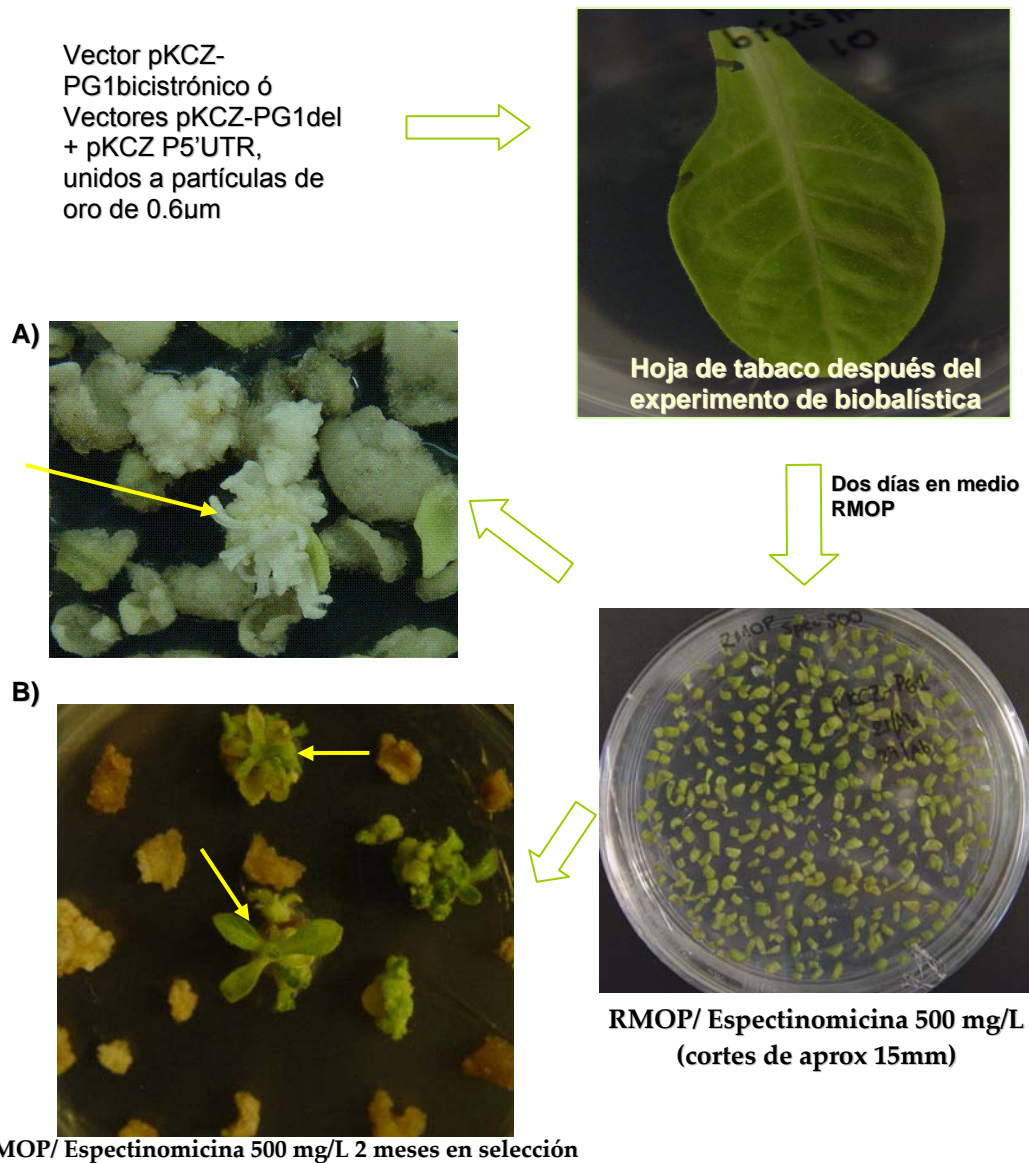


Figura 39. Resultados obtenidos de la transformación de cloroplastos. Las construcciones fueron utilizadas para realizar los experimentos de biobalística, en hojas de tabaco como se muestra en la figura. **A)** Las flechas indican los brotes de tabaco, indicando que el agente de selección de espectinomicina funciona correctamente, ya que se pueden ver brotes blancos en las plantas no transplastómicas. **B)** Se obtuvieron brotes verdes (señalados con flechas), con el cobombardeo de los vectores pKCZ-PG1del y pKCZP5'UTR, después de dos meses de selección con espectinomicina 500mg/l.



CONCLUSIONES

- 1) La transformación nuclear de jitomate mediante co-cultivo de *Agrobacterium* con el vector binario pCAMBIA2201 conteniendo la protegrina PG1, fue exitosa, ya que se cuentan con callos, además de 14 brotes de la variedad UC82B y 7 de la variedad AC regenerando en medio selectivo.
- 2) Asimismo la transformación nuclear de zanahoria y lechuga mediante co-cultivo de *Agrobacterium* con el vector binario pCAMBIA1304 conteniendo la protegrina PG1, demostró ser eficiente ya que en el caso de zanahoria contamos con callos embriogénicos creciendo en medios con el agente de selección y para lechuga contamos ya con 15 líneas de las de plantas enraizadas de las cuales al menos 5 dieron positivo para el ensayo de PCR para el transgén de la PG1.
- 3) Cinco de las líneas transgénicas de lechuga demostraron que los extractos proteicos de sus callos tienen actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* y *Lysteria monocytogenes* lo cual demuestra que se pueden producir péptidos recombinantes en plantas con actividad biológica.
- 4) La construcción del vector para la transformación de cloroplasto conteniendo el promotor *Prrn* y la región 5'UTR de la proteína 10 del fago T7 con los genes reporteros GFP-GUS, fue funcional al expresarse en *E. coli* y observarse fluorescencia de las colonias transformadas.
- 5) Las construcciones obtenidas para las protegrinas PG1, PGIB367 y PG3cc fusionadas a la ubiquitina conteniendo el promotor *Prrn* y la región 5'UTR de la proteína 10 del fago T7, demostraron ser funcionales al detectarse la ubiquitina por inmunodetección.
- 6) La transformación de cloroplastos aunque con baja eficiencia posiblemente por problemas del vacío requerido en la pistola al momento de proyectar las construcciones, fue exitosa en los co-bombardos de los vectores pKCZ-PG1del y pKCZP5'UTRT7G10, ya que contamos con dos plántulas de tabaco creciendo en medio selectivo.
- 7) Este es el primer trabajo donde se ha demostrado la actividad antimicrobiana de la protegrina PG1 expresada en plantas transgénicas de lechuga y el primer trabajo donde se han regenerado plantas de un co-bombardos de un vector con un agente de selección y otro con la PG1 sugiriendo la posible presencia de plantas transplastómicas de tabaco.



X. PERSPECTIVAS

1. Obtener plantas adultas transplastómicas de tabaco conteniendo las tres protegrinas utilizadas y evaluar su actividad antimicrobiana para compararla entre ellas y contra las actividad en plantas transformadas nuclearmente.
2. Analizar la actividad de la protegrinas en diferentes etapas de desarrollo de la planta y en la progenie.
3. Probar la actividad antimicrobiana contra otras bacterias y hongos patógenos de humanos así como organismos fitopatógenos.



LITERATURA CITADA

Albrecht MT, Wang W, Shamova O, Lehrer RI, y Schiller NL (2002). Binding of protegrin-1 to *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Respir Res.* **3**:1-8

Allefs SJ H M, Florack DEA, Hoogendoorn C, y Stiekema WJ (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.

Arakawa T, Yu J y Langridge WH (1999). Food plant-delivered cholera toxin subunit for vaccination and immunotolerization. *Adv Exp Med Biol.* **464**:161-178.

Arezi B, Xing W, Sorge JA, y Hogrefe HH (2003). Amplification efficiency of thermostable DNA polymerases. *Anal Biochem.* **321**:226–235.

Andreu D, y Rivas L (1998). Animal antimicrobial peptides: an Overview. *Biopolymer* **47**:415–433.

Argüello-Astorga GR, y Herrera-Estrella LR (1994). Métodos de transformación y vectores de expresión en plantas, en: Vicente M, (ed) Avances en Ingeniería Genética”, 2ª edición, Consejo Superior de Investigaciones Científicas. 41-70.

Bel AJE, Hibberd J, Prüfer D, y Knoblauch M (2001). Novel approach in plastid transformation. *Curr Opin Biotech.* **12**:144–149.

Bellm L, Lehrer RI, y Ganz T (2000). Protegrins: new antibiotics of mammalian origin. *Expert Opin Investig Drugs.* **9**:8, 1731-1742.

Birch-Machin I, Newell Ch A, Hibberd JM y Gray JC (2004). Accumulation of rotavirus VP6 protein in chloroplasts of transplastomic tobacco is limited by protein stability. *Plant Biotech J.* **2**:261–270

Blouin EM, Bouche FB, Steinmetz A, y Muller CP (2003). Neutralizing immunogenicity of transgenic carrot (*Daucus carota* L.) –derived measles virus hemagglutinin. *Plant Mol Biol.* **51**: 459-469.

Bock R (2001). Transgenic plastids in basic research and plant biotechnology. *J Mol Biol.* **312**:425-38.

Bock R, y Khan M.S. (2004). Taming plastids for a green future. *Trends Biotechnol.* **22**:6, 311-318.

Bogorad L (2000). Engineering chloroplasts: an alternative site for foreign genes, proteins, reactions and products. *Trends Biotechnol.* **18**: 257–263.



Boman HG (1991). Antibacterial peptides: key components needed in immunity. *Cell*. **65**:205–207.

Brahmachary M, Krishnan SPT, Koh JLY, Khan AM, Seah H, Tan TW, Brusica UV, y Bajic VB (2004). ANTIMIC: a database of antimicrobial sequences. *Nucleic Acids Res*. **32**:D586-D589.

Canene-Adams K, Campbell JK, Zaripheh S, Jeffery EH, y Erdman JW (2005). The tomato as a functional food. *J Nutr*. **135**:1226–1230.

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

Cantón-Moreno R (2002). Lectura interpretada del antibiograma: ¿ejercicio intelectual o necesidad clínica?. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. **20**:4; 176-86.

Carmona MJ, Molina A, Fernandez JA, Lopez-Fando JJ, 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 JW, Rajasekarana K, Jaynes JM, y Cleveland TE (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.

Chen J, Falla TJ, Liu H, Hurst MA, Fujii GA, Mosca DA, Embree JR, Loury DJ, Radel PA, Chang CCh, Gu L, y Fiddes JC (2000). Development of protegrins for the treatment and prevention of oral mucositis: structure–activity relationships of synthetic protegrin analogues. *Biopolymers* **55**: 88–98.

Chin HG, Kim GD, Marin I, Mersha F, Evans TC, Chenv L, Xu MQ 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.

Chong-Cerrillo C, Selsted ME, Peterson EM, y de la Maza EM (2003). Susceptibility of human and murine *Chlamydia trachomatis* serovars to granulocyte- and epitheliumderived antimicrobial peptides. *J Pept Res*. **61**: 237–242.

Claridades agropecuarias (1998). El jitomate, la hortaliza de excelencia en exportación **62**. <http://www.infoaserca.gob.mx/claridades/marcos.asp?numero=62>

Claridades agropecuarias (1999). Lechuga y trigo. *ASERCA*, **69**.



Clark DP, Durelln S, Maloyll WL, y Zaslo M (1994). Ranalexin A novel antimicrobial peptide from bullfrog (*Ma catesbezaixa*) skin, structurally related to the bacterial antibiotic, polymyxin. *J Biol Chem.* **269**:14, 10849-10855.

Cortina C y Culáñez-Maciá FA (2003) Tomato transformation and transgenic plant production. *Plant Cell Tissue and Organ Cult.* **1**:7, 1-7.

Daniel H, Ruiz ON, Dhingra A (2005). Chloroplast genetic engineering to improve agronomic traits. *Methods Mol Biol Transgenic Plants.* **286**:111-38.

Daniell H, Khan MS, y Allison L (2002). Milestones in chloroplast genetic engineering: An environmentally friendly era in biotechnology. *Trends Plant Sci.* **7**: 84-91.

Daniell H, Vivekananda J, Nielsen BL, Ye GN, Tewari KK, y Sanford JC (1990). Transient foreign gene expression in chloroplasts of cultured tobacco cells after biolistic delivery of chloroplast vectors. *Proc Natl Acad Sci USA.* **87**:88–92

DeGray 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 Physiol.* **127**:852–862.

De la Riva G, Gonzales-Cabrera J, Vázquez-Padrón, y Ayra-Pardo C (1998). *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. *Elect J Biotech.* **1**:1-16.

Destoumieuxa D, Munoz M, Bulet P y Bacherea E (2000). Penaeidins, a family of antimicrobial peptides from penaeid shrimp (Crustacea, Decapoda). *Cell Mol Life Sci.* **57**:1260–1271.

Dufourmantel N, Pelissier B, Garcon F, Peltier G, Ferullo JM, y Tissot G (2004). Generation of fertile transplastomic soybean. *Plant Mol Biol.* **55**:479-489.

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.

Ferber D (2003). Antibiotic resistance: WHO advises kicking the livestock antibiotic habit. *Science* **301**:1027.

Fernández-San Millán A, Mingo-Castel A, Millar M, y Daniell H (2003). A chloroplast transgenic approach to hyper-express and purify Human Serum



Albumin, a protein highly susceptible to proteolytic degradation. *Plant Biotech J.* **1**:71–79

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 PA, Lehrer RI, y Spinoal SM (1998). *Haemophilus ducreyi* is susceptible to protegrin. *Antimic Agents Chemoth.* **42**:10, 2690–2693.

Francois IEJA, De Bolle MFC, Dwyer G, Goderis IJWM, Woutors PFJ, Verhaert PD, Proost P, Schaaper WMM, Cammue BPA, y Broekaert WF (2002). Transgenic expression in *Arabidopsis* of a polyprotein construct leading to production of two different antimicrobial proteins. *Plant Physiol.* **128**:1346–1358.

Gao AG, Hakimi SM, Mittanck CA, Wu Y, Woerner BM, Stark DM, Shah PM, Liang J, y Rommens CMT (2000). Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. *Nat Biotechnol.* **18**:1307-1310.

Ganz T, y Lehrer RI (1999). Antibiotic peptides from higher eukaryotes: biology and applications. *Mol Med Today.* **5**:292-297.

Ganz T, y Lehrer RI (1998). Antimicrobial peptides of vertebrates. *Curr Opin Immunol.* **10**:41–44.

Gazit E, Lee WJ, Brey PT, y Shai Y (1994). Mode of action of the antibacterial cecropin B2: a spectrofluorometric study. *Biochemistry.* **33**:35, 10681–10692.

Gelvin SB (2000). *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **51**:223-256.

Gelvin SB (2005) Agricultural biotechnology: Gene exchange by design. *Nature.* **433**:593-594.

Giddings G (2001). Transgenic plants as protein factories. *Curr Opin Biotechnol.* **12**: 450-454.

Golds TJ, Eibl Ch, y Koop HU (2004). Green Factory: Recombinant Production in Chloroplasts. *BIOforum Europe 04/2004*, 32–34.

Golds T, Maliga P, y Koop HU (1993). Stable plastid transformation in PEG treated protoplasts of *Nicotiana tabacum*. *Biotechnology.* **11**:95–97.



Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM (1998) *Genética*, Quinta Edición, Editorial Mc Graw-Hill Interamericana, México, pp 550-556.

Hancock REW, y Chapple DS (1999). Minireview Peptide Antibiotics. *Antimicrob Agents Ch.* **43**:1317–1323.

Hancock REW, y Lehrer R (1998). Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Tibtech.* **16**:82-87.

Heifetz PB (2000). Genetic engineering of the chloroplast. *Biochimie.* **82**: 655-666.

Hellens R, y Mullineaux P (2000). A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends Plant Sci.* **5**:446-451.

Hennegan K, y Kathleen JD (1998). pBIN20: an improved binary vector for *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Mol Biol Report.* **16**: 129–131.

Herrera-Estrella L, Depicker A, Van Montagu M, y Schell J (1983). Expression of chimeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid derived vector. *Nature.* **303**:209-211.

Hibberd JM, Linley PJ, Khan MS, y Gray JC (1998). Transient expression of green fluorescent protein in various plastid types following microprojectile bombardment. *Plant J.* **16**:627–632.

INFOAGRO: www.infoagro.com.mx

Izadpanah A, y Gallo RL (2005). Antimicrobial peptides. *J Am Acad Dermatol.* **52**:381-391.

Jaynes JM, Nagpala P, Destéfano-Beltrán L, Huang JH, Kim JH, 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.

Jefferson RA, Kavanagh TA y Bevan MW (1987). "GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusions marker in higher plants". *EMBO J.* **6**:1,3 901-3907.

Jeong SW · W.-J. Jeong · J.-W. Woo · D.-W. Choi · Y. I. Park, y · J. R. Liu (2004). Dicistronic expression of the green fluorescent protein and antibiotic resistance genes in the plastid for selection and tracking of plastid-transformed cells in tobacco. *Plant Cell Rep.* **22**:747–751.



Kamysz W, Krolicka A, Bogucka K, Ossowski T, Lukasiak J, y Lojkowska E (2005). Antibacterial activity of synthetic peptides against plant pathogenic *Pectobacterium* species. *J Phytopath.* **153**:313–317.

Khan MS, y Maliga P (1999). Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plants. *Nat Biotechnol.* **17**:910–915.

Kokryakov VN, Harwig SSL, Panyutich EA, Shevchenko AA, Aleshinab GM, Shamovab OV, Kornevab HA, y Lehrer RI (1993). Protegrins: leukocyte antimicrobial peptides that combine features of corticostatic defensins and tachyplesins. *FEBS Lett.* **327**:231-236.

Kota M, Daniell H, Varma S, Stephen F, Garczynski SF, Gould F, y Moar WJ. Overexpression of the *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry2Aa2 protein in chloroplasts confers resistance to plants against susceptible and Bt-resistant insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**:1840–1845.

Kougias P, Chai H, Lin PH, Yao Q, Lumsden AB, y Chen Ch (2005). Defensins and cathelicidins: Neutrophil peptides with roles in inflammation, hyperlipidemia and atherosclerosis. *J Cell Mol Med.* **9**:3-10.

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 (2001). Complementarity of the 16S rRNA penultimate stem with sequences downstream of the AUG destabilizes the plastid mRNAs. *Nucleic Acids Res.* **29**:970-975.

Lay FT, Brugliera F, y Anderson MA (2003). Isolation and properties of floral defensins from ornamental tobacco and petunia. *Plant Physiology.* **131**:1283–1293.

Lee SB, Kwon HB, Kwon SJ, Park SCh, Jeong MJ, Han SE, Byun MO, y Daniell H (2003). Accumulation of trehalose within transgenic chloroplasts confers drought tolerance. *Mol Breed.* **11**:1–13.

Leeb M (2004). A shot in the arm. *Nature.* **431**: 892-893.



- Lehrer RI (2004). Reviews Primate defensins. *Nature Rev Microb.* **2**:1-12.
- Lelivelt CLC, McCabe MS, Newell ChA, Bastiaan de Snoo C, van Dun KMP, Birch-Machin I, Gray JC, Mills KHG, y Nugent JM (2005). Stable plastid transformation in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Plant Mol Biol.* **58**:763–774.
- Li X, Gasic K, Cammue B, Broekaert W, y Korban SS (2003). Transgenic rose lines harboring an antimicrobial protein gene, Ace-AMP1, demonstrate enhanced resistance to powdery mildew (*Sphaerotheca pannosa*). *Planta.* **218**: 226–232.
- Lössl A, Eibl C, Harloff HJ, Jung C, y Koop HU (2003). Polyester synthesis in transplastomic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.): significant contents of polyhydroxybutyrate are associated with growth reduction. *Plant Cell Rep* **21**:891–899.
- Lundberg P, y Langel Ü (2000). A brief introduction to cell-penetrating peptides. *J Mol Recognit.* **16**:227–233.
- Magee AM, Horvath EM, y Kavanagh TA (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**:164-72.
- Maliga P (2003). Progress towards commercialization of plastid transformation technology. *Trends Biotech.* **21**:20-28.
- Maliga P (2004). Plastid transformation of higher plants. (2004). *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**:289–313.
- Mangoni ME, 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
- McGwire BS, Olson ChL, Tack BF, y Engman BM (2003). Killing of african trypanosomes by antimicrobial peptides. *J Infect Diseases.* **188**:146–52.
- Miyakawa Y, Ratnakar P, Rao AG, Costello ML, Mathieu-Costello O, y Lehrer RI, (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.

Molina A, Hervás-Stubbs S, Daniell H, Mingo-Castell AM, y Veramendi J (2004). High-yield expression of a viral peptide animal vaccine in transgenic tobacco chloroplasts. *Plant Biotechnology Journal* **2**: 141–153.

Mosca DA, Hurst MA, So W, Viajar VSC, Fujii CA, y Falla TJ (2000). IB-367, a protegrin peptide with in vitro and in vivo activities against the microflora associated with oral mucositis. *Antimic Agent and Chemoth.* **44**:7, 1803–1808.

Nizet V, y Gallo RI (2003). Cathelicidins and innate defense against invasive bacterial infection. *Scand J Infect Dis.* **35**:670-676.

O'Neill C, Horvath GV, Horvath E, Dix PJ, y Medgyesy P (1993). Chloroplast transformation in plants: polyethylene glycol (PEG) treatment of protoplasts is an alternative to biolistic delivery systems. *Plant J.* **3**:729–38.

Ortiz R (1998). Critical role of plant biotechnology for the genetic improvement of food crops: perspectives for the next millennium. *Elect J of Biotech.* **1**:3, 1-8.

Osusky M, Zhou G, Osuska L, Hancock RE, Kay WW, y Misra S (2000). Transgenic plants expressing cationic peptide chimeras exhibit broad-spectrum resistance to phytopathogens. *Nature Biotechnology.* **18**: 1162-1166.

Penna TCV y Ishii M (2002). Selective permeation and organic extraction of recombinant green fluorescent protein (gfp_{uv}) from *Escherichia coli*. *BMC Biotech.* **2**:7, 1-11.

Pierik RLM (1990). Cultivo *in vitro* de plantas superiores. Ed. Mundi-Prensa.

Pileggi M, Mielniczki AA, Silva JS, Veiga SA, y Verma DP (2001). An improved method for transformation of Lettuce by *Agrobacterium tumefaciens* with a gene that confers freezing resistance. *Braz Arch Biol Tech.* **44**: 191-196.

Ponti D, Mangoni ML, 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.

Pouny Y, Rapaport D, Mor A, Nicolas P, y Shai Y (1992). Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry.* **31**:49, 12416–12423.

Qu XD, Harwing SSA, Shafer WM, y Lehrer RI (1997). Protegrin Structure and



- Activity against *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect and Immunol.* **65**:2, 636–639.
- Ra R, Beerthuyzen MM, de Vos WM, Saris PEJ, y Kuipers OP (1999). Effects of gene disruptions in the nisin gene cluster of *Lactococcus lactis* on nisin production and producer immunity. *Microbiology.* **145**:1227–1233.
- Rappuoli R (2004). From Pasteur to genomics: progress and challenges in infectious diseases. *Nature medicine.* **10**:11, 1177–1185.
- Robey, EA (2005). Guide for a cell-fate decision. *Nature.* **433**:813-814.
- 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.
- Ruiz ON, Hussein HS, Terry N, y Daniell H (2003). Phytoremediation of Organomercurial Compounds via Chloroplast Genetic Engineering. *Plant Physiol.* **132**:1344–1352.
- 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 EF y Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed New York: Cold Spring Harbor Laboratory. (1989).
- Saugar JM, Alarcón T, López-Hernández S, López-Brea M, Andreu D, y Rivas L (2002). Activities of polymyxin B and cecropin A-melittin peptide CA(1-8)M(1-18) against a multiresistant strain of *Acinetobacter baumannii*. *Antim Agents Chemoth.* **46**: 875–878.
- Selsted ME, y Ouellete AJ (2005). Mammalian defensins in the antimicrobial immune respons. *Nature Immun.* **6**:551-556.
- Shafer WM, Qus XD. Waring AJ, y Lehrer RI (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.
- Shea KM (2003). Antibiotic resistance: What is the impact of agricultural uses of antibiotics on children's health?. *Pediatrics.* **112**:253-258.



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 AE, Butler KL, y Park HJ (2003). Minireview. Cathelicidin family of antimicrobial peptides: proteolytic processing and protease resistance. *Bioorg Chemist.* **31**:425-436.

Sidorov VA, Kasten D, Pang SZ, Hajdukiewicz PT, Staub JM, y Nehra N (1999). Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker. *Plant J.* **19**:209–216.

Sikdar SR, 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 HU (1991). PEG-mediated plastid transformation: A new system for transient gene expression assays in chloroplasts. *Theor Appl Genet.* **82**:717–722.

Staub JM, Garcia B, Graves J, Hajdukiewicz PTJ, Hunter P, Nehra N, Paradkar V, Schlittler M, Carroll JA, Spatola L, Ward D, Ye G y Russell DA (2000). High-yield production of human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nature Biotech.* **18**:333-337.

Steinberg DA, Hurst MA, Fuji CA, Kung AHC, Ho JF, Cheng FC, Loury DJ, y Fiddes JC (1997). Protegrin-1: a broad-spectrum, rapidly microbicidal peptide with in vivo activity. *Antimic Agents Chemoth.* **41**: 1738–1742.

Steinstraesser L, Tippler B, Mertens J, Lamme E, Homann HH, Lehnhardt M, Wildner O, Steinau HU, y Überla K (2005). Inhibition of early steps in the lentiviral replication cycle by cathelicidin host defense peptides. *Retrovirology.* **2**:1-12.

Sugita M, y Sugiura M (1996). Regulation of genes expression in chloroplast of higher plants. *Plant Mol Biol.* **32**: 315–326.

Sugiura M (2003). History of chloroplast genomics. *Minireview Photosynth Res.* **76**: 371–377.

Svab Z, Hajdukiewicz P, y Maliga P (1990). Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA.* **87**: 8526-8530



- Tam JP, Wu Ch, y Yang JL (2000). Membranolytic selectivity of cysteine-stabilized cyclic protegrins. *Eur J Biochem.* **267**: 3289 - 3300
- 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 JS, Nixon P, Kuroda H, Svab Z, Clare S, Bowe F, Fairweather N, Ytterberg J, van Wijk KJ, Dougan G, y Maliga P (2003). Expression of tetanus toxin Fragment C in tobacco chloroplasts. *Nucleic Acids Res.* **31**: 41174-1179.
- Trigiano RN y Gray DJ, “Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises”, CRC Press, 2ª Edición, (2000).
- Turner J, Cho Y, Dinh NN, Waring AJ y Lehrer RI (1998). Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. *Antim Agents Chemoth.* **42**: 2206-2214.
- Turnidge J (2004). Antibiotic use in animals—prejudices, perceptions and realities. *J Antimicrob Chemother.* **53**: 26–27.
- Watson J, Koya V, Leppla SH, y Daniell H (2004). Expression of *Bacillus anthracis* protective antigen in transgenic chloroplasts of tobacco, a non-food/feed crop. *Vaccine.* **22**: 4374–4384.
- Wasserman SA (2004). Nature’s fortress against infection. *Nat Immunol.* **5**:474-475.
- Wu H, Zhang G, Ross CR, y Blecha F (1999) Cathelicidin gene expression in porcine tissues: Roles in ontogeny and tissue specificity. *Infect Immun.* **67**: 439–442.
- Yasin B, Lehrer RI, Harwing SSL, y Wagari EA (1996). Protegrins: structural requirements for inactivating elementary bodies of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun.* **64**: 4863–4866.
- Yoon Cho, Turner JS, Nhu-Nguyen D, y Lehrer RI (1998). Activity of protegrins against yeast-phase *Candida albicans*. *Infect Immun.* **66**: 2486–2493.
- Zanetti 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.* **374**:1–5



Zasloff M (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. **415**:389–395.

Zhang XH, Portis AR, y Widholm JM (2001). Plastid Transformation of soybean suspension cultures. *J Plant Biotech*. **3**: 39-44.

Zhao Ch, Ganz T, y Lehrer RI (1995). The structure of porcine protegrin genes. *FEBS Lett*. **368**:197 202.

Zou Z, Eibl C, y Koop HU (2003). The stem-loop region of the tobacco *psbA* 5'UTR is an important determinant of mRNA stability and translation efficiency. *Mol Genet Genomics*. **269**: 340–349.

Zou Z (2001). Analysis of *cis*-acting expression determinants of the tobacco *psbA* 5'UTR *in vivo*. Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München Prof. Dr. Hans-Ulrich Koop, PD Dr. Rainer Maier.

WHO : <http://www.who.int/infectious-disease-report/2000/>

**APÉNDICE****11.1. 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, se agregan 4.3g para preparar un litro de medio



11.2. Vitaminas para plantas

11.2.1. 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 -20 °C.

11.2.2. 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.

11.2.3. 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.

**11.2.4. Vitaminas Nitch & Nitch 1965 (Para *Lycopersicum. esculentum*)**

Compuesto	Concentración (mg/l)	Concentración del Stock 1000 X (mg/ml)
Mioinositol	100	100
Tiamina	0.5	0.5
Ac. Nicotínico	5	5.0
Piridoxina	0.5	0.5
Biotina	0.005	0.005
Ac. Fólico	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, mantener en oscuridad.

11.2.5. Vitaminas para Cocktel 20 (*Daucus carota*)

Compuesto	Concentración (mg/l)	Concentración del Stock 100 X (mg/ml)
L-asparagina	10.0	1
L-arginina	10.0	1
L-ác. aspártico	7.5	0.75
Glicina	23.0	2.3
Glutamina	60.0	6.0
Ác. glutámico*	7.5	0.75
Biotina (Vit. B ₈)*	1.0	0.1
Ác. fólico (Vit. B ₉)*	1.0	0.1
Ac. Nicotínico (Vit. B ₃)	1.5	0.15
Piridoxina (Vit. B ₆)	1.5	0.15
Riboflavina (Vit. B ₂)	0.1	0.01
Tiamina (Vit. B ₁)	3.0	0.3
Myo-inositol	145.0	14.5
Urea	45	4.5

Para preparar 1 litro de medio se toman 10 ml de cóctel. *Disolver con 3 gotas de NaOH 1N

11.3 Medios de cultivo para sistemas vegetales de tomate, lechuga y zanahoria

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 utilizada

**11.3.1. Medios de cultivo para lechuga (*Lactuca sativa*)**

Componentes	MS	MSO	MS104	UM
Sales MS 2X	500ml/l	500ml/l	500ml/l	500ml/l
Vitaminas (1000X)	MS- 1ml	B5-1ml	B5-1ml	MS-1ml
BA	-	-	0.5mg/l	-
ANA	-	-	0.02m/l	-
Cinetina	-	-	-	0.25mg/l
2,4-D	-	-	-	2mg/l
Caseína	-	-	-	2g/l
Sacarosa (g/l)	30	30	30	30
pH	5.7	5.7	5.7	5.7
Agar (g/l)	7	7	7	7

11.3.2. 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

11.3.3. Medios de cultivo para tomate (*Lycopersicum esculentum*)

Componentes	TCM	MSO	M-2Z	M-1Z
Sales MS 2X	500ml	500ml	500ml	500ml
Vitaminas (1000X)	MS- 1ml	B5-1ml	N&N-1ml*	N&N-1ml*
BA	1mg/l-	--	--	--
ANA	0.1mg/l	--	--	--
Zeatina	--	--	2(mg/l)	1(mg/l)
Sacarosa (g/L)	30	30	30	30
pH	5.7	5.7	5.7	5.7
Agar (g/L)	7	7	7	7

*Nitsch and Nitsch (1965)

**11.3.4. Medios de cultivo para zanahoria (*Daucus carota*)**

Componentes	MYTm	MSO	MYT	MYT^{1/2}
Sales MS 2X	500ml	500ml	500ml	500ml
Vitaminas 1000X	-	B5-1ml	-	-
Cócktel 20(100X)	10ml	-	10ml -	10ml
Adenina	10mg/l		10mg/l	10mg/l
Ác. ascórbico	15mg/l		15mg/l	15mg/l
2-4 D	--	-	1mg/l	0.5mg/l
BA	(1mg/l)		0.3mg/l	0.15mg/l
ANA	(1mg/l)	-	-	
Agar (g/L)	7	7	7	7

11.4 Buffer de reacción para GUS

Componente	Concentración
Fosfato monobásico de sodio	12.0 g/l
Fosfato dibásico de sodio	14.2 g/l
EDTA	10.0 mM
Ferrocianuro de potasio	0.5 mM
Ferricianuro de potasio	0.5 mM
Tritón	0.1%
X-gluc (ácido 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucurónico)	2.0 mM