

00528
63



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"BOMBARDEO DE CALLOS EMBRIOGENICOS DE
ZANAHORIA (*Daucus carota* L.) Y SU
REGENERACION CON LA PROTEINA "G" DEL
VIRUS DE LA RABIA"

T E S I S
M A N C O M U N A D A
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A N :
GABRIELA MERE VILLANUEVA
VIOLETA VAZQUEZ ALEJANDRO



MEXICO, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2003

A



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Elpidio García Ramírez
Vocal	Prof. Ma. Teresa Olivera Flores
Secretario	Prof. Francisco Ruiz Terán
1er. Suplente	Prof. Alberto Gómez Gutiérrez
2º. Suplente	Prof. Perla Deyanira Maldonado Jiménez

Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorio 116, Cultivo de Tejidos Vegetales,
Depto. de Bioquímica, Conjunto "E". Facultad de
Química.

Nombre completo y firma del asesor
del tema:



Ma. Teresa Olivera Flores

Nombre completo y firma del
supervisor técnico:



Octavio Guerrero Andrade

Nombre completo y firma de los
sustentantes:



Gabriela Meré Villanueva



Violeta Vázquez Alejandro

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

DEDICATORIAS VIOLETA

A mi mamá por enseñarme a luchar con amor e impulsarme para lograr todas mis metas y alcanzar mis sueños, pero sobre todo por ser el principal ejemplo de lucha y esfuerzo para mí, por enseñarme a librar los obstáculos de la vida y a aprender de ellos.

A mi hermana por compartir su vida conmigo con alegría, por ayudarme siempre y por ver la vida de otra forma, por estar siempre para mí cuando lo necesito, por que no hubiera querido compartir la vida sin ti.

A mi papá por su paciencia, su nobleza, su amor, por soñar conmigo y por enseñarme ante todo a ver la vida con alegría y darme siempre a los demás.

A mis abuelos José María y Elisa, que han sido como unos padres para mí, por su amor, por sus consentimientos, por que siempre procuraron darme cuanto pudieron y por que gracias a ustedes he logrado gran parte de lo que soy. Por la bendición de tenerlos junto a mí.

A mis abuelos Rosaura y Javier por estar siempre al pendiente de mí, por que han compartido conmigo su experiencia de vida, por su apoyo incondicional y su enorme amor y sus consejos.

A mi abuelo Héctor Manuel por todo su apoyo y su cariño a lo largo de tantos años. GRACIAS. A Marie, Ramón, Carmelita, Mónica y Mike por los momentos compartidos.

A Willy y mi Mamá Tía por ser otros padres para mí, sin los cuales no hubiera podido llegar hasta aquí, por su infinito amor y comprensión, a mis tres hermanitos por quererme como un integrante más de su familia.

A toda mi familia, primos, tíos, por las experiencias vividas con todos y por ser un ejemplo para mí, por la diversión y por compartir. Gracias a TODOS simplemente por ser parte de mi vida y por su amor.

A ti José Luis por todo tu apoyo, confianza y comprensión, por abrimme tu corazón, y por soñar conmigo. Por que eres ya una parte de mí. Gracias a la Familia Castañeda.

A todos mis amigos 97 y 98, por la fortuna de conocerlos y por dejar una huella en mí, a aquellos que me brindaron su amistad incondicional, sincera y transparente, por todos los momentos difíciles y afortunados. Gracias Taniguchi's, Güera, Abel, Pita, Miguelito, Reynaldo, Nadia, Toño, Fanny, Karyn, Emilio, Carlos... Gracias Miguel, Ernesto Caarlos, Boyo, Adriana, Desisy, Minerva, Isaac, Luis, Chío, Bere por adoptarme y por su amistad... A mis amigas Cris, Gaby, Blanca, Mary y Fabiola.

A todos los que me enseñaron y dejaron algo en mí, a los creen en mí...

C

DEDICATORIAS

Gaby

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, porque en ti aprendí a luchar y a sacrificar todo por uno de mis sueños.

A mi **mamita querida**, eres el más grande ejemplo que he tenido; tu manera de darte a tus hijas, tu lucha constante han sido motores en mi vida para salir adelante, porque a pesar de las malas experiencias vividas, me has enseñado a tener valor sin importar cuan difícil sean las circunstancias. Te quiero mucho.

A mi **Abuelita**, tu ejemplo de vida me motiva a hacer cualquier cosa. Te adoro.

A **Adriana**, por ser la mejor hermana del mundo y porque aún nos falta mucho por recorrer. ¡Mil Gracias!. No tengo que decir nada tu sabes lo que significas para mí.

A **Andrés, Víctor y José**, por ser un ejemplo para mí de tenacidad y compromiso así como brindarme todo su amor y cariño. Los quiero mucho.

A mi tío **Chuchito** por que fuiste un gran apoyo y un padre para mí. A mi preciosa tía por estar en los momentos que la he necesitado.

A mis dos grandes amores (**Sebastián y Patricio**) por enseñarme lo maravillosa que puede ser la vida.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia

Porque gracias a su cariño, guía y apoyo he llegado a realizar uno de los anhelos más grandes de mi vida, fruto de inmenso apoyo, amor y confianza que en mí se depositó.

A ti Señor

Porque estoy viva y porque a pesar de todo y de todos, día a día amanece junto a mí.

A todos mis amigos y amigas

Porque de alguna u otra forma todos ustedes son parte de lo que he vivido y de lo que soy. Siempre los llevé y los llevaré en mi corazón. ¡Mil Gracias!. Los quiero mucho

A la M en C. María Teresa Olivera Flores y al M en C. Octavio Guerrero Andrade

Por su dedicación, por su disposición a compartir conmigo todos sus conocimientos, gracias por su infinita paciencia, por su empeño en la revisión de este trabajo y por todas sus enseñanzas, pero sobre todo gracias por su amistad.

Al Dr. Gómez-Lim y a todo su equipo del Laboratorio de Salud Humana y Plantas Tropicales del CINVESTAV

Por que estuvieron siempre dispuestos a compartir sus conocimientos y por que sin su apoyo no hubiera sido posible este trabajo.

A todos los integrantes del laboratorio 116 Cultivo de Tejidos Vegetales

Compañeros tesis y trabajadores por haber hecho más agradable mi estancia en el laboratorio y por brindarme el apoyo durante la realización de este trabajo.

A Conacyt por el apoyo financiero otorgado al proyecto 34635-B "Expresión de la proteína G del virus de la rabia en plantas transgénicas de maíz, y su evaluación como inmunógeno oral en bovinos"

Al H. Jurado, Prof. Elpidio García Ramírez, Prof. Francisco Ruiz Terán

Por su cooperación y sugerencias en la revisión de la tesis

AGRADECIMIENTOS

Gracias a DIOS por acompañarme y guiarme en todo momento, por darme la oportunidad de vivir, aprender y disfrutar de la vida día a día. Por la compañía de los seres que amo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por toda la formación que recibí durante mi carrera y por contribuir de gran manera a mi desarrollo personal, por ser mi mejor casa de estudios.

Al laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales por estos años de aprendizaje y por cobijarme. Gracias Fannie.

Muchas gracias Mayte por todo el apoyo que me brindaste, por compartir tu enorme experiencia conmigo, por contribuir de manera importante a mi desarrollo profesional en todos aspectos, por tu paciencia y disposición, pero sobretodo por tu amistad.

Gracias Gaby, por que a pesar de los obstáculos hemos aprendido juntas, por tu amistad y tu apoyo. Por terminar este ciclo conmigo.

Gracias al Dr. Gómez-Lím y a todo su equipo del Laboratorio de Salud Humana y Plantas Tropicales del CINVESTAV, por que estuvieron siempre dispuestos a compartir sus conocimientos y por que sin su apoyo no hubiera sido posible este trabajo.

De manera especial a Tavo por tener siempre paciencia para compartir su experiencia conmigo, por toda su ayuda y su sencillez.

Al CONACYT por su apoyo en el programa "Expresión de la proteína "G" del virus de la Rabia en plantas transgénicas de maíz, y su evaluación como inmunógeno oral en bovinos" No. 34635-B.

A todos los investigadores, estudiantes y personal del conjunto "E" de Química por el apoyo que en algún momento me brindaron.

Gracias a mis sinodales por su apoyo y su guía.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE

ABREVIATURAS	3
RESUMEN	6
1 JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO	9
1.1 OBJETIVO GENERAL	10
2 REVISIÓN DE LITERATURA GENERAL	11
2.1 Generalidades de zanahoria (<i>Daucus carota L.</i>)	11
2.2 Clasificación taxonómica y descripción de la planta	11
2.3 Características del cultivo	14
2.4 Importancia económica y distribución geográfica	16
2.5 Valor Nutricional	16
3 CAPITULO I EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN ZANAHORIA COMO MODELO BIOLÓGICO	18
3.1 INTRODUCCIÓN	18
3.1.1 OBJETIVO GENERAL	20
3.1.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4. REVISIÓN DE LITERATURA	20
4.1.1 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA BAJO CONDICIONES <i>in vitro</i>	20
4.1.2 Embriogénesis somática	21
4.1.3 Factores que influyen en la embriogénesis somática	23
4.1.3.1 Medios de cultivo	23
4.1.3.2 Luz	24
4.1.3.3 Temperatura	25
4.1.3.4 Material biológico utilizado	25
4.1.4 Embriogénesis somática en zanahoria	26
4.2 HIPÓTESIS	28
4.3 MATERIALES Y MÉTODOS	29
4.3.1 Aspectos Generales	29
4.3.1.1 Material biológico	29
4.3.1.2 Preparación de medios de cultivo	29
4.3.1.3 Condiciones de incubación	30
4.3.2 Método de esterilización de semillas	30
4.3.3 Establecimiento del cultivo de callos embriogénicos	31
4.3.4 Selección de explantes y medio de cultivo	32
4.3.5 Proliferación y germinación de callos embriogénicos	32
4.3.6 Obtención de plántulas	32
4.3.7 Cinéticas de crecimiento	33
4.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
4.4.1 Métodos de Esterilización de semillas	34
4.4.2 Selección de Explantes y Medio de cultivo	36
4.4.3 Proliferación y germinación de callos embriogénicos	40
4.4.4 Regeneración	43
4.4.5 Cinéticas de crecimiento	45
4.5 CONCLUSIONES	48
4.6 Bibliografía	50
5 CAPITULO II TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE ZANAHORIA POR MEDIO DE BIOBALÍSTICA	54

5.1 INTRODUCCIÓN.....	54
5.1.1 Objetivo General.....	57
5.1.1.1 Objetivos específicos.....	57
5.2 REVISIÓN DE LITERATURA.....	57
5.2.1 BOMBARDEO CON MICROPARTÍCULAS.....	58
5.2.2 <i>Parámetros involucrados en la transferencia genética</i>	60
5.2.2.1 Construcción del vector.....	60
5.2.2.2 Genes Reporteros.....	60
5.2.2.3 Promotores.....	61
5.2.2.4 Marcadores selectivos.....	61
5.2.3 Parámetros que afectan la introducción del DNA en el bombardeo.....	62
5.2.4 Vacunas comestibles.....	62
5.2.5 Enfermedad del virus de la Rabia.....	66
5.2.6 Virus de la Rabia.....	67
5.2.7 Composición molecular y clasificación.....	68
5.2.7 Epidemiología y patogenia.....	71
5.2.8 Diagnóstico.....	72
5.2.9 Prevención.....	74
5.2.10 Tratamiento.....	75
5.2.11 Vacunación contra la rabia.....	75
5.2.12 Rabia Paralítica Bovina en México.....	78
5.3 HIPÓTESIS.....	80
5.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	81
5.4.1 Materiales biológicos.....	81
5.4.2 Curva de tolerancia de callos embriogénicos de zanahoria al antibiótico kanamicina.....	81
5.4.3 Construcción del plásmido.....	82
5.4.4 Bombardeo con micropartículas de tungsteno con pistola de baja presión (Bond <i>et al.</i> , 1992).....	91
5.4.5 Expresión transitoria.....	93
5.4.6 Proliferación y germinación de callos embriogénicos transformados.....	94
5.4.7 Obtención de plántulas.....	94
5.4.8 Expresión permanente.....	94
5.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	96
5.5.1 Curva de tolerancia de callos embriogénicos al antibiótico kanamicina	96
5.5.2 Construcción y purificación del DNA plasmídico.....	98
5.5.3 BOMBARDEO.....	100
5.5.4 EXPRESIÓN TRANSITORIA.....	101
5.5.5 Proliferación y regeneración de callos embriogénicos transformados en medio selectivo.....	102
5.5.6 REGENERACIÓN DE PLANTAS TRANSFORMADAS.....	104
5.5.7 EXPRESIÓN PERMANENTE.....	107
5.6 CONCLUSIONES.....	110
5.7 BIBLIOGRAFÍA.....	111
ANEXOS.....	117

ABREVIATURAS

- Concentración

μ M: micromolar

mM: milimolar

M: Molar

N: Normal

- Corriente

μ F: microfaradios

k Ω : kiloamperes

- Longitud

μ m: micrómetros

nm: nanómetros

mm: milímetros

cm: centímetros

- Medios de Cultivo

MS: Medio nutritivo creado por Murashige & Skoog (1962).

Z-1: Medio nutritivo modificado por Olivera Flores (1996)

Myt: Medio nutritivo modificado por Olivera Flores (1996)

- Otros

β -gluc: Enzima β -glucoronidasa responsable de la hidrólisis del enlace entre los grupos indolil y glucorónico del sustrato X-gluc, que producirá la oxidación de los grupos indoxil para la posterior formación del precipitado azul característico.

°C: grados Celsius

CaMV-35s: secuencia promotora de la transcripción del Virus del Mosaico de la Coliflor.

DNA: Ácido desoxirribonucleico

D.O.:Densidad óptica

dH₂O: Agua desionizada

Gus: gen bacteriano que codifica para la enzima β-gus.

hr: horas

in Hg: pulgadas de mercurio

μE: Micro Eistein

NptII: gen bacteriano que codifica para la enzima neomicina fosfotransferasa.

pBI-121:plásmido que contiene al gen marcador *nptII* que confiere resistencia a la kanamicina y al gen reportero *gus*.

pBI-121/pWR-21: plásmido que contiene al gen que codifica para la glicoproteína "G" del virus de la rabia, al gen reportero *gus* y al gen marcador *nptIII* que confiere resistencia a la kanamicina.

PEG: polietilenglicol

pH: potencial de hidrógeno

psi: unidades de presión en el sistema inglés de medidas, 14.7 psi o lb.plg² equivalen a 1 atmósfera.

pUC-pSS/pWR-21: plásmido que contiene al gen que codifica para la glicoproteína "G" del virus de la rabia.

RNA: Ácido ribonucleico

RNA_m: Ácido ribonucleico mensajero.

SDS: Lauril sulfato de sodio

TE: Solución amortiguadora de Tris-EDTA

TENS: Solución de Tris, EDTA, NaOH y SDS

X-gluc: 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil- β-D-ácido glucorónico.

- **Peso**

μg: microgramos

mg: miligramos

g: gramos

- **Peso molecular**

kDa: kilodaltones equivalente a 1×10^3 Daltones.

Kb: kilobases

- **Reguladores de crecimiento**

2,4-D: Ácido 2, 4- Diclorofenoxiacético

MCPP: Ácido 2-metil-4-clorofenoxipropiónico

BAP: benzilaminopurina

- **Velocidad**

rpm: revoluciones por minuto

- **Volumen**

μl: microlitros

ml: mililitros

L: litros

RESUMEN

El trabajo que a continuación se presenta se dividió en dos etapas. Durante la primer etapa se establecieron y caracterizaron los cultivos de callos embriogénicos de zanahoria (*Daucus carota L.*) utilizando para ello cuatro diferentes explantes (tallo, peciolo, hojas verdaderas y hojas cotiledonarias) procedentes de plántulas de una variedad comercial; en primer lugar se estableció el método de esterilización y los explantes se sembraron en dos medios de cultivo distintos en cuanto a la cantidad y tipo de reguladores de crecimiento para inducir la formación de callo embriogénico. Posteriormente en base a la presencia de callo embriogénico, se seleccionaron los explantes que proporcionaron el mayor rendimiento en la inducción de éste, resultando ser tallo y peciolo los mejores explantes, siendo el medio de cultivo Myt el óptimo para su inducción y proliferación. Para la germinación de los embriones se utilizó medio MS con la presencia y ausencia de reguladores de crecimiento, obteniéndose un mayor porcentaje de germinación de los embriones en medio MS sin hormonas. Una vez que las plántulas alcanzaron la talla de 10 cm de longitud, fueron transferidas a tierra y mantenidas en condiciones de invernadero, logrando así la regeneración de plantas completas de zanahoria por medio de la embriogénesis somática. La segunda etapa tuvo su inicio con la evaluación de las cinéticas de crecimiento de callo embriogénico a través de curvas de peso fresco y seco de cada uno de los explantes seleccionados (tallo y peciolo), mostrando en éstas que el crecimiento exponencial de los callos embriogénicos se presentó entre los días 9 y 11 después del subcultivo, considerándose éste el período óptimo para la transformación genética a partir

de la técnica de biobalística. Simultáneamente se realizó una curva de tolerancia al antibiótico kanamicina para determinar la concentración mínima que permite la selección de callos embriogénicos transformados de aquellos que no lo están, resultando ser 50 mg L^{-1} la concentración recomendada. Una vez establecidos los parámetros anteriores para llevar a cabo la transformación, se realizó la construcción del plásmido pBI-121/pWR-21, que contiene al gen que codifica para la glicoproteína "G" del virus de la rabia, al gen reportero *gus* y al gen marcador *nptII* que confiere resistencia a la kanamicina. Posteriormente, se realizó el bombardeo de 70 cajas petri con 0.5 g de callo embriogénico cada uno con el plásmido antes mencionado así como el co-bombardeo con los plásmidos pUC-pSS/pWR21 y pBI-121, el cual se llevó a cabo en 30 cajas petri con 0.5 g de callo cada uno. Transcurridas 72 horas después del bombardeo, fueron elegidos al azar un frasco con callo de cada tipo de explante y tipo de bombardeo, con los cuales se realizó la prueba de expresión transitoria de *gus* con la finalidad de verificar la integración del DNA plasmídico. Esta prueba resultó positiva observándose la coloración azul característica de la reacción entre la enzima β -glucuronidasa con el sustrato x-gluc. El resto de los callos fueron subcultivados para su selección en medio Myt con kanamicina al cabo de una semana del bombardeo. Después de tres meses del bombardeo se observó la germinación de embriones somáticos transformados subcultivados en medio MS sin hormonas dando origen a la obtención de plántulas, las cuales fueron transferidas a tierra y mantenidas en condiciones de invernadero; posteriormente se tomó al azar una planta de cada explante y tipo de bombardeo para realizar

la prueba de expresión permanente de *gus* con la finalidad de corroborar la integración del DNA plasmídico al DNA genómico vegetal. Finalmente en esta prueba se observó la expresión de la enzima β -glucuronidasa con lo cual se propone lograr la obtención de plantas transgénicas de zanahoria con la glicoproteína "G" del virus de la rabia.

1 JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

Los adelantos en la Biología Molecular han permitido introducir genes a muchas especies vegetales, siendo las dicotiledóneas las que han sido preferentemente transformadas; y hasta el momento se cuenta con una lista amplia de especies de esta clase de las cuales las primeras con información genética adicional han sido tabaco, papa, zanahoria y soya entre otros; sin embargo, a diferencia del tabaco, la zanahoria es un modelo adecuado ya que su importancia económica no sólo descansa en el hecho de ser un alimento para humanos, sino que también se puede utilizar en las dietas de ganado.

Por otro lado en México la enfermedad de la rabia representa un problema serio para el ganado vacuno ya que es transmitida por la mordedura de murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*), se caracteriza por ser aguda y mortal trayendo como consecuencia pérdidas en la producción bovina, además de ser un grave problema de salud pública.

En el presente trabajo se planteó establecer los cultivos *in vitro* de zanahoria con la capacidad de regenerar plantas completas a través del proceso de diferenciación de embriones somáticos y, lograr con ello la transformación de zanahoria introduciendo el gen que codifica para la proteína "G" del virus de la rabia, y regenerar plantas transformadas las cuales, podrían utilizarse como

vacuna oral, pues la enfermedad de la rabia representa un problema serio para el ganado vacuno en México (www.sagarpa.com.mx, 2000).

Aún cuando la zanahoria no presenta problemas para su regeneración, en la transformación genética es requisito indispensable caracterizar cada una de las etapas de la regeneración y transformación para obtener un sistema de transformación eficiente, que no limite la recuperación de plantas transgénicas.

1.1 OBJETIVO GENERAL

Lograr la obtención de plantas transgénicas de zanahoria (*Daucus carota L.*) que contengan la glicoproteína "G" del virus de la rabia cepa pWR-21.

2 REVISIÓN DE LITERATURA GENERAL

2.1 Generalidades de zanahoria (*Daucus carota* L.)

La zanahoria (*Daucus carota* L.) es una especie originaria del Asia central y del mediterráneo. Ha sido cultivada y consumida desde la época de los griegos y romanos. Es una planta que crece preferentemente en los climas templados. Al ser una planta bianual, durante el primer año es aprovechada por sus raíces y durante el segundo año, inducida por las bajas temperaturas, inicia las fases de floración y fructificación. La temperatura mínima de crecimiento está en torno a los 9°C y un óptimo en torno a 16-18°C. Soporta heladas ligeras, en reposo las raíces no se ven afectadas hasta -5°C; lo que permite su conservación en el terreno. Las temperaturas elevadas (más de 28°C) provocan una aceleración en los procesos de envejecimiento de la raíz, pérdida de coloración, etc. (www.infoagro.com)

2.2 Clasificación taxonómica y descripción de la planta

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Subdivisión: Angiospermae

Clase: Dicotyledonae

Orden: Umbeliflorae

Familia: Umbelliferae

Genero: Daucus

Especie: *Daucus carota* (www.minedu.gob.pe, www.puc.cl)

En estas plantas, el embrión emite dos cotiledones al crecer (Figura 2-1), hojas primordiales que sirven para proporcionar alimento a la nueva plántula y que, por lo general, no se transforman en hojas adultas (Figura 2-2). Las piezas florales se presentan en múltiplos de cuatro o cinco y las hojas suelen tener nerviación reticulada. El tejido vascular de los tallos se dispone en anillos y produce verdadero crecimiento secundario, que determina el aumento de diámetro de tallos y raíces, que aportan cámbium vascular, xilema y floema secundarios originando así las formas arborescentes.

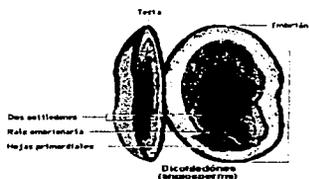


Figura 2-1 Partes de una semilla dicotiledónea

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

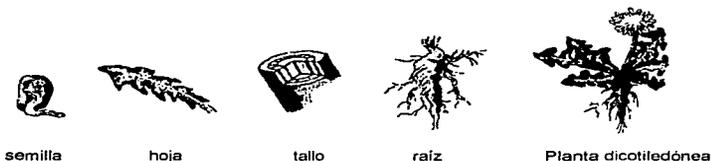


Figura 2-2 Partes de una planta dicotiledónea

La zanahoria es una planta bianual que durante la primera temporada de crecimiento presenta un sistema caulinar arrossetado, con un tallo pequeño y muy comprimido, en el cual se generan hojas grandes (30 a 60 cm), pubescentes, con peciolo largo, delgado con base abrazadora y de lámina fuertemente dividida (bi o tripinnatisecta), con segmentos lineales. Al inicio de la segunda temporada el tallo se elonga y ramifica en numerosos tallos florales, de 1 a 2 m de altura, que culminan en umbelas compuestas. De acuerdo a su ubicación en los tallos florales, las umbelas son terminales o primarias, secundarias, terciarias e incluso, cuaternarias, disminuyendo progresivamente de tamaño. Cada umbela contiene numerosas flores blancas, pequeñas, epíginas, en su mayoría hermafroditas, con 5 sépalos pequeños, 5 pétalos blancos a púrpura, 5 estambres protándricos y un ovario bicarpelar, provisto de nectarios.

Su sistema radicular consiste en una raíz primaria pivotante engrosada que, incluyendo parte del hipocotilo, constituye el órgano de consumo de la especie, además de numerosas raíces secundarias, ramificadas y finas, que se forman a partir de la mitad inferior de la raíz principal y que alcanzan una profundidad de hasta 1 m en el suelo (www.puc.cl, 2002). Al realizar un corte transversal se

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

distinguen dos zonas bien definidas: una exterior, constituida principalmente por el floema secundario y otra interior formada por el xilema y la médula (www.infoagro.com, 2003). El fruto desarrollado después de la polinización cruzada entomófila es un esquizocarpo, formado por dos mericarpios (aquenios) espinosos que hacia la madurez se dividen ventralmente, conteniendo una semilla cada uno (www.puc.cl, 2002). El fruto está formado por dos nucículas monospermas, cada una de ellas con cuatro hileras de espinas radiales que sirven a la semilla madura para engancharse a la piel de los animales y asegurar así la propagación de la planta .

2.3 Características del cultivo

El cultivo de la zanahoria tiene preferencia por suelos ligeros muy permeables originando una débil capacidad de retención de los nutrientes, ante todo nitratos, que se pierden por lavado como consecuencia se produce una deficiente absorción de nitrógeno. El nitrógeno juega un papel importante ya que influye directamente sobre el desarrollo vegetativo de la planta, en la acumulación de reservas (formación de la zanahoria) y desarrollo de la planta en general (interviene reacciones metabólicas, síntesis de proteínas etc.), siendo el amonio la forma nitrogenada preferentemente absorbida por la zanahoria, por lo que es recomendable la adición de fuentes de nitrógeno. El fósforo, si bien es absorbido en menor cantidad que el nitrógeno y el potasio, tiene gran importancia para asegurar un buen desarrollo de la zanahoria y una absorción equilibrada de los restantes nutrientes. Otro macroelemento importante para la zanahoria es el

magnesio ya que su ausencia provoca una reducción de la capacidad fotosintética (www.campo.es/agricultura/cultivos/hortalizas/zanahoria/index.asp). La temperatura óptima de crecimiento es de 16-18°C, con pH comprendido entre 5.8 y 7.

2.4 Importancia económica y distribución geográfica.

El cultivo de la zanahoria ha experimentado un importante crecimiento en los últimos años, tanto en superficie, como en producción, ya que se trata de una de las hortalizas más producidas en el mundo. Asia es el mayor productor seguida por Europa y E.U. Según la FAO (2002), la producción anual en México es de 341,412 toneladas (www.infoagro.com,2002) ya que la siembra se realiza prácticamente durante todo el año (Figura 2-3)



Figura 2-3. Distribución geográfica de cultivos de zanahoria

2.5 Valor Nutricional.

Las cualidades nutritivas de las zanahorias son importantes, especialmente por su elevado contenido en beta-caroteno (precursor de la vitamina A), pues cada molécula de caroteno que se consume es convertida en dos moléculas de

vitamina A. En general se caracteriza por un elevado contenido en agua y bajo contenido en lípidos y proteínas (Tabla 2-1).

Tabla 2-1 Valor nutricional de la zanahoria

Valor Nutricional de la Zanahoria en 100 g de sustancia comestible	
Agua (g)	88.6
Carbohidratos (g)	10.1
Lípidos(g)	0.2
Vitamina A (U.I.)	2,000-12,000*
Vitamina B1 (mg)	0.13
Vitamina B2 (mg)	0.06
Vitamina B6 (mg)	0.19
Vitamina E (mg)	0.45
Ácido Nicotínico (mg)	0.64
Potasio (mg)	0.1
Calorías (cal)	40

* según variedades (www.infoagro.com)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3 CAPITULO I EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN ZANAHORIA COMO MODELO BIOLÓGICO

3.1 INTRODUCCIÓN

El cultivo de tejidos es una herramienta de gran utilidad en la Ingeniería Genética. Esta técnica se basa en la "totipotencialidad celular"; que es la capacidad de una célula vegetal de dar origen a una planta completa bajo ciertas condiciones químicas y físicas, dadas en el cultivo *in vitro*. Así se obtiene la propagación rápida y masiva de plantas idénticas a la original a partir de cualquier parte de la planta, sean estos trozos de tejidos, ápices meristemáticos o incluso células aisladas. Inicialmente se usó esta técnica para la multiplicación masiva de plantas élites o micropropagación y también en la obtención de clones libres de virus. Sin embargo, el cultivo de tejidos tiene su mayor proyección como herramienta en el mejoramiento de plantas con el uso de la biología molecular y la ingeniería genética. (www.inia.cl/biotecnologia/c_tejidos.htm).

Aunado a esto, todo sistema de transformación genética debe basarse en un protocolo eficiente de regeneración de plantas completas.

Un sistema morfogénético para la regeneración de plantas es la embriogénesis somática bajo condiciones *in vitro*, la cual se define como el proceso en el cual una estructura bipolar semejante a un embrión zigótico se desarrolla a partir de una célula somática sin existir alguna conexión vascular con el tejido original (Arnold, 2001).

Este proceso se observa con alta frecuencia en la naturaleza, produciéndose de forma espontánea en más de 60 familias, algunas tan importantes como las: Compuestas, Crucíferas, Cucurbitáceas, Gramíneas, Rosáceas, Leguminosas, Palmáceas, etc. Es pues un proceso tan natural como la embriogénesis zigótica, con casos tan conocidos como el de los cítricos, en los que ambos tipos de embriogénesis ocurren casi simultáneamente en el interior de la semilla (www.ciencias.uma.es).

Los embriones somáticos constituyen una herramienta útil para el estudio de la regulación del desarrollo embriogénico. Sin embargo la mayor importancia de los embriones somáticos es su aplicación práctica en la propagación vegetativa a gran escala puesto que en la mayoría de los casos, estos embriones, así como los cultivos embriogénicos pueden ser criopreservados, lo cual hace posible establecer bancos genéticos o la producción de semillas artificiales (Arnold, 2001).

Además Gordon-Kamm *et al* (1990) han resaltado la importancia de utilizar los cultivos embriogénicos para la transformación genética, ya que en estos tejidos la regeneración vegetal se lleva a cabo por la vía de embriogénesis somática, en donde la regeneración de plantas parte de una sola célula o de un pequeño grupo de células aumentando la posibilidad de obtener plantas totalmente transformadas por esta vía.

3.1.1 OBJETIVO GENERAL

Establecer y caracterizar cultivos embriogénicos de zanahoria (*Daucus carota L.*) como modelo de transformación genética para la obtención de vacunas comestibles.

3.1.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer el método de esterilización óptimo de semillas de zanahoria.
- Determinar el medio de cultivo más adecuado para la inducción de callos embriogénicos de zanahoria.
- Seleccionar el mejor explante (peciolo, hojas cotiledonarias, hojas verdaderas, zonas nodulares y tallo) para la obtención de callos embriogénicos.
- Seleccionar el mejor medio para la germinación de embriones somáticos.
- Evaluar la cinética de crecimiento de callos embriogénicos a través de curvas de peso fresco y seco.

3.2 REVISIÓN DE LITERATURA

3.2.1 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA BAJO CONDICIONES *in vitro*.

La regeneración de plantas se puede lograr a través de dos procesos morfogénicos: organogénesis y embriogénesis somática. El primero permite la diferenciación de órganos a través de brotes adventicios, formación de hojas, diferenciación de raíces y otros órganos; en cambio, en el segundo proceso, el

de la embriogénesis somática se obtiene una planta completa en un mismo momento.

Estos dos procesos se han utilizado con éxito en la transformación genética, aunque la organogénesis ha sido la vía preferencial de regeneración de plantas en las dicotiledóneas ya que tienen mayor capacidad morfogénica y, además se ha echado mano de *Agrobacterium sp.* la cual infecta de manera natural a esta clase de plantas. En el caso de la embriogénesis somática ha sido utilizada sistemáticamente en monocotiledóneas después de que se descubrió que los cultivos de este tipo pueden ser producidos en altas frecuencias utilizando concentraciones altas de auxinas sintéticas.

3.2.2 Embriogénesis somática

La embriogénesis somática, es el proceso mediante el cual las células somáticas se desarrollan y dan origen a plantas completas a través de estados embriogénicos característicos (globular, corazón y torpedo) con dicotiledóneas sin que ocurra la fusión de gametos (Williams & Maheswaran, 1986, citados por Fransz & Aschel, 1991a).

Éste es un proceso de regeneración que consta de múltiples pasos empezando por la formación de masas pro embriogénicas, seguido de la formación de embriones somáticos, maduración y por último la germinación.

En el cultivo *in vitro*, este modelo, inicia con la inducción de cultivos embriogénicos, lo cual se logra con la inoculación de explantes primarios en medios de cultivo suplementados con reguladores de crecimiento,

principalmente auxinas pero también frecuentemente citocininas. Posteriormente se lleva acabo la proliferación de los cultivos embriogénicos en medio sólidos o líquidos suplementados con reguladores de crecimiento, de forma similar a la inducción.

Una vez proliferado el callo se procede a estimular la formación de proembriones a través de la remoción de reguladores de crecimiento del medio de cultivo.

Finalmente la germinación de estos embriones somáticos se realiza en medios sin hormonas (Arnold, 2001).

La embriogénesis somática es un fenómeno natural bien conocido. En muchos miembros de las *Rutaceas* especialmente en *Citrus spp.* los embriones se desarrollan de la nucela o el tegumento circundante (Esan, 1973 citado por Ammirato, 1983). También se ha observado que, de forma natural, los embriones pueden desarrollarse de una gran variedad de tejidos entre los cuales se encuentran el saco embrionario, las sinérgidas, las antípodas, el embrión o el óvulo mismo.

Afortunadamente este fenómeno ha sido observado de manera frecuente, en muchas especies y familias para demostrar que no es un hecho restringido a unos cuantos taxa. Por lo tanto, existe la posibilidad de que células de cualquier planta bajo el estímulo y las condiciones adecuadas puedan ser inducidas a manifestar el patrón embriogénico (Ammirato, 1983). De hecho, son más numerosos los fenotipos celulares que presentan embriogénesis somática *in vitro* que aquellos que la presentan *in vivo*.

El proceso de embriogénesis somática es sumamente complejo, difícil de caracterizar y se le ha descrito como de tipo eminentemente plástico en su desarrollo (Geri *et al*, 1994). Esta plasticidad es el resultado de cambios en la extensión de las etapas de la diferenciación y el desarrollo de los embriones somáticos. En comparación con la secuencia normal de dichas etapas, algunos cambios pueden ser prematuros o sufrir algún retraso, la longitud de su expresión puede alargarse o acortarse, y los efectos pueden ser manifestados a niveles celulares, de tejidos u órganos. Además de esto, la embriogénesis somática responde a modificaciones en el medio de cultivo, motivo por el cual las secuencias morfogénicas pueden ser afectadas (J. de Jong *et al*, 1993).

3.2.3 Factores que influyen en la embriogénesis somática

3.2.3.1 Medios de cultivo

La composición del medio de cultivo es de gran importancia para el surgimiento de embriones somáticos, ya que en el se encuentran diversos elementos cruciales para la formación del callo embriogénico, tales como los reguladores de crecimiento, fuente de carbono, sales y vitaminas (Lozoya,1985) entre las cuales se encuentran: tiamina, ácido nicotínico y piridoxina (Evans *et al*, 1981;Wetherell,1978).

La presencia de nitrógeno y su aprovechamiento es también un factor importante en la composición del medio, ya que se ha reportado que la adición de nitrato en altas concentraciones al medio de cultivo junto con compuestos nitrogenados reducidos tales como sales de amonio, así como ciertos

aminoácidos, especialmente L-alanina y glutamina estimulan fuertemente la respuesta embriogénica en zanahoria y alfalfa (Reinert et al. 1967 Reinert y Tazawqa 1969, Halperin y Wetherell 1965, Wetherell y Dougall 1976, Kamada y Harada 1979 b, Walker y Sato 1981), así como el aprovechamiento de nitrógeno (Dougal & Verma, 1978) además la presión osmótica del medio de cultivo también juega un papel importante (Close & Ludeman, 1987; Brown *et al.*, 1989).

En términos generales en la embriogénesis somática de zanahoria, la maduración y germinación de células se induce al pasarlas de un medio que contiene auxinas a uno libre de éstas (Hiroshi, 1984). Encontrándose que las sales inorgánicas del medio MS (Murashige & Skoog, 1962), así como el regulador de crecimiento, 2,4-D a razón de 1 a 2 mgL⁻¹ aportan los requerimientos necesarios para la inducción de callos embriogénicos, preferentemente a partir de peciolo (Ribnicky, 1996).

La presencia de este regulador de crecimiento produce una proliferación de callo no diferenciado, mientras que la remoción de este regulador de crecimiento provoca que las masas de células no diferenciadas sigan un patrón de organización que resulte en la formación de embriones somáticos (Ribnicky, 1996).

3.2.3.2 Luz

En estudios previos se ha observado que la luz no es un factor determinante para la iniciación de embriones asexuales en cultivos *in vitro* de zanahoria, cítricos y tabaco. Sin embargo con una intensidad luminosa de 1000 lux por 16

horas es posible la obtención de callos embriogénicos, a menos que se requiera cumplir con objetivos específicos de estudio o con especies vegetales que necesiten parámetros definidos distintos a los mencionados (Lozoya, 1985).

3.2.3.3 Temperatura

Las condiciones óptimas de calor para los cultivos *in vitro* no son necesariamente las mismas que requiere la planta en su hábitat natural. La temperatura no es un factor crítico para la embriogénesis, aunque ésta no debe exceder los límites de 20 a 30°C para el cultivo de tejidos en general (Lozoya,1985).

3.2.3.4 Material biológico utilizado

La elección del genotipo y el explante es crucial en la obtención de respuesta embriogénica (Gray,1990; Gray y Meredith 1992). En el caso de maíz únicamente un rango limitado de genotipos son capaces de producir cultivos embriogénicos, sumando a esto que sólo embriones inmaduros pueden ser utilizados.

La longevidad de los tejidos influye en gran medida debido a que los tejidos pierden su potencial con el tiempo posiblemente a causa de cambios cariotípicos y de ploidía en respuesta a la presencia de auxinas (Lozoya,1985), además de probables cambios epigenéticos. Cabe señalar que para esta característica existe un período óptimo para cada especie.

Otro factor importante es la etapa de desarrollo del explante (Gray,1990).

3.2.4 Embriogénesis somática en zanahoria

El desarrollo de una célula vegetal simple a embrión somático involucra una secuencia ordenada de eventos estructurales, fisiológicos y genéticos. Este proceso es frecuentemente estudiado en zanahoria *Daucus carota L.* ya que la presencia de auxinas en el medio estimulan eficientemente a un gran número de células blanco que dirigen su nuevo destino morfogénico a la formación de un embrión (Shciavone and Cooke, 1985).

Aunque la zanahoria se ha utilizado ampliamente como modelo biológico para estudiar la diferenciación embriogénica; hasta el momento no se ha logrado hacer una caracterización clara de las características específicas de cada estado del desarrollo, así como las condiciones que le permiten pasar de un estadio a otro.

La embriogénesis en zanahoria tuvo sus inicios en el año 1958 y 1959, en los que Steward y Reinert (citados por Ammirato,1983) lograron la obtención de callos embriogénicos a partir de explantes de raíz principal de zanahoria (*Daucus carota L.*).

Dentro de las angiospermas, la zanahoria es una de las especies más estudiadas con respecto a los estímulos que promueven la embriogénesis somática, así como sus mecanismos moleculares (Arnold, 2001).

En 1994 Toonen estudió tres importantes aspectos de la embriogénesis somática, el primero de ellos referente a los tipos de células capaces de

desarrollarse en embriones somáticos de acuerdo al potencial embriogénico que poseen, mientras que el segundo y tercero refieren a los estados embriogénicos comunes, así como las variaciones y similitudes entre los pasos que promueven la embriogénesis somática partiendo de diferentes tipos de células.

Toonen (1994) encontró que todos los tipos de células podían desarrollar embriones somáticos, aunque con diferentes frecuencias (variando entre 19 y 100 embriones somáticos por 10,000 células), en todos los casos la formación de embriones procedía de la misma secuencia estereotipada de estados embriogénicos característicos; globular, corazón y torpedo. Además también observó el requerimiento de auxinas para la formación del estado globular, mientras que los subsecuentes estados se presentaban en ausencia de estas (Arnold, 2001).

En cultivos de zanahoria, la auxina sintética 2,4-D es comúnmente utilizada para iniciar cultivos embriogénicos (Ammirato, 1985), así como de otras especies (Dunstant et al., 1995), aunque también el ácido naftalenacético (otra auxina) ha demostrado ser efectiva para la inducción y maduración de embriones somáticos de zanahoria (Ammirato, 1985).

Fujimora y Komamine en 1980 encontraron en zanahoria, que se presentan velocidades muy diferentes de división celular en diferentes estados embriogénicos durante la formación del embrión, observando además en geles de electroforesis cambios en las proteínas entre los estados globular y torpedo (Tonnen, 1994).

También se ha reportado que existe dificultad para la inducción de embriones en las primeras cuatro semanas posteriores a la siembra del inóculo, por lo que las masas embriogénicas se forman varias semanas después. La división celular tiene lugar preferentemente en las zonas más superficiales del callo. La parte central que une a las periferias muere, haciendo posible que las capas exteriores formen grupos de células que a la vez crecen, se dividen y repiten el ciclo. (Wetherell, 1978).

Al alcanzar las masas proembriogénicas un estado preglobular, éstas son subcultivadas en un medio libre de hormonas, permitiendo así su desarrollo a los estados embriogénicos característicos: globular, corazón y torpedo (Smith y Krikorian, 1990).

La germinación de los embriones prospera en medio MS sin la presencia de reguladores de crecimiento dando lugar a la planta, la cual al alcanzar el tamaño apropiado finalmente se pasa al suelo (Reinert, 1969; Wetherell, 1978).

3.3 HIPÓTESIS

Si la diferenciación celular depende del tipo de explante así como de la presencia de auxinas y una fuente de nitrógeno reducido, entonces se favorecerá la embriogénesis somática en aquellos tejidos con zonas meristemáticas activas empleando el medio de cultivo que proporcione una fuente rica de nitrógeno y en presencia de 2,4-D.

3.4 MATERIALES Y MÉTODOS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.4.1 Aspectos Generales

3.4.1.1 Material biológico.

Como material biológico se utilizaron distintos explantes provenientes de plántulas de zanahoria (*Daucus carota L.*) de 15 días de germinadas (Figura 3-1). Los explantes se obtuvieron realizando cortes de hojas verdaderas, hojas cotiledonarias, peciolo y tallos de aproximadamente 1 cm de longitud.

Se colocaron aproximadamente 15 cortes de cada explante por frasco de vidrio de alimento infantil con 30 ml de medio, de tal forma que los explantes quedaron sobre la superficie del medio de cultivo (las hojas verdaderas y cotiledonarias se colocaron con el envés en contacto al medio).



Figura 3-1. Plántulas de zanahoria

3.4.1.2 Preparación de medios de cultivo

La preparación de los medios de cultivo se realizó a partir de soluciones madre o stock del medio MS (Murashige y Skoog, 1962) 100 veces concentradas. El medio fue suplementado con compuestos orgánicos, reguladores de crecimiento

(ver anexo), 30 % de sacarosa y utilizando como gelificante 2.5 % de gellan. El pH fue ajustado a 5.7 ± 0.1 antes de la esterilización con NaOH 1N y HCl 1N.

Finalmente los medios se esterilizaron en una autoclave vertical durante 18 minutos a 120°C y a 1.3 kg cm^{-2} ó 18 lb.in^{-2} de presión.

3.4.1.3 Condiciones de incubación

Los cultivos se incubaron en un cuarto de ambiente controlado con un fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas de oscuridad y a una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

3.4.2 Método de esterilización de semillas

Se probaron dos métodos de esterilización para las semillas (Figura 3-2) los cuales fueron:

Método 1

- i. Se sumergieron las semillas de zanahoria en etanol al 70% (v/v) en agitación constante durante un minuto.
- ii. Se sumergieron las semillas en NaClO_2 comercial (6% de cloro activo) al 30%(v/v) en agitación constante durante 5 minutos.
- iii. Finalmente se enjuagaron las semillas agitando tres veces durante un minuto con agua desionizada estéril.

Método 2

- i. Se sumergieron las semillas de zanahoria en etanol al 70% (v/v) en agitación constante durante un minuto.
- ii. Se sumergieron las semillas en una mezcla que contiene NaClO₂ comercial (6% de cloro activo) al 30%(v/v), 1 gota del tensoactivo Tween 20 y 5 gotas de solución de plata coloidal al 0,35 % (microdin[®]) en agitación constante durante 8 minutos.
- iii. Finalmente se enjuagaron las semillas agitando varias veces con agua desionizada estéril.



Figura 3-2. Semillas de zanahoria

3.4.3 Establecimiento del cultivo de callos embriogénicos

Una vez establecido el método óptimo de esterilización de semillas, se colocaron 30 semillas por frasco de vidrio con 30 ml de medio cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) para su germinación.

Con la finalidad de encontrar un medio que favoreciera la inducción de callo embriogénico, se probaron dos medios diferentes de cultivo, el medio Z-1 y el medio Myt (ambos modificados por Olivera Flores, 1996), el primero de ellos, se preparó a partir de sales inorgánicas del medio MS suplementado con vitaminas

R₂ y el regulador de crecimiento 2,4-D (ver anexo), mientras que el segundo se realizó a partir de la adición de sales inorgánicas del medio MS suplementado con una mezcla de vitaminas y aminoácidos llamada cóctel 20, los reguladores de crecimiento MCPP y BAP y antioxidante (ver anexo).

3.4.4 Selección de explantes y medio de cultivo

Se seleccionaron aquellos explantes que proporcionaron una mayor formación de callos embriogénicos, así como el medio de cultivo óptimo para su inducción a través del conteo del número de frascos que presentaron formación de callo embriogénico.

3.4.5 Proliferación y germinación de callos embriogénicos

Para la proliferación de callos embriogénicos, los medios de cultivo utilizados no presentaron ninguna modificación. Para su maduración, fue necesario realizar subcultivos cada tres semanas en el mismo medio de cultivo. La germinación de callos embriogénicos se realizó probando dos medios de cultivo: medio MS sin hormonas y medio MS con hormonas a la mitad de su concentración original (ver anexo) .

3.4.6 Obtención de plántulas

De la germinación de los embriones somáticos se obtuvieron pequeñas plántulas, las cuales se individualizaron y se pasaron a medio MS sin hormonas ; una vez alcanzada una talla de 10 cm de longitud fueron transferidas a una

mezcla estéril de tierra con hojarasca (2:1) y mantenidas en condiciones de invernadero, logrando así la obtención de plantas completas de zanahoria.

3.4.7 Cinéticas de crecimiento

Se realizaron curvas de crecimiento de callo embriogénico con la finalidad de conocer la fase de crecimiento exponencial de los callos embriogénicos, para su posterior transformación por biobalística, ya que en ésta etapa de crecimiento la probabilidad de integración del DNA es mayor. Estas curvas de crecimiento se realizaron registrando en una balanza las mediciones de peso fresco y peso seco de los callos embriogénicos seleccionados al azar obtenidos de los explantes de tallo y peciolo. Dichas mediciones tuvieron lugar cada tercer día partiendo de 0.5 g de callo durante 2 semanas tanto para peso fresco como peso seco; los callos empleados para la curva de peso seco fueron extraídos del medio del cultivo 24 horas antes de registrar las lecturas de peso y colocados en papel aluminio para que posteriormente fueran secadas en un cuarto oscuro a temperatura ambiente. Las curvas de peso fresco para los explantes tallo y peciolo fueron realizadas a una temperatura controlada de 28 °C durante tres días con 10 repeticiones para cada uno, mientras que las curvas realizadas en peso seco fueron realizadas con únicamente 3 repeticiones para ambos explantes.

3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.5.1 Métodos de Esterilización de semillas

Para el establecimiento de cultivos asépticos de zanahoria se probaron dos métodos de esterilización, los cuales se especifican en Tabla 3-1, donde se muestra que el primer método utilizado resultó ser ineficiente, ya que se obtuvo el 100% de contaminación, siendo necesario por esta razón probar un segundo método, en el cual se aumento el tiempo de exposición con el agente desinfectante (NaClO_2), además de adicionar un agente tensoactivo (Tween 20) y un agente desinfectante (microdin®) .

Tabla 3-1. Establecimiento de cultivos asépticos de zanahoria

MÉTODO DE ESTERILIZACIÓN	NÚMERO DE FRASCOS SEMBRADOS	% DE CONTAMINACIÓN
1. Inmersión en ETOH al 70% durante 1 min. Inmersión en NaClO_2 al 30% (v/v) durante 5 min. Enjuagar con H_2O d estéril.	10	100
2. Inmersión en ETOH al 70% durante 1 min. Inmersión en una mezcla de NaClO_2 al 30% (v/v) + 1 gota Tween 20 + 5 gotas de microdin® durante 8 min. Enjuagar con H_2O d estéril.	10	0

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

De acuerdo a los resultados obtenidos el método de esterilización adecuado para el establecimiento de cultivos asépticos fue el método dos en el cual se logró la desinfección total de la semilla obteniendo 0% de contaminación.

Lo anterior se debe a que factores físicos y químicos como agitación y adición de desinfectantes, tienen efectos determinantes e intensos en todas las actividades de los microorganismos (Mejía, *et al.* 1998).

La presencia del etanol como antiséptico inhibe la actividad de la mayoría de los microorganismos, ya que ejerce un efecto neto en la permeabilidad de su membrana a través de la desorganización de la disposición ordenada de lípidos y proteínas, alterando su función. Sin embargo no logra eliminar en su totalidad a los microorganismos (Mejía, *et al.*, 1998). Es por esta razón que se utiliza conjuntamente con el tensoactivo Tween 20 el cual es un surfactante, que disminuye la tensión superficial permitiendo así obtener una mayor superficie de contacto con los agentes desinfectantes (NaClO_2 y microdyn®).

(<http://www.colpos.mx/agrocien/Bimestral/2001/may-jun/art-1.pdf>).

El NaClO_2 , es un desinfectante que actúa sobre proteínas y ácidos nucleicos de los microorganismos, oxidando grupos -SH, además de atacar grupos aminos, indoles y al hidroxifenol de la tirosina, es activo sobre todas las bacterias, incluyendo esporas, y además es efectivo en un amplio rango de temperaturas, su actividad bactericida se debe al ácido hipocloroso (HClO) y al Cl_2 que se forman cuando el hipoclorito es diluido en agua (www.microbiologia.com.ar/bacteriologia/esterilizacion).

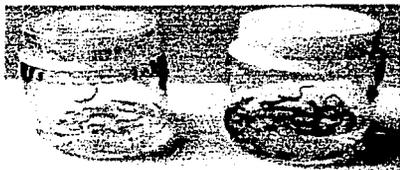
Por otra parte la solución de plata coloidal microdyn® adicionada en el segundo método de esterilización presenta actividad bactericida, la cual se ve potenciada por efecto sinérgico con el agente desinfectante hipoclorito de sodio. Esta solución de plata coloidal al reaccionar con los grupos SH de las proteínas funcionales y estructurales de las células bacterianas, inhibe su respiración, misma que ocurre a través de las membranas celulares (www.fai.unne.edu.ar), logrando así matar a las bacterias presentes en la superficie de la semilla.

Al aumentar el tiempo de exposición de la mezcla desinfectante con la semilla ocurre una mejor penetración en ésta, además de que se asegura la eliminación de los microorganismos, ya que éstos no son susceptibles a un agente desinfectante en la misma forma, por lo que no todos mueren al mismo tiempo. De esta forma se logró reducir al 100% la contaminación causada por hongos y bacterias, logrando así que la esterilización de semillas fuera efectiva .

(www.web.mit.edu).

3.5.2 Selección de Explantes y Medio de cultivo

Con la finalidad de encontrar un medio de cultivo que favoreciera la inducción de callo embriogénico así como el mejor explante para este fin, se comparó la respuesta embriogénica de los cuatro tipos de explantes utilizados (tallo, peciolo, hoja cotiledonaria y hoja verdadera), inoculados tanto en el medio Myt, como en el medio Z-1 (Figura 3-3 y Figura 3-4).



(a)



(b)

Figura 3-3 Inducción y formación de callo embriogénico en los explantes (a)pecíolo y (b) hoja cotiledonaria



(a)

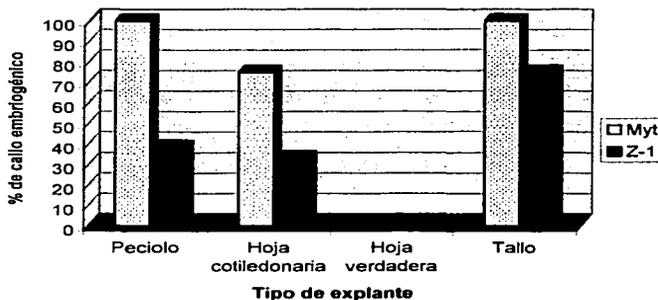


(b)

Figura 3-4. (a)Inducción y (b) formación de callo embriogénico en el explante tallo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los resultados obtenidos en la Gráfica 3-1 muestran que los dos medios de cultivo probados indujeron una respuesta embriogénica diferente, lográndose un mayor porcentaje de inducción de callo embriogénico en el medio Myt conteniendo 3 mg L^{-1} de MCPP y 0.32 mg L^{-1} de BAP, además de observarse un 100% en la obtención de callo embriogénico para los explantes tallo y peciolo, seguidos del explante de hoja cotiledonaria, con un 80% de inducción, mientras que la respuesta embriogénica en hoja verdadera fue nula.



Gráfica 3-1 Inducción de callo embriogénico

Tal y como lo describe Sherrington (1984), la inducción de la embriogénesis se ve favorecida por una interacción entre una alta concentración de auxina y una baja concentración de citocinina. El MCPP es una auxina sintética que modula la

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

expresión morfogénica en altas concentraciones, ya que actúa sobre las peroxidases de la pared celular favoreciendo la formación de los proembriones. Por otra parte la BAP es una hormona sintética aparentemente necesaria en la división de células vegetales, ya que en ausencia de ésta, la metafase de la mitosis se retarda, por lo que se sugiere su intervención en la regulación de la síntesis de proteínas involucradas en la formación y función del huso del aparato mitótico (George and Sherrington, 1984).

Se observó que el explante de hoja verdadera no presenta ninguna formación de callo embriogénico por lo que se siguió la metodología planteada únicamente con los explantes tallo, peciolo y hoja cotiledonaria, los cuales presentaron un elevado porcentaje de respuesta embriogénica (Gráfica 3-1). Esto se debe a que los explantes tallo y peciolo contienen zonas altamente meristemáticas, en las cuales se biosintetizan y/o liberan factores de crecimiento naturales, los cuales favorecen la división celular (George and Sherrington, 1984).

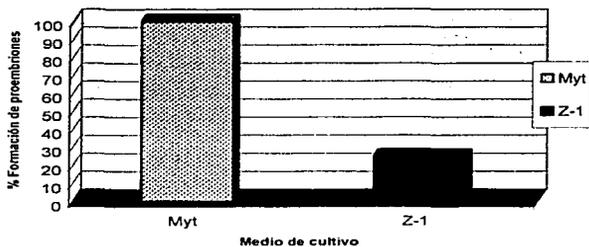
Se obtuvo una menor cantidad de callos embriogénicos en el medio Z-1 debido a que el nivel de la auxina presente (2,4-D $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) es bajo para la obtención de los proembriones, además, de que las vitaminas presentes (vitaminas R_2) son insuficientes, mientras en el medio Myt la concentración de auxina empleada es mayor (MCP $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) además de contener una mezcla rica en vitaminas y aminoácidos; ya que como sugiere Reinert *et. al.* (1967), la adición de nitrato en altas concentraciones en el medio de cultivo, junto con compuestos nitrogenados reducidos es muy importante para la respuesta embriogénica en zanahoria. Debido a esto los subcultivos posteriores de callos

embriogénicos se realizaron en el medio Myt, ya que de esta manera se observó un aumento en la formación de callo embriogénico aunque la respuesta no fue equivalente a la observada en los callos inducidos desde el inicio en el medio Myt.

3.5.3 Proliferación y germinación de callos embriogénicos

Para la proliferación de callos embriogénicos se les continuó subcultivando tanto en medio Myt como en medio Z-1, a pesar de observar una notoria respuesta favorable en el medio Myt, lo cual se realizó con la finalidad de comprobar los resultados obtenidos en la etapa de inducción (Figura 3-5a).

Una vez realizados los subcultivos, se observó que la proliferación de callos embriogénicos presentó la mejor respuesta en el medio Myt con respecto a los callos del medio Z-1, confirmando que el medio Myt es el más adecuado para la inducción y proliferación de callos embriogénicos. Esto se debe a que se obtuvo un 100% de formación de proembriones en los frascos con callo embriogénico provenientes de los explantes tallo y peciolo, contenidos en el medio Myt (Gráfica 3-2).



Gráfica 3-2. Proliferación de callo embriónico.



(a)

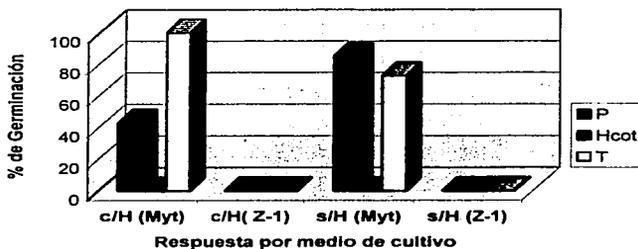


(b)

Figura 3-5(a) Proliferación de embriones de tallo en medio Myt. (b) Germinación de embriones de peciolo en medio s/H.

Para realizar la selección del mejor medio de cultivo para la germinación de embriones somáticos, los callos provenientes de los medios Myt y Z-1 fueron transferidos a los medios de cultivo MS con y sin hormonas para comparar

respuesta ante la ausencia y presencia de auxinas, esto se realizó para los explantes de peciolo, hoja cotiledonaria y tallo (Gráfica 3-3).



Gráfica 3-3. Germinación de callo embriogénico

La germinación de los embriones se realizó en los medios MS con la mitad de hormonas utilizando 2,4-D (0.5 mg . L⁻¹) y MS sin hormonas, de los cuales, el medio MS con la mitad de hormonas no generó la respuesta esperada por presentar un porcentaje bajo (40%) de germinación de los embriones para el explante peciolo en comparación al explante tallo ya que presentó el 100% mientras que la respuesta para el explante de hoja cotiledonaria fue nula. Por el contrario, en el medio MS sin hormonas se presentó la germinación satisfactoria de los embriones (Figura 3-5b) observando un mayor porcentaje de respuesta para los explantes peciolo y tallo (85% y 73% respectivamente), encontrándose que la germinación de plantas completas se logró en los callos provenientes del

medio Myt de manera similar. Cabe señalar que la germinación de los callos provenientes del medio Z-1 fue nula para los tres explantes utilizados.

Lo anterior se debe a que una vez formadas las células embriogénicas (callo), éstas continúan su proliferación, para lo cual es necesaria la presencia de auxinas como reguladores de crecimiento, sin embargo resultan inhibitorias para la conversión de embriones somáticos a plántulas (Arnold, 2001), es por ello que se eliminan del medio de cultivo.

3.5.4 Regeneración

A partir de los embriones subcultivados en medio MS sin hormonas se obtuvieron plántulas de zanahoria, las cuales fueron individualizadas de los callos embriogénicos procedentes de tallo y peciolo (Figura 3-6). Logrando la obtención de 10 plantas completas de zanahoria promedio por frasco con callo embriogénico al cabo de su adaptación en condiciones de invernadero (Figura 3-7).



Figura 3-6. Desarrollo de plántulas completas a partir de los explantes Pecíolo y Tallo en medio Myt.

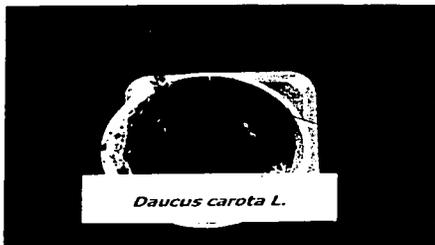


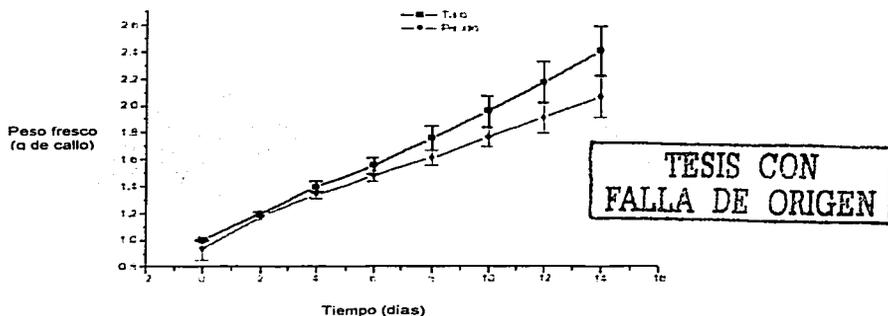
Figura 3-7. Plantas completas de zanahoria por embriogénesis somática.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.5.5 Cinéticas de crecimiento

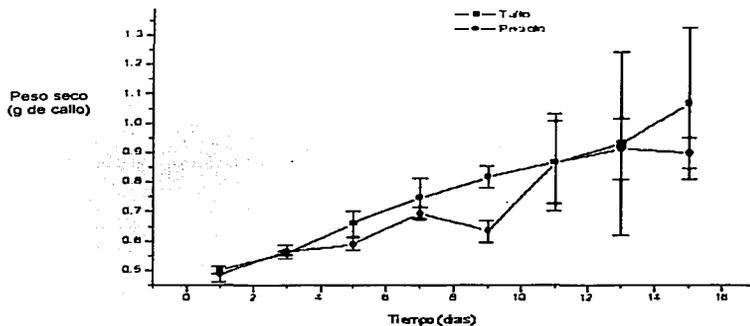
Para llevar a cabo la transformación genética en zanahoria (*Daucus carota L*) por medio de la técnica de biobalística, fue necesario establecer la fase exponencial de crecimiento del callo embriogénico, logrando esto a través de curvas de peso fresco y seco en los explantes tallo y peciolo.

Como se muestra en la Gráfica 3-4 y Gráfica 3-6, los callos embriogénicos obtenidos a partir de tallo y peciolo presentan un comportamiento similar ya que ambos explantes tienen un crecimiento lineal tanto en peso fresco así como en las de peso neto.



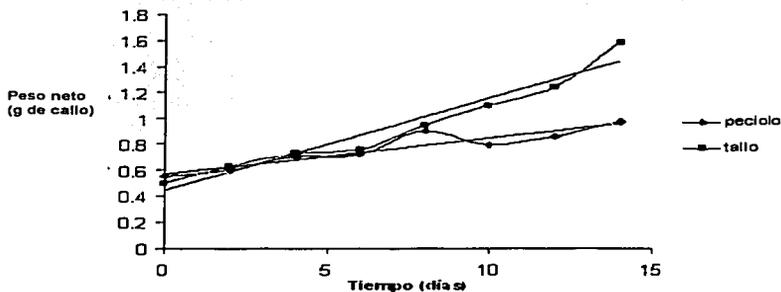
Gráfica 3-4. Cinética de crecimiento con base en el peso fresco en los cultivos de callos embriogénicos de zanahoria, procedentes de los explantes de tallo y peciolo.

Con la finalidad de contemplar únicamente el aumento de peso debido al crecimiento, se realizaron curvas en peso seco (Gráfica 3-5), para descartar el peso proporcionado por el agua absorbida durante el crecimiento del callo.



Gráfica 3-5. Curva de crecimiento con base en peso seco para los callos embriogénicos de zanahoria procedentes de los explantes tallo y peciolo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Gráfica 3-6. Curva de crecimiento con base al peso neto de los callos embriogénicos provenientes de los explantes de tallo y peciolo.

La gráfica 3-6 hace referencia al peso neto, el cual fue obtenido de la diferencia entre peso fresco y seco de los callos, de manera que se muestra únicamente el crecimiento sin tomar en cuenta la cantidad de agua que constituye al callo observándose para ambos explantes un mayor incremento en peso neto cercano al día 8 del subcultivo.

En la misma se muestra que los explantes tallo y peciolo no presentan fase lag observándose un comportamiento de crecimiento constante.

Al elegir al día 8 como el óptimo para realizar el bombardeo de los callos embriogénicos, se aumenta la probabilidad de que el DNA plasmídico se integre al DNA genómico de las células de zanahoria .

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.6 CONCLUSIONES

1. El mejor método para la obtención de cultivos asépticos fue aquel en el cual se agitaron las semillas en etanol al 70% durante 1 min y posteriormente 8 min. en una mezcla de microdin®, Tween 20 y NaClO₂ al 30%, ya que se eliminó totalmente la contaminación .
2. Para la inducción de callos embriogénicos el medio Myt resultó ser el más adecuado, ya que contiene la cantidad de reguladores de crecimiento, vitaminas y sales necesarios para promover la formación de callos embriogénicos, la cual se ve favorecida por la interacción presentada entre la citocinina BAP y la auxina MCPP.
3. En los medios utilizados los explantes de hoja cotiledonaria y hoja verdadera no son aptos para llevar a cabo la embriogénesis somática por no presentar zonas meristemáticas, ya que requieren de una mayor concentración de reguladores de crecimiento tanto internos como externos para promover la formación de callo embriogénico, por lo que a pesar de aplicar los mismos tratamientos en las etapas posteriores a la inducción no se logró la germinación de plantas a partir de los pocos callos embriogénicos obtenidos.
4. Se obtuvieron como mejores explantes para lograr la embriogénesis somática el peciolo y tallo, por ser aquellos que presentaron la mejor

respuesta tanto para la etapa de inducción como para las etapas posteriores.

5. Los explantes de tallo y peciolo presentaron la germinación de embriones en un 80% (aproximadamente) el medio MS sin hormonas (Murashige y Skoog, 1962), debido a que por su composición dicho medio proporciona las condiciones nutritivas necesarias para el desarrollo de las plántulas, por lo que por esta vía es posible obtener plantas completas de zanahoria de manera eficiente.
6. Las cinéticas de crecimiento realizadas aportaron información suficiente para determinar los días convenientes para efectuar la transformación genética por medio de la técnica de biobalística. Siendo el día 8 el óptimo para realizar el bombardeo de callo embrionario.

3.7 Bibliografia

Ammirato, P.V. (1983). Embryogenesis. In: Handbook of Plant Cell Culture, Vol. 1. D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Amirato & Y. Yamada (eds). MacMillan, New York; USA. pp. 82-123.

Ammirato, P.V. (1985) Patterns of Development in culture. In RR Henke, KW Hughes, MP Constantine, A Hollaender, eds, Tissue Culture in Forestry and Agriculture, Plenum Press, New York, pp 9-29

Arnold, S., I. Sabala., P. Bozhkov., J. Dyachok & I. Filonova (2001). Developmental pathways of somatic embryogenesis. Plant cell, Tissue and Organ Culture 69:233-249.

Brown, C., F.J. Brooks, D. Pearson & R.J. Mathias (1989). Control of Embryogenesis and Organogenesis in Immature Wheat Embryo Callus Using Increased Medium Osmolarity and Abscisic acid. J. Plant Physiol. 133:727-733.

Close, K.R. & L.A. Ludeman (1987). The Effect of Auxin-like Plant Growth Regulators and Osmotic Regulation on Induction of Somatic Embryogenesis from Elite Maize Inbreds. Plant Science 52:81-89.

Dougal, D.K. & D.C. Verma (1978). Growth and Embryo Formation in Wild Carrot Suspension Culture with Ammonium Ion as a Sole Nitron Source. In vitro 14:180-182.

Dudits, D., G. Lazar & G. Bajszar (1979). Reversible Inhibition of somatic embryo differentiation by bromodeoxyuridine in cultures cells of *Daucus carota* L. Cell Differentiation 8:135-144.

Dunstant, D. I., T.E. Tautoris & T.A. Thorpe (1995). Somatic Embryogenesis in woody plants. In t.a Thorpe, ed, In Vitro Embryogenesis in Plants. Kluwer Academic Publishers, Boston, MA, pp 471-540.

Evans, D.A., W.R Sharp & C.E. Flick (1981). Growth and behavior of cell cultures:embryogenesis and organogenesis. En. Thorpe, T.A (Ed.).Plant tissue culture. Methods and applications in agriculture. Academic Press, New York, London, Toronto, Sidney, San Francisco. 45-113.

Fransz, P.F. & J.H.N. Schel (1991)a. An Ultrastructural Study on the Early Development of *Zea mays* Somatic Embryos. Can. J. Bot. 69:858-865.

- Fujimora T & A Komamine (1979). Involvement of endogenous auxin in somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *Pflanzenphysiologie* 95:13-19.
- Fujimora, T., A. Komamine & H. Matsumoto. (1980) *Physiol Pplant*.49:255-260.
- Geri, C., A. Turrini, I. Giorgetti, E. Nicoletti & V.N. Ronchi (1994). Early Events Showing Genome Plasticity During the Acquisition of Embryogenic Competence. VIIIth International Congress of Plant Tissue and Cell Cultures, Firenze, Italia. p.194.
- Gordon-Kamm, W.J., T.M. Spencer, M.L. Mangano, T.R. Adams, R.J. Daines, W.G. Start, J.V. O'Brien, S.A. Chambers, W.R. Adams Jr., N.G. Willets, T.B. Rice, C.J. Mackey, R.W.
- Guerrero-Andrade, O. Tesis Maestría: Construcción de vectores para la transformación de plantas con los genes de las glicoproteínas de fusión y de la hemaglutinina-neuraminidasa del virus de la enfermedad aviar del Newcastle y optimización de las condiciones de bombardeo. C.I.N.V.E.S.T.A.V., I.P.N. Irapuato, 2000.
- Krueger, A.P. Kausch & P.G. Lemaux (1990) Transformation of Maize Cells and Regeneration of Fertile Transgenic Plants. *Plant Cell* 2:603-618.
- Gray, D.J. (1990) somatic embryogenesis and cell culture in the Poaceae, In: *Biotechnology in Tall Fescue Improvement*, pp.25-57. M.J. Kasperbauer, Ed., CRC Press, Boca Raton, FL.
- Gray, D.J & C.P. Meredith (1992). Grape. In: *Biotechnology of Perennial Fruit Crops*. F.A. Hammerschlag and R.E. Litz, Eds., CAB International, Wallingford, U.K
- Hiroshi, K & H. Hiroshi (1984). Changes in Endogeneous Amino Acid Compositions during Somatic Embryogenesis in *Daucus carota* L. *Plant & Cell Physiol.* 25(1):27-38
- Halperin, W. & D.F. Wetherell (1965). Ammonium requirement for embryogenesis in vitro. *Nature* 205:519-520
- J. de Jong, A., E.D.L. Schmidt & S.C. de Vries (1993). Early Events in Higher-Plant Embryogenesis. *Plant Mol. Biol.* 22:367-377.
- Kamada, H & H. Harada (1979b). Studies on the organogenesis in carrot tissue cultures II. Effects of amino acids and inorganic nitrogenous compounds on somatic embryogenesis. *Z. Pflanzenphysiol.* 91:453-463

Lozoya, H. (1985). Embriogénesis somática. Fundamentos Teórico Prácticos de Cultivo de Tejidos. Chapingo.

Mejía A. (1998). Manual de prácticas de microbiología general. Facultad de Química. UNAM. Pp222-254

Murashige, T. & F. Skoog (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant* 15:473-497.

Reinert, J & Bajaj (1977). Aspects of organization organogenesis, cytodifferentiation. In plant tissue and cell culture, 2nd. Ed. Edited by H.E. Street. University of California Press, Berkeley. pp389-427.

Reinert, J., M.Tazawa & S. Semenoff (1967) Nitrogen compounds as factors of embryogenesis in vitro. *Nature* 216:1215-1216.

Reinert, J. and M. Tazawa (1969). Influence of nitrogen compounds and of auxin on embryogenesis in tissue cultures. *Planta* 87:239-248.

Ribnicky, D.M., I. Nebojsa., J.D. Cohen & T.J. Cooke (1996). The effects of Exogenous Auxins on Endogenous Indole- 3- Acetic Acid Metabolism. *Plant Physiol* 112:549-558.

Schiavone F. Mark & J. TO. Cooke (1985). A geometric analysis of somatic embryo formation in carrot cell cultures. pp 1573-1578.

Sherrington P. y George F. (1984). Plant propagation by tissue culture. Handbook and Directory of Comercial Laboratories. Eregcties limited. England.

Smith. D. L., A.D Kirkorian (1990). Somatic proembryo production from excised, wounded zygotic carrot embryos on hormone-free medium: evaluation of the effects of pH, ethylene and activated charcoal. *Plant Cell Rep-* 9:468-470

Toonen M.A.J ., T. Hendriks., E. D. L. Schmidh., H.A. Verhoeven., A. Dammen & S.C Vries(1994). Description of somatic-embryo-forming single cells in carrot suspension cultures employing video cell tracking. *Plants* 194:565-572

Walker, K.A & s.j. Sato (1981) Morphogenesis in callus tissue of *Medicago sativa*. The role of ammonium ion in somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 1:109-121

Wetherell, D.F (1978) In vitro embryoid formation in cells derived from somatic plant tissues. En: Hughes, K.W ., R. Henke & M . Constantine (Eds). Propagation of higher plants through tissue culture. U.S Dept. of Energy. The University of Tennessee, Knoxville. 102-104.

Wetherell, D.F & d.k Dougall (1976). Sources of nitrogen supporting growth and embryogenesis in cultures wild carrot tissue. *Physiol. Plant.* 37:97-103.

Zimmerman J.L. (1993). Somatic embryogenesis a model for early development in higher plants. *Plant Cell* 5:1411-1423

Páginas web:

<http://www.infoagro.com/hortalizas/zanahoria.htm> 2003

<http://www.minedu.gob.pe> 2001

<http://www.puc.cl> 2002

<http://www.campo.es/agricultura/cultivos/hortalizas/zanahoria/index.asp> 2001

<http://www.inia.cl/biotecnologia/cteidos.htm>

<http://www.ciencias.uma.es> 1997

<http://www.mapiz-koeln.mpg.de>

<http://www.colpos.mx/agrocien/Bimestral/2001/may-jun/art-1.pdf>

<http://www.microbiologia.com.ar/bacteriologia/esterilizacion>

<http://www.web.mit.edu>

http://www.fai.unne.edu.ar/microgeneral/19_micro.html

4 CAPITULO II TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE ZANAHORIA POR MEDIO DE BIOBALISTICA

4.2 INTRODUCCIÓN

Las técnicas de la biología celular y molecular se han convertido en poderosas herramientas para complementar el fitomejoramiento tradicional, permitiendo el acceso a un banco genético amplio a través de la transferencia de genes con características deseables entre dos especies sin importar su relación taxonómica, siendo posible introducir nuevos genes a muchas especies vegetales.

Las principales áreas de investigación para el mejoramiento de las plantas son la resistencia a los herbicidas, a los insectos y a las enfermedades microbianas, así como la mejora de la calidad de los productos. Entre las plantas modificadas genéticamente, sometidas a ensayos de campo a gran escala figuran calabazas resistentes a virus, algodón tolerante a los herbicidas y semillas oleaginosas de soya y colza con aceites modificados (Brock,1999). Además, las plantas transgénicas son un sistema de expresión viable y muchas veces preferible para la obtención de productos farmacéuticos, ya que se ha demostrado, que tienen una gran capacidad para expresar genes provenientes de fuentes tan diversas como virus, hongos, bacterias, insectos u otras especies vegetales; asimismo son capaces de llevar a cabo modificaciones postraduccionales complejas (ej. Glicosilación) y producir concentraciones altas

de las proteínas de interés (Guerrero,2000). Por otra parte la producción de proteínas recombinantes en plantas tiene muchas ventajas potenciales para la generación de biofarmacéuticos relevantes, entre las cuales se encuentran la disponibilidad de la tecnología para la cosecha y procesamiento de plantas a gran escala, además representan una vía más económica que la utilización de sistemas industriales como los bioreactores y la fermentación, asimismo se elimina la necesidad de purificar la proteína recombinante cuando el tejido de la planta es utilizado como alimento (vacunas comestibles) (http://revistadelsur.org.uy/revista_113-114/Tapa5.html).

El predominio de la enfermedad de la Hepatitis B en países en vías de desarrollo justificó los esfuerzos iniciales por Mason *et al.* (1992) de introducir el concepto de producción de vacunas en plantas, mediante la expresión del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B en plantas de tabaco.

Las proteínas involucradas en la respuesta inmune pueden ser producidas a bajo costo y purificadas fácilmente de los extractos vegetales para ser inoculados de forma parental o mejor aún, en forma oral mediante el consumo de las partes comestibles de las plantas transformadas, reconociendo que es necesario expresar la proteína deseada en un alimento que se consuma crudo, para así evitar la desnaturalización de esta (<http://www.bact.wisc.edu> , 2002). Esto último puede estimular respuestas inmunes en los sitios de entrada de muchos patógenos, facilitando el diseño de programas de vacunación a gran escala. Asimismo se ha demostrado que la presencia de antígenos específicos en plantas que van a ser utilizados como inmunógeno oral puede provocar

reacciones inmunológicas comparables con las provocadas por las vacunas convencionales (Haq., et al., 1995).

Aunque recientemente la investigación de las vacunas comestibles está dirigida a enfermedades humanas, la tecnología también tendrá valor inmediato en la producción de vacunas comestibles de interés veterinario, logrando así un mejoramiento en la salud animal (<http://www.bact.wisc.edu>, 2000).

Por otra parte, el virus de la Enfermedad de la rabia está ampliamente distribuido en la fauna animal, tanto silvestre como domestica, causando grandes pérdidas en la industria ganadera de nuestro país ya que según la Dirección de Salud Animal produce de 15 a 20 mil muertes de ganado bovino al año.

Uno de los principales métodos de control y erradicación de la rabia es la inmunización. En México existen vacunas del virus "vivo" modificado y muerto, sin embargo aunque en general las vacunas antirrábicas son de buena calidad al salir de los laboratorios productores su conservación es difícil, especialmente por la pérdida de la cadena fría en los diferentes territorios de nuestro país.

Recientemente se han utilizado como alternativa de vacunación vectores que tienen todas las ventajas de la replicación del virus para una estimulación total de la respuesta inmune sin efectos indeseables que son asociados con vacunas de virus vivo, atenuado o muerto. Esto debido a la necesidad desesperada de obtener vacunas de bajo costo en países en vías de desarrollo. La primera vacuna de este tipo fue utilizada en los 70's en Europa. Este tipo de vacunas

designadas como SAG-1 y SAG-2 son genéticamente estables y han sido probadas, SAG-2 ha sido probada por la ruta oral. (Briggs, D.J., et. al., 2002).

De esta manera y debido a la alta incidencia de la rabia paralítica bovina (derrienge) en nuestro país, se vuelve posible y deseable elaborar una planta transgénica basada en el modelo de zanahoria que pueda ser utilizada e la inmunización contra el virus de la rabia.

4.1.1 Objetivo General

- Lograr la transformación genética de zanahoria (*Daucus carota L.*) introduciendo el gen de la proteína "G" del virus de la rabia a callos embriogénicos por medio de la técnica de biobalística.

4.1.1.1 Objetivos específicos

- Determinar la concentración óptima de kanamicina para la selección de células de zanahoria transformadas.
- Verificar la incorporación del transgen mediante pruebas de expresión transitoria y permanente.

4.2 REVISIÓN DE LITERATURA

Para la transformación de células vegetales se encuentran diversas técnicas, tales como microinyección, bombardeo con partículas, transformación con *Agrobacterium tumefaciens*, y otras que emplean al polietilenglicol y la electroporación (Kaufman, P.B., 1995).

Por mucho tiempo se creyó que este último método era únicamente aplicable a plantas dicotiledóneas, sin embargo estudios recientes han mostrado que muchas monocotiledóneas de importancia comercial pueden ser transformadas por *Agrobacterium sp.*, tales como trigo (*Triticum aestivum L.*), maíz (*Zea mays L.*), arroz (*Orizaba sativa L.*), cebada (*Hordeum vulgare L.*), y avena (*Avena sativa L.*) (Trigiano., *et al*, 2000).

Actualmente, las técnicas más utilizadas en la transformación genética son: transformación con *Agrobacterium tumefaciens*, y el bombardeo con partículas.

4.2.1 BOMBARDEO CON MICROPARTÍCULAS

Entre las técnicas para la transformación de células y tejidos vegetales intactos destaca el bombardeo de partículas, que emplea microproyectiles metálicos impulsados a altas velocidades para introducir DNA o RNA en las células vegetales (Sanford *et al.*, 1987 ;Cristou *Et al.*, 1988). El método de bombardeo fue desarrollado por el grupo del Dr. John Sanford, permitiendo introducir DNA a cualquier tipo de célula (www.hemerodigital.unam.mx/ANUIES). El primer reporte en el que se utilizó un dispositivo de bombardeo fue hecho en 1987, por Sanford *et al.* quienes introdujeron partículas de tungsteno cubiertas con RNA del Virus de Mosaico del Tabaco en células epidérmicas de cebolla (*Allium cepa*).

Este método se caracteriza por lograr la penetración física de la pared celular de la planta permitiendo la transferencia del DNA a un amplio rango de tejidos blanco, generando una gran ventaja sobre otros métodos de transformación genética. La pistola de microinyección fue diseñada para bombardear células de

plantas con DNA cubierto con microproyectiles metálicos de densidad y peso variable (oro, tungsteno, platino) (Figura 4-1). Estas partículas son cubiertas con DNA y son bombardeadas a alta velocidad a las células intactas penetrando la pared celular y depositando el DNA a las células vegetales por medio de descargas eléctricas o gases a alta presión (Morrish, 1991). Los tejidos blanco bombardeados hasta la fecha incluyen polen (Twell, 1989), callos embriogénicos (Fromm, Gordon-Kamm, Finer, Fitch, 1990), meristemos (Tomes, 1990), embriones (Taylor, 1991), hojas y células en suspensión; en todos los casos se ha empleado la expresión transitoria de un gen para demostrar que el DNA ha sido integrado a las células y a organelos en algunos casos. La integración del DNA al genoma de la planta y su transferencia a células hijas ha sido reportada para tabaco (Tomes, 1990), soya (Christou, 1989) y maíz (Fromm, Gordon, 1990, Armstrong, 1991) únicamente, por lo que se han hecho grandes esfuerzos para la optimización de este método.

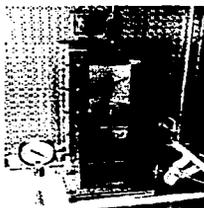


Figura 4-1. Cámara de bombardeo

4.2.2 Parámetros involucrados en la transferencia genética

4.2.2.1 Construcción del vector

Para lograr la obtención de células transformadas se requiere de un vector que asegure la producción eficiente de un gen funcional producido en las células vegetales blanco. Los vectores vegetales consisten en un cassette de expresión que contiene una región del promotor, un sitio de iniciación transcripcional, y una porción de la cadena 5' no traducida del promotor de interés junto a un Sitio Múltiple de Clonación (SMC) sintético, seguido de una señal de poliadenilación. El SMC con sitios de restricción únicos permite la inserción de secuencias codificadas de genes eucarióticos o procarióticos. Esta estructura permite la construcción de una variedad de vectores con combinaciones sencillas o múltiples de genes reporteros, los cuales permiten la detección rápida del DNA transferido, y de genes marcadores selectivos los cuales pueden ser empleados para distinguir por selección a las células transformadas (Southgate, 1995).

4.2.2.2 Genes Reporteros

La presencia del DNA en las células vegetales puede ser demostrada 24 h después de la transformación genética por medio de ensayos transitorios. Estos ensayos están basados en la expresión de genes llamados "genes reporteros" los cuales son expresados en las células sin integrarse al genoma, así pueden ser usados para demostrar la transferencia exitosa del DNA a las células. La expresión transitoria requiere de un producto que pueda ser rápida y fácilmente

monitoreado. El sistema del gen reportero de *GUS* propuesto por Jefferson *et al.* (1987) consiste en el gen *gus* que codifica para la enzima β -glucuronidasa y reacciona con el sustrato x-gluc el cual se oxida formando una coloración índigo, así las células transformadas pueden ser reconocidas por ésta coloración; siendo este sistema ampliamente utilizado en la optimización de los parámetros del bombardeo con microproyectiles (Klein 1988, Perl 1992, Charest 1993, Aragao 1993).

4.2.2.3 Promotores

Múltiples estudios han demostrado que el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor proporciona niveles constitutivos y elevados de expresión de genes en las células vegetales, por lo tanto, el promotor 35S se ha convertido en el promotor más ampliamente utilizado en estudios de transformación de plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas.

4.2.2.4 Marcadores selectivos

En la construcción de vectores para la expresión genética, ha sido empleada la introducción de marcadores selectivos a las células vegetales para recuperar aquellas líneas de células que han sido transformadas. Debido a la baja frecuencia de transformación estable comúnmente obtenida con el bombardeo de microproyectiles, son requeridas estrategias metabólicas o visuales de selección para la recopilación de las transformantes. El criterio más importante para elegir un buen marcador selectivo incluye el contemplar la aparición de escapes y no presentar efectos adversos en la regeneración y fertilidad de la

planta, dentro de los muchos marcadores empleados se encuentra el gen bacterial de la neomicina fosfotransferasa II (Armstrong, 1991) que permite la selección de células transformadas por medio de kanamicina y ha sido utilizado ampliamente en la selección de plantas dicotiledóneas (Vasil, Armstrong, 1991).

4.2.3 Parámetros que afectan la introducción del DNA en el tejido blanco

El éxito del bombardeo con microproyectiles depende de la penetración al tejido vegetal y de la transferencia del DNA con un daño mínimo a las células blanco, existen muchos parámetros que pueden ser modificados para optimizar ambos factores de riesgo dentro de los cuales se encuentran el tamaño de partícula y su densidad, cantidad de DNA distancia del tejido al plato de disparo, apertura del plato de disparo, número de bombardeos, método de precipitación del DNA, distancia y vacío, método de propulsión de partículas y densidad de partícula (Southgate, 1995) .

4.2.4 Vacunas comestibles

La función de las vacunas es preparar al sistema inmunológico para destruir rápidamente a los agentes específicos causantes de una enfermedad antes de que puedan multiplicarse en cantidad suficiente como para provocar síntomas, esto se logra enfrentando al sistema inmunitario a suspensiones de microorganismos patógenos, muertos o inactivados.

El sistema inmunológico responde a la vacuna como si fuera atacado por el antagonista movilizándose para destruir al agente extraño, de esta manera las células registran esto en su memoria y quedan alertas para defender al

organismo en el momento en que se presente nuevamente el patógeno causante de la enfermedad (Landridge, 2000).

Recientemente se han refinado los métodos de elaboración de vacunas por ingeniería genética, en éstos se insta a organismos inocuos a producir proteínas provenientes de los patógenos, las cuales ponen en marcha la respuesta inmunitaria contra el patógeno causante de la enfermedad. Este tipo de vacuna es llamada vacuna de subunidad y se aplica tanto para las enfermedades víricas como para las bacterianas (Brock, 1999).

Asimismo otro método que resulta muy interesante es la producción de vacunas en productos vegetales comestibles. Estas vacunas comestibles están en la actualidad en desarrollo por varios grupos de investigación, siendo estas muy parecidas a las de subunidades (Brock, 1999), ya que contienen únicamente a los genes que codifican para ciertos antígenos, radicando así su importancia en el hecho de evitar el uso del virus ya sea atenuado, muerto o vivo y sólo se utilizan las subunidades del mismo, lo cual también evita el cultivo del virus, disminuyendo significativamente la virulencia (Landridge,2000).

El concepto de vacunas orales en tejidos vegetales comestibles fue desarrollado por Mason *et al.*, (1992) quienes expresaron el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B en plantas de tabaco con la esperanza de encontrar posteriormente un sistema que les permitiera el desarrollo de la vacuna oral. Reportes posteriores dan cuenta de la expresión de un antígeno de la rabia en jitomate (Mac Garvey *et al.*,1995), de la obtención de plantas transgénicas de tabaco y papa que expresan los antígenos de la enterotoxina

sensible al calor de *Escherichia coli* (Haq *et al.*, 1995), de la proteína de la cápside del virus Norwalk (Mason *et al.*, 1996), de la expresión del antígeno de la subunidad B de la toxina del cólera en papa (Arakawa *et al.*, 1998), de la expresión de la glicoproteína S del virus de la gastroenteritis transmisible del cerdo en *Arabidopsis thaliana* y de la producción de plantas transgénicas de alfalfa con el antígeno de la proteína estructural VP1 del virus de la fiebre aftosa (Wigdorovitz *et al.*, 1999). Los antígenos obtenidos de esta manera han demostrado su inmunogenicidad en animales ya sea mediante el suministro de los extractos vegetales (tabaco) o de los tejidos comestibles cuando el caso lo permite (papa y alfalfa) (Guerrero, 2000)

Uno de los obstáculos a los que se enfrenta el uso de las vacunas comestibles es su posible degradación en el estómago, además de sugerir que las dosis recomendadas podrían ser de 10 a 100 veces mayores que la dosis inyectable para lograr una respuesta inmune comparable a la de las vacunas parenterales (Landridge, 2000).

Sin embargo, al cabo de varios años de investigación, la modificación genética de cultivos ha adquirido gran importancia ya que este tipo de vacunas, resultan más resistentes al calor que las vacunas comunes, por lo que pueden ser almacenadas sin recurrir a la refrigeración, evitándose así el transporte de las mismas en cadena fría, la cual muchas veces se pierde, disminuyendo así la calidad del inmunógeno (Ryan, E.J., *et al.*, 2001, Walmsley, A., *et al.*, 2000).

Actualmente ya se cuenta con antígenos contenidos en alimentos como el plátano, el maíz, trigo, soya, arroz y lechuga, así como en alfalfa para vacunas

de animales de granja. La mayoría de las vacunas se producen utilizando virus o bacterias contra las cuales se busca la protección, modificando en algunos casos virus de plantas como el virus del mosaico del tabaco con el propósito de producir antígenos de virus de mamíferos o enfermedades infecciosas. Los virus transgénicos de plantas producen rápidamente grandes cantidades de antígenos que sirven para la inmunización oral contra virus portados por mamíferos o contra bacterias patógenas (Landridge, 2000).

El uso de las plantas transgénicas como vehículos de inmunógenos comestibles permite la disminución de los costos tanto en su producción como en la administración. Otra de las ventajas en cuanto a costos es que estos se ven disminuidos al realizar vacunaciones masivas en poblaciones animales o humanas (Modelska., A., *et. al.*, 1998, Larrick, W.J., 2001).

En cuanto a la estimulación inmunológica de las vacunas comestibles basadas en plantas transgénicas se ha demostrado la producción de anticuerpos tanto a nivel de mucosas como a nivel sistémico detectándose principalmente la producción de anticuerpos IgA e IgG (Haq, A.T., *et. al.* 1995, Fiedler, U., *et. al.*, 1997, Modelska., A., *et. al.*, 1998, Ryan, E.J., *et. al.*, 2001).

Una característica importante a considerar es el hecho de que no existen casos reportados en la bibliografía en donde plantas transgénicas produzcan efectos secundarios de tipo inmunológico, tales como alergias ya sea contra componentes de las vacunas tales como conservadores o a las líneas celulares de las cuales provienen. Además de eliminar el daño neuropatológico causado

por vacunas derivadas de cerebros de ratón lactante que contienen restos de mielina (Modelska., A., *et. al.*, 1998).

4.2.5 Enfermedad del virus de la Rabia

La rabia es una infección viral aguda que ataca el sistema nervioso y provoca encefalitis en los mamíferos (<http://tusalud.com.mx>). En los animales, existe una forma paralítica de los roedores y una forma furiosa en los carnívoros. Los síntomas en el hombre pueden expresarse en las dos formas (Loza-Rubio, E., *et. al.* 1999).

El virus se encuentra usualmente presente en la saliva de los animales infectados y generalmente es transmitida por la mordedura de estos aunque no necesariamente, ya que basta que exista una solución de continuidad en la piel que entre en contacto con la saliva del animal rabioso para la inoculación (Smith, J., *et. al.*, 1991).

El perro es el principal reservorio y transmisor del virus en el ciclo urbano en México y en el resto de América Latina, el reservorio silvestre principal en Latinoamérica es el murciélago hematófago *Desmodus rotundus*, quien transmite la rabia paralítica bovina ocasionando grandes pérdidas económicas para la ganadería (www.ejournal.unam.mx ;1999).

La velocidad con la que se manifiestan los signos y síntomas de la rabia depende de las características biológicas de la cepa del virus que infecta, de la concentración de receptores para el virus en las células nerviosas del músculo

esquelético, de la magnitud del inóculo, de la invasión nerviosa en el sitio de entrada y de la proximidad de la lesión al Sistema Nervioso Central (SNC).

Al ser inoculado el virus por vía subcutánea o intramuscular, en éste caso la mordedura, se propaga del lugar de inoculación al sistema nervioso central por el axoplasma de los nervios periféricos. La distribución del virus no es uniforme y la frecuencia de la infección de diferentes órganos es variable, aunque siempre que se aísla el virus de las glándulas salivales, se le encontrará en el sistema nervioso central.

El periodo de incubación es muy variable y depende de la naturaleza del virus, de la cantidad de virus que se inoculó y del sitio anatómico donde ocurrió la agresión, entre otras cosas. Las primeras manifestaciones generalmente ocurren de uno a tres meses después de la agresión.

(<http://www.facmed.unam.mx>).

4.2.6 Virus de la Rabia

El virus de la rabia pertenece al orden Mononegavirales y a la familia Rhabdoviridae que son virus infectantes de animales vertebrados e invertebrados. Dentro de la familia, los géneros más estudiados son el Vesiculovirus representado por el virus de la estomatitis vesicular (VSV) y el Lyssavirus, compuesto por los virus de la rabia. La nomenclatura actual reconoce a todos los miembros del género Lyssavirus como virus de la rabia, ya que todos producen en los mamíferos una encefalomielitis aguda. Una de las características únicas de los genomas de ARN de cadena negativa de un

rhabdovirus es que esto sirve como una plantilla tanto para la transcripción (síntesis de ARNm) como para la replicación (síntesis del genoma ARN). (Banerjee, A.K., 1987, Nicholson, G.K., 2000, Wunner, W., 1988).

4.2.7 Composición molecular y clasificación

Las dimensiones del virión son 75 nm de diámetro y un largo que varía entre 130 nm (mediana: 180nm), la envoltura viral está tapizada de espículas de 9 nm de longitud, con forma típica de bala (Figura 4-2) (www.pasteur.fr).



Figura 4-2. Virus de la rabia en forma de revólver (coloreado artificialmente)

El virus está envuelto por una bicapa lipídica (membrana o envoltura), cuya composición es semejante a la de la membrana neuronal. En la membrana está insertada la glicoproteína denominada G. Hacia el interior esta la proteína de matriz o M, la nucleocápside constituida por tres proteínas (N, P y L) y el ácido nucleico que es un RNA de cadena sencilla y de polaridad negativa (Figura 4-3) (www.facmed.unam.mx).

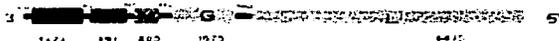
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Figura 4-3. Composición molecular del virus de la rabia

La información genética del virus está contenida en 11,932 nucleótidos determinados en la cepa PV del virus de la rabia. La posición de los genes en el RNA de cadena negativa es N, P, M, G y L en sentido 3' a 5', según se muestra en la figura 5.4 (www.facmed.unam.mx).



12 kilobases

Figura 4-4. Información genética del virus de la rabia

La glicoproteína G está inserta en la membrana lipídica del virus y es responsable de la inducción de los anticuerpos neutralizantes y de la estimulación de los linfocitos T cooperadores y citotóxicos del hospedero (Wunner, W., 1988). Esta glicoproteína forma puntas triméricas en la superficie de la partícula viral y forma en el virus, tanto los principales determinantes antigénicos como las principales moléculas capaces de unirse al receptor. La proteína G sufre un cambio de adaptación a un pH levemente ácido ($\text{pH} < 6.0$).

lo que le permite estabilizar al trómero y exponer un dominio hidrofóbico que puede insertar en la membrana celular y dar lugar a la fusión con la membrana (<http://facmed.unam.mx>).

Esta proteína se ha expresado tanto en plantas transgénicas de jitomate (Kaufman P.B.1995) como de tabaco (Yusivov, V., et al., 1997) y espinaca siendo utilizadas como inmunógeno en animales de laboratorio produciendo buenos índices de neutralización. Por lo que si éstas se expresan en plantas transgénicas, resultará una vacuna oral muy apreciada, además de todas las ventajas que puede ofrecer la inmunización oral como mayor facilidad de aplicación, estabilidad y la modificación post-traducciona de proteínas eucariontes entre otras.

La nucleoproteína N (450 aminoácidos), está ligada al ARN viral y es la proteína con la más alta conservación en la secuencia de aminoácidos. Se ha demostrado experimentalmente que el ARN ligado a la nucleoproteína es resistente a la acción de las RNAasas durante la transcripción *in vitro*. La fosfoproteína G de 297 aminoácidos está asociada a la nucleoproteína e interactúa con la transcriptasa inversa siendo responsable de la transcripción y la replicación del ARN; por lo que parece actuar como una proteína reguladora de esta etapa. Otra de las actividades relacionadas es la polimerización de los nucleótidos. Es termolábil y altamente reactiva a los sulfhidrilos. La proteína L (2142 aminoácidos) es la responsable de la transcripción y de la replicación del ARN viral. Esta proteína está codificada por un gen que consta de 6380 nucleótidos, y además es una proteína de las subunidades del complejo de la

ARN polimerasa, la proteína por si misma actúa como polimerasa. Estas tres proteínas (N, G, L) asociadas al ARN viral constituyen la "nucleocápside". La proteína M (202 aminoácidos), se localiza sobre la cara interna de la envoltura lipídica, es una proteína estructural. Su peso molecular es de 26 kDa (Banerjee, A.K., 1987, Tordo, N., et. al. 1996, Wunner, W., 1988).

4.2.7 Epidemiología y patogenia

La rabia animal está presente en todos los continentes y en lo que respecta a la rabia humana, la Organización Mundial de la Salud (OMS) indica que en 1992, más de 36.000 personas murieron por esta causa.

El principal modo de contaminación es la mordedura de un animal rabioso y en un grado menor los arañazos y el lamido. Aunque se han observado casos de contaminación por aerosoles o por trasplante de córnea (Banerjee, A.K., 1987).

El perro es el principal vector y reservorio de la rabia urbana en el mundo, la infección se transmite de un perro a otro y éste al hombre y a los demás animales domésticos.

La vía nerviosa es el modo de transporte viral, del punto de inoculación al sitio preferencial de replicación en el sistema nervioso. Contrariamente a los virus transportados por vía sanguínea (viremia), el virus rábico es transportado por vía nerviosa, es decir que toma prestado el sistema de transporte de su célula blanco (la neurona) para progresar de la periferia (sitio de inoculación) hacia los centros nerviosos, haciendo intervenir a los microtúbulos de la célula (Banerjee, A.K., 1987).

A pesar del desenlace mortal de la enfermedad, la rabia en ciudades y poblados se mantiene debido a la gran proporción de perros susceptibles. La gran densidad de perros y su alta tasa de reproducción anual, son factores importantes en las epizootias de rabia canina. La rabia silvestre, se mantiene en la naturaleza en forma similar a la urbana, por la presencia de una o dos especies de mamíferos en un ecosistema determinado, en especial carnívoros y quirópteros, los cuales pueden agredir directamente al hombre o de manera indirecta contaminando a los animales domésticos. En toda América Latina al lado del perro, que continua siendo el principal vector, el murciélago hematófago es a menudo origen de la enfermedad llamada rabia paralítica.

(www.pasteur.fr).

La rabia paralítica es transmitida por murciélagos hematófagos, este murciélago se alimenta exclusivamente de sangre, tanto de animales domésticos como silvestres. Tanto el murciélago rabioso como el no infectado, atacan de noche a varios animales por lo que si el murciélago empieza a excretar el virus rábico en la saliva, antes de presentar los signos clínicos de enfermedad ya es un transmisor eficiente de la rabia paralítica, por lo que los murciélagos insectívoros pueden igualmente ser fuente de contaminación en diferentes regiones del mundo.

4.2.8 Diagnóstico

Una vez efectuada la mordedura, el período de incubación es largo, con fluctuaciones entre 25 y más de 150 días, los síntomas predominantes son del

tipo paralítico, por ello, se denomina a la enfermedad como rabia bovina paresiante o paralítica. Los animales afectados presentan algunos síntomas como aislamiento del grupo, pupilas dilatadas y el pelo erizado, somnolencia, depresión, movimientos anormales de las extremidades posteriores, lagrimeo y secreción nasal, temblores musculares, inquietud, priapismo e hipersensibilidad en el lugar de la mordedura del murciélago, de modo que los animales se rascan hasta provocarse ulceraciones. Al avanzar la enfermedad, se observan incoordinación muscular, y contracciones tonicoclónicas de grupos musculares del cuello, tronco y extremidades. Los animales tienen dificultad en la deglución, dejan de rumiar, por último caen y no se levantan más, hasta la muerte, presentando una baba amarillenta y espumosa. Los signos paralíticos, suelen presentarse entre el segundo y tercer día, después de iniciados los síntomas. La duración de la enfermedad, abarca desde 2 a 3 días hasta 8 a 10 días (www.oie.org).

El diagnóstico de laboratorio se puede hacer en muestras *antemortem* cuando se trata de seres humanos y *postmortem* en muestras de seres humanos y animales. La única muestra *postmortem* aceptada para diagnóstico de rabia es una porción de 10 a 20 g de cerebelo, de 1 a 3 gramos de hipocampo o 5 a 10 g de medula espinal. Si es posible se envía el cerebelo y encéfalo completos y secciones de medula. Estas regiones anatómicas son las más comúnmente utilizadas. Las muestras *antemortem* incluyen biopsia de cuero cabelludo (BCC), impronta de córnea, saliva, suero y líquido cefalorraquídeo (LCR). Para

aumentar la probabilidad de éxito en el diagnóstico, las muestras se deben tomar de 7 a 14 días de iniciados los signos neurológicos.

La técnica de rutina para el diagnóstico de rabia es la inmunofluorescencia directa o (IFD), aunque existen otras técnicas auxiliares tales como la determinación en suero o LCR, de anticuerpos antiglicoproteína por ELISA o por la técnica de inhibición de focos fluorescentes en cultivos celular.

4.2.9 Prevención

No hay tratamiento médico eficaz, solo el aislamiento de los animales sospechados y confirmación postmortem a partir de la necropsia que debe ser realizada por un profesional veterinario con la posterior remisión de muestras de tejido nervioso y la denuncia del caso a la entidad sanitaria correspondiente (www.viarural.com.ar, 2002). El control de las poblaciones y la vacunación parenteral y oral de reservorios silvestres y domésticos es hasta ahora el mejor tipo de prevención, así como los programas efectivos de difusión para la salud. En vista de la importancia que han recibido recientemente algunos reservorios silvestres como los murciélagos insectívoros y frugívoros así como los zorros y zorrillos es importante considerar otros mecanismos para el control que no interfieran con la organización de las especies animales dentro de las cadenas alimenticias ni con su hábitat, pero que permitan educar a las personas para evitar posibles contagios con estos tipos de animales infectados.

4.2.10 Tratamiento.

El tratamiento post-exposición comienza por el tratamiento no específico: limpieza, curación de las heridas, antibioterapia y profilaxis antitetánica. El tratamiento específico comprende la vacunación y la seroterapia antirrábicas.

La mayoría de las vacunas antirrábicas utilizadas en el mundo todavía son producidas a partir de encéfalos de animales adultos o recién nacidos, tipos Semple o Fuenzalida que aunque han sufrido numerosas mejoras, han producido accidentes neuroinmunológicos ligados a la presencia de mielina; por lo que las vacunas producidas en cultivo de células han tendido a reemplazarlas ya que son más inmunogénicas y mejor toleradas, con estas últimas, la vacunación antirrábica puede hacerse según dos protocolos probados de tratamiento por vía intramuscular: uno en 5 inyecciones practicadas los D0 (1er. día de infección), D3 (3er. día de infección), D7 (7mo. día de infección), D14 (14avo. día de infección) y D28 (28avo. día de infección), y el otro, simplificado en 4 inyecciones, 2 practicadas el D0 en dos puntos diferentes, 1 el D7 y D21. (Nicholson, G.K., 2000).

4.2.11 Vacunación contra la rabia

Las vacunas de la rabia humana tienen su historia con el primer tratamiento del antirrábico desarrollado por Pasteur, Roux y sus colegas en 1885 (<http://www.drscope.com>). No fue hasta 1900 que se realizó la primera vacuna inactivada para rabia, la cual contenía fenol sin embargo esta vacuna fue

descontinuada por la por contener residuos del virus vivo o atenuado; a pesar de esto la vacuna tipo Semple se sigue utilizando en países en vías de desarrollo (<http://www.drscope.com>).

La presencia de mielina del tejido nervioso ha provocado severas reacciones neuromusculares incluso la muerte en algunos individuos, por lo anterior Fuenzalida y Palacios en 1955 desarrollaron una vacuna antirrábica en ratones lactantes inoculando el virus intracerebralmente y cosechado posteriormente a los 9 días de edad. Este tipo de vacunas son las usadas comúnmente en países de Latinoamérica incluyendo nuestro país. En el 2001 la O.M.S. emitió un dictamen según el cual para el año 2006 no se deberán usar vacunas obtenidas de tejido nervioso.

A estas vacunas le ha seguido muchas otras cuyo principal objetivo ha sido disminuir el efecto neuromuscular causado por residuos de mielina. En 1975 se utilizó una vacuna de embrión de pato produciendo pocas reacciones adversas, sin embargo se presentaron 21 casos neuropatológicos. La primera vacuna en cultivo celular fue introducida en 1975 realizada en células diploides humanas, esta vacuna produjo severos casos de reacciones alérgicas (<http://www.drscope.com>)

Por otra parte la vacunación para animales se ha utilizado diferentes tipos de vacunas. En 1948 se diseñó una vacuna realizada en huevos de pollo embrionado, realizando pases del virus hasta 136 veces. La vacuna producida de los pases 40-50 (pase bajo) fue efectiva en perros ocasionalmente causando rabia en cachorros.

Posterior a esta vacuna se desarrollo una de virus "vivo" modificado, obtenido de una cepa de células de hígado de cerdo y que fue adaptada a hígado de hámster. Para realizar este tipo de vacunas regularmente se utilizan las cepas ERA, CEO, SAD en Asia, África y Europa y han sido adaptadas para la inmunización oral.

Las vacunas de virus inactivados requieren que el virus de la rabia se produzca en alta concentración. Esto es acompañado inicialmente por el crecimiento del virus en tejido cerebral de conejos, células BHK, células CEO, células Vero u otros sustratos. Se han utilizado varios métodos para inactivar las vacunas antirrábicas. Estos incluyen la luz ultravioleta, acetilenoetilenimina y otras aminos. Estas vacunas pueden contener algún adyuvante (p. ej. saponina) para potenciar la respuesta inmune (<http://www.drscope.com>).

4.2.12 Rabia Paralítica Bovina en México

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



La Rabia Paralítica Bovina o Derriengue, transmitida por la mordedura de murciélagos hematófagos (*Desmondus rotundus*), se caracteriza por ser aguda y mortal trayendo como consecuencia pérdidas en la producción bovina, además de ser un grave problema de salud pública. En 1999, las acciones emprendidas redujeron la presencia de focos de la enfermedad hasta en un 25 %, con relación a 1998; manteniendo el esquema de vigilancia epidemiológica en los estados libres y la notificación de casos en las zonas de riesgo, para la aplicación oportuna de medidas contraepizooticas y el control de brotes de la enfermedad. En los estados de Aguascalientes, Baja California, Baja California Sur, Coahuila, Distrito Federal, Nuevo León y Tlaxcala, no existen murciélagos hematófagos, por lo tanto están libres de esta enfermedad (www.sagarpa.qob.mx, 2000). En éste año en tabasco se realizaron 282 operativos demostrativos sobre la captura de murciélagos hematófagos, principal vector de la rabia paralítica bovina en

corrales y refugios y se aplicaron 204 mil 745 dosis de vacuna (www.sedafoq.gob.mx, 2002).

4.2.13 Importancia Económica

Debido a la importancia de los murciélagos en la transmisión de la rabia a los animales y en algunos casos al hombre, es importante el control selectivo para no afectar a otros murciélagos benéficos para los ecosistemas (www.mexicogadero.com, 2003). La rabia paralítica ocasiona la muerte de un gran número de animales domésticos y silvestres, en virtud de que todo animal mordido por un murciélago rabioso, desarrollan la enfermedad, la cual concluye con la muerte.

La constante alimentación del murciélago ocasiona la muerte por anemias severas, principalmente en becerros jóvenes, así como la muerte de aves por hemorragias profusas. Los tratamientos vacunales a personas expuestas por mordeduras de murciélagos, resulta por demás importante, entre otras causas de perdidas económicas (www.chp.sagarpa.gob.mx , 2001)

4.3 HIPÓTESIS

Se llevará a cabo la integración del plásmido que contiene el gen que codifica para la proteína "G" del virus de la rabia en zanahoria por el método de biobalística, la cual se confirmará por medio de una prueba de expresión transitoria y permanente realizada a los callos embriogénicos de zanahoria bombardeados y a las plantas regeneradas obtenidas.

4.4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.4.1 Materiales biológicos

- El plásmido pUC-pSS/pWR-21 que porta el cDNA de la glicoproteína "G", así como el plásmido pBI-121 que porta el gen de la neomicina fosfotransferasa y β -glucuronidasa, fueron proporcionados por el Dr. Miguel Ángel Gómez Lim del Laboratorio de Plantas Tropicales y Salud Humana del Departamento de Ingeniería Genética del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Irapuato.
- Callos embrionícos de zanahoria de 8 a 9 semanas de edad provenientes de los explantes tallo y peciolo.

4.4.2 Curva de tolerancia de callos embrionícos de zanahoria al antibiótico kanamicina.

Se inocularon 0.5 g de callo proveniente del medio Myt en frascos de vidrio que contienen 30 ml del mismo medio adicionado con kanamicina, en concentraciones de 0, 25, 50 y 75 mg.l⁻¹

De cada tratamiento se hicieron 5 repeticiones, para las cuales se registró el peso fresco cada tercer día durante tres semanas para determinar la concentración en la cual el crecimiento es significativamente menor, para posteriormente seleccionar las células transformadas después del bombardeo.

4.4.3 Construcción del plásmido.

- I. Una vez que se obtuvieron los plásmidos purificados requeridos para la construcción del plásmido pBI-121/pwR21, se adicionaron las enzimas y el buffer necesarios para realizar la digestión correspondiente al análisis de restricción, del cual se realizó un gel de agarosa al 0.8% para observar las bandas de los fragmentos a ligar.
- II. Posteriormente se procedió a purificar el DNA contenido en las bandas del gel por medio de un **Gene-Clean** (GFX PCR-DNA kit de purificación de bandas de gel, Amershan Biosciences® 27-9602-01):

El peso máximo de la porción de gel que puede ser procesada con el protocolo siguiente es de 300 mg; la columna puede contener un volumen máximo de 600µl.

- A. Se pesó un tubo de microcentrifuga vacío de 1.5 ml y se registró el peso.
- B. Se utilizó una navaja para cortar la porción de agarosa que contiene la banda de DNA que va ser purificada, procurando obtener pequeñas piezas, las cuales se transfirieron al tubo de microcentrifuga previamente pesado.
- C. Se pesó el tubo que contiene la agarosa y se restó el peso del tubo vacío para determinar el peso de la porción del gel.

- D. Se adicionó 10 μ l de buffer de captura por cada 10 mg de la porción del gel (la capacidad máxima de la columna es 300 μ l del buffer de captura adicionados a 300 mg de la porción del gel).
- E. Se cerró el tubo y se agitó vigorosamente en un vórtex. Incubándose a 60°C hasta lograrse la disolución de agarosa (15 minutos).
- F. Durante la incubación, se colocó una columna en un tubo colector para cada purificación que se llevó a cabo.
- G. Después de que la agarosa fue completamente disuelta, se centrifugó para colectar la muestra en el fondo del tubo.
- H. Posteriormente se transfirió la muestra a la columna y se incubó a temperatura ambiente por un minuto.
- I. Se centrifugó en microcentrífuga por 30 segundos.
- J. Se desechó el líquido vaciando el tubo colector y se colocó la columna de nuevo en el tubo colector.
- K. Se adicionó 500 μ l del buffer de lavado a la columna .y se centrifugó 30 segundos.
- L. Se desechó el tubo colector y se transfirió la columna a un tubo eppendorf nuevo de 1.5 ml.
- M. Se aplicó 50 μ l de buffer de elusión (agua desionizada estéril).
- N. Para eluir el DNA en forma más concentrada se redujo el volumen de elusión a 15 μ l.
- O. Se incubó la muestra a temperatura ambiente por 1 minuto.
- P. Se centrifugó por un minuto para recuperar el DNA purificado.

- III. Una vez purificado, se hizo la **ligación** de los fragmentos que contienen al promotor de la nopalina sintetasa, al gen *nptII* que confiere resistencia a kanamicina, terminador de la nopalina sintetasa, promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor la glicoproteína "G" del virus de la rabia cepa pWR-21, al gen *gus* que codifica para la enzima β -glucoronidasa y al terminador de la nopalina sintetasa.
- IV. Posterior a la ligación se hizo la diálisis de DNA eliminando las sales remanentes para disminuir la conducción y así reducir el shock durante la **electroporación** como se indica a continuación:
- o Se enjuaga una caja petri con agua estéril, luego se llena con agua desionizada y se coloca una membrana de diálisis millipore® de 0.25 μ m con 5 μ l de la ligación.
 - o Se deja dializar por 20 minutos.
- V. Preparación de células competentes
1. Se inocularon 5 ml de *E. coli* DH5 α en medio YENB (2 tubos).
 2. Al día siguiente se vertieron 5 ml a un matraz con 250 ml de YENB y se incubó a 37°C por 3 horas hasta alcanzar una densidad D.O₆₀₀= 1.
 3. Se enfrió 15 minutos en hielo.
 4. Se vertió a botellas de 250 ml y se centrifugó a 4000 rpm en rotor GSA por 15 minutos.
 5. La pastilla se resuspendió en 50 ml de agua desionizada estéril.

6. Se centrifugó como en el paso 4 y se repitió el paso 5 y 6.
7. Se resuspendió en 20 ml de glicerol helado estéril al 10%.
8. Se centrifugó como en 4.
9. Se resuspendió la pastilla en 750 μ l de glicerol helado estéril al 10%.
10. Se tomó una alícuota de 40 μ l y se congeló en nitrógeno líquido.
Guardándose a -70°C .

VI. Electroporación de células competentes con E. coli DHS α :

- A. Se agregó el DNA dializado a 40 μ l de células competentes y se colocó en hielo.
- B. Se agitó suavemente en vórtex.
- C. En cada tubo que contiene las células competentes se adicionó la cantidad correspondiente de DNA y se traspasó la mezcla células-DNA a cada una de las celdas (en campana de flujo laminar).
- D. Se colocaron las cubetas de 1mm de GAP en el electroporador Booster y se procedió a electroporar en las siguientes condiciones: alto voltaje =2.5 kv , R= 129 Ω y un voltaje carga de 1.3-1.5 kv.
- E. Se adicionó a cada celda 500 μ l de medio SOC pasándose todo el contenido de las celdas a un tubo eppendorf nuevo.
- F. Después de la recuperación se dio un pulso en la centrifuga para bajar la pastilla que contiene a las células transformadas.

- G. Se decanta la mayor parte del sobrenadante y se resuspendió en aproximadamente 100µl del mismo.
- H. En una placa con x-gal y en otra con x-gal + kanamicina, se colocaron 50µl de células para cada una.
- I. A la par se preparó un control positivo que contenía células y el plásmido pBI-121; y un control negativo que únicamente contiene células.
- J. Se incubó a 37°C hasta el día siguiente.
- VII. Una vez que se obtuvieron las clonas transformadas que contenían al plásmido pBI-121/PWR-21 (las colonias blancas) se procedió a realizar una **MINIPREPARACIÓN** para corroborar la clonación del gen de la glicoproteína "G" del virus de la rabia con el plásmido pBI-121/PWR-21.
1. Crecer un cultivo de 2 ml toda la noche en medio LB con kanamicina.
 2. Pasar el cultivo a un tubo eppendorf y centrifugar 30 seg.
 3. Decantar el sobrenadante dejando aproximadamente 50 µL de medio.
 4. Resuspender completamente el paquete celular
 5. Agregar 300 µL de TENS, mezclar suavemente, e incubar por 5 min a temperatura ambiente. (1ml de TENS contiene : 25 µL de SDS al 20 %, 10 ml de NaOH 10 N y 965 µL de H₂O).
 6. Pasar los tubos al hielo y agregar 250 µL de NH₄Oac 7 M estéril.
 7. Incubar en hielo por 5 min.
 8. Centrifugar por 5 min a temperatura ambiente.

9. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
10. Agregar 330 μ L de isopropanol e incubar a temperatura ambiente por 10 min.
11. Centrifugar por 5 minutos a temperatura ambiente
12. Decantar el sobrenadante y agregar 700 μ L de etanol al 70 % a temperatura ambiente.
13. Agitar brevemente y centrifugar 2 min.
14. Decantar el sobrenadante y centrifugar 5 segundos.
15. Aspirar las últimas gotas de etanol al 70 % con una punta amarilla de 200 μ L o pipeta Pasteur, tomar todo el líquido procurando no tocar la pastilla.
16. Secar sobre la mesa 10 minutos.
17. Agregar 50 μ L de agua desionizada estéril.
18. Realizar un análisis de restricción del DNA obtenido con las enzimas Xba y Xho apropiadas y llevar a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

VIII. Al cabo de haber verificado la presencia del inserto de la glicoproteína "G", se realizó una **MAXIPREPARACIÓN**, procedimiento que permitió la purificación del plásmido de interés de la siguiente manera:

1. Crecer un cultivo toda la noche en medio ETB a 37 °C.
2. Pasar los cultivos a botellas y centrifugar a 5000 rpm por 10 min. en rotor GSA.

3. Decantar el sobrenadante añadiendo a cada paquete celular 5 ml de solución Birnboim I (ver anexo).
4. Resuspender con pipeta Pasteur.
5. Agregar 10 ml de solución Birnboim II (ver anexo), preparada en el momento con NaOH 0.2 N y SDS al 1 %
6. Agitar suavemente y dejar reposar 3 minutos.
7. Añadir 7.5 ml de solución Birnboim III (ver anexo) y agitar suavemente.
8. Incubar durante 30 min en hielo.
9. Centrifugar en rotor GSA a 5000 rpm por 10 minutos.
10. Filtrar el sobrenadante transfiriendo a un tubo de 50 ml.
11. Agregar 0.6 vol. de isopropanol helado (- 20 °C).
12. Agitar y dejar precipitando a temperatura ambiente por 10 min.
13. Centrifugar a 10,000 rpm por 10 min en un rotor SS34.
14. Decantar el sobrenadante.
15. Resuspender la pastilla en 3 ml de H₂O estéril y añadir 3ml de LiCl 5 M helado, centrifugar a 10,000 rpm, durante 10 min en rotor SS34
16. Pasar el sobrenadante a un tubo corex de 50 ml y añadir 6 ml de isopropanol helado, centrifugar a 10,000 rpm, durante 10 min en rotor SS34
17. Resuspender el pellet en 500 µL de agua estéril añadiendo 10 µL de Rnasa (20 mg/ ml).
18. Transferir el DNA a un tubo eppendorf e incubar con la RNasa durante 30 min a temperatura ambiente.

19. Añadir 500 μL de una mezcla que contiene 320 μL de NaCl 5M, 25 μL de PEG al 40% y 355 μL de agua estéril.
20. Agitar suavemente y centrifugar a 12,000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente.
21. Resuspender la pastilla en 400 μL de solución amortiguadora TE o agua desionizada estéril.
 - 21.1 Tratamiento de la pastilla con fenol:
 - Añadir 400 μL de fenol, agitar brevemente y centrifugar durante 2 min.
 - Recuperar la fase acuosa y añadir 400 μL de fenol-cloroformo 1:1(v/v) agitar y centrifugar nuevamente por 2 minutos.
 - Recuperar la fase acuosa y añadir 400 μL de cloroformo-alcohol isoamílico 49:1 (v/v). Agitar y centrifugar por 2 minutos.
 22. Recuperar la fase acuosa y precipitar con 100 μL de acetato de amonio 10 M y 1 ml de etanol absoluto helado.
 23. Dejar reposar la solución a temperatura ambiente por 10 min y centrifugar por 5 min. Lavar la pastilla con 200 μL de etanol al 70% helado.
 24. Resuspender con 100 μL de agua desionizada estéril.

IX. Cuantificación del DNA plasmídico

Una vez obtenido el plásmido puro, (sin contaminantes como proteínas, fenol, agarosa u otro ácido nucleico), se realizó una medición espectrofotométrica de la cantidad de radiación ultravioleta absorbida por las bases, a una longitud de

onda de 260 y 280 nm. La lectura a 260 nm permitió realizar el cálculo de la concentración de DNA en la muestra. Una D.O. de 1.0 corresponde a 50 µg/ml aproximadamente para DNA de doble cadena. Preparaciones puras de DNA poseen valores del coeficiente $D.O._{260}/D.O._{280}$ de 1.8 a 2.0.

Si la cantidad de DNA en la muestra es muy pequeña o contiene cantidades significativas de impurezas, puede estimarse la cantidad de DNA por la intensidad de fluorescencia emitida con bromuro de etidio, ya que éste se intercala en las moléculas de DNA, siendo proporcional la cantidad de fluorescencia a la cantidad de DNA, y así puede ser visiblemente calculada (Guerrero, 2000).

X. Preparación de partículas de tungsteno

Una vez purificado y cuantificado el DNA, se procedió a preparar los microproyectiles para el bombardeo de callos embriogénicos de acuerdo a la siguiente metodología:

1. Pesar 60 mg de partículas de tungsteno de 0.4 µm de diámetro (M5) y colocarlas en un tubo de centrifuga de 15 ml.
2. Agregar 2 ml de HNO_3 0.1 M y sonicar en hielo 20 minutos.
3. Eliminar el HNO_3 , agregar 1 ml de agua desionizada estéril, transferir la muestra a un tubo de 2 ml y sonicar brevemente.
4. Centrifugar las micropartículas 30 segundos a 10,000 rpm.
5. Eliminar el agua, agregar 1 ml de etanol absoluto (100%) y sonicar brevemente.
6. Centrifugar las micropartículas de 30 segundos a 10,000 rpm.

7. Eliminar el etanol, agregar 1 ml de agua desionizada estéril y sonicar brevemente.
8. Colocar 200 μ L de la suspensión en tubos eppendorf.
9. Agregar 750 μ L de agua desionizada estéril a cada tubo.
10. Almacenar los tubos a -20°C .

XI. Precipitación de partículas con DNA

1. Tomar 50 μ L de partículas de tungsteno
2. Agregar 1.2 μ L de pBI-121*
3. Agregar 3.8 μ L de pUC-pSS/pWR-21*
4. Agregar 50 μ L de CaCl_2
5. Agregar 20 μ L de espermidina.
6. Agitar con vórtex brevemente.
7. Centrifugar 10 segundos a 10, 000 rpm.
8. Eliminar 100 μ L del sobrenadante
9. Resuspender las partículas en el líquido remanente.
10. Tomar de 4 a 5 μ L de las micropartículas cubiertas con el DNA en el filtro del bombardeador para cada disparo.

* Agitar suavemente en cada paso.

4.4.4 Bombardeo con micropartículas de tungsteno con pistola de baja presión (Bond et al., 1992)

La transformación del callo se llevó a cabo tanto con el DNA del plásmido pBI-121/pWR-21, como con los plásmidos pUC-pSS y pBI-121 por separado para efectuar el cobombardeo.

- i. La noche anterior al bombardeo y cobombardeo se colocaron aproximadamente 0.5 g de callo de cada explante (tallo y peciolo) de forma extendida en el centro de cajas de Petri de 60 x 15 mm con 15 ml de medio Myt*, pero gelificados con 3.0 gl^{-1} de gellan.
- ii. Para llevar acabo el bombardeo y cobombardeo fue necesario acoplar las partículas de tungsteno al DNA plasmídico, Para llevar a cabo el cobombardeo se colocaron los plásmidos en relación 9:1 agregándolos en las siguientes cantidades: 4.5 μL ($1\mu g/\mu L$) del plásmido pUC-pSS/pWR-21 + 0.5 μL ($1\mu g/\mu L$) del plásmido pBI-121. Posteriormente, se centrifugaron a 10,000 rpm durante 5 segundos, se retiran 100 μL del sobrenadante quedando un volumen de 25 μL de los cuales se tomaron 5 μL que son colocados en el centro del filtro del bombardeador.
- iii. La transformación se llevó a cabo con una presión de helio de 120 psi a una distancia de 13 cm entre el filtro y el tejido blanco, en un vacío de 20-22 in Hg.
- iv. El bombardeo con el plásmido pBI-121/pWR-21 ($1\mu g/\mu L$) se realizó en 50 cajas petri con 0.5 g de callo embrigénico cada una, mientras que para el cobombardeo se realizaron 80 disparos en cajas petri con la misma cantidad de callo.
- v. Una vez bombardeados los callos, se sellaron las cajas y se mantuvieron en incubación a $25 \pm 2^{\circ}C$ con fotoperíodo de 16 hr luz / 8hr oscuridad.

- vi. Una semana después del bombardeo los callos se transfirieron a medio de proliferación Myt (ver anexo) adicionado con 50 mg. L⁻¹ de kanamicina para la selección de las células transformadas.

4.4.5 Expresión transitoria

Se seleccionaron unos cuantos callos al azar al cabo de tres días posteriores al bombardeo para medir la expresión transitoria de *gus* con la finalidad de verificar si el DNA plasmídico se había integrado a las células del callo, para lo cual se siguió la siguiente metodología:

- i. Se colocaron los callos bombardeados en la solución x-gluc (ver anexo) y se incubó a 37°C de 12-16 horas.
- ii. Se desechó la solución y se lavó dos veces con buffer "z" (ver anexo) pH 7.4.
- iii. Posteriormente se lavó con etanol al 70% cuatro veces.
- iv. Para eliminar la clorofila se lavó con una mezcla de metanol-acetona (1:3) lavando el tiempo necesario, haciendo varios cambios de la mezcla.
- v. Después de observar el color azul producto de la reacción, el tejido se lavó cuatro veces con buffer "z".
- vi. Los tejidos fueron conservados cubriendo los callos con glicerol al 50% y almacenados a 4°C.

Al ocurrir la reacción de la enzima β -gus sobre el sustrato x-gluc se formó un producto que al oxidarse produjo un precipitado de color azul, identificando así a las células transformadas por dicha coloración.

4.4.6 Proliferación y germinación de callos embriogénicos transformados

La proliferación y maduración de callos embriogénicos transformados se realizó bajo las mismas condiciones ya establecidas para los callos embriogénicos de zanahoria no transformados, realizando subcultivos en el medio Myt con kanamicina a razón de 50 mg.L⁻¹. La germinación de éstos tuvo lugar efectuando los subcultivos necesarios en medio MS sin hormonas (Murashige y Skoog, 1962) con kanamicina a la concentración antes mencionada para seleccionar a aquellos callos que hayan sido transformados.

4.4.7 Obtención de plántulas

Se obtuvieron pequeñas plántulas a partir de los callos embriogénicos bombardeados, las cuales se individualizaron y se subcultivaron en el medio MS sin hormonas (Murashige y Skoog, 1962) con kanamicina y posteriormente en medio MS sin hormonas eliminando el agente de selección; al alcanzar la talla establecida (8-10 cm) fueron transferidas a una mezcla estéril de tierra con hojarasca (2:1) y mantenidas en condiciones de invernadero, logrando así la obtención de plantas completas de zanahoria transformadas.

4.4.8 Expresión permanente

Una vez obtenidas las plantas bombardeadas con pBI-121/pWR-21 y cobombardeadas con pUC-pSS/pWR-21 y pBI-121, se procedió a realizar la prueba de expresión de *gus* después de 5 meses realizada la transformación por

biobalística con la finalidad de verificar la obtención de plantas transgénicas de zanahoria. Ya que de esta forma se corroboró la inserción y expresión del gen que codifica para la glicoproteína "G" del virus de la rabia en las plantas de zanahoria provenientes de callos bombardeados con el plásmido pBI-121/pWR-21.

4.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

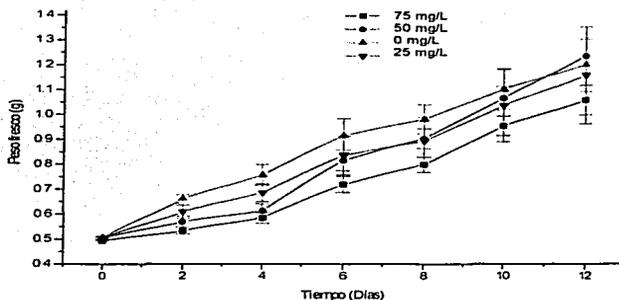
4.5.1 Curva de tolerancia de callos embriogénicos al antibiótico kanamicina

La resistencia a distintos antibióticos ha sido de gran importancia para la recuperación de plantas transformadas, es por ello que la construcción del plásmido pB1121/pwR21, además de codificar para la β -gus, lleva incorporada la secuencia del gen de la neomicina fosfotransferasa II, la cual confiere resistencia al antibiótico kanamicina. De manera que la resistencia se convierte en un agente que permite seleccionar metabólicamente las células transformadas de las que no lo han sido.

Se analizó la tolerancia al antibiótico haciendo las curvas correspondientes con callos obtenidos del medio MS (Murashi & Skoog, 1962) sin hormonas, adicionando al medio concentraciones crecientes de kanamicina sulfatada (0 mg/L, 25 mg/L, 50 mg/L y 75 mg/L), pues se ha reportado la recuperación de plantas transgénicas después de la selección con este antibiótico (Walters et al., 1992).

Al realizar las curvas de tolerancia a kanamicina en diferentes concentraciones se observó que la curva obtenida con una concentración de 50 mg/L presentó un comportamiento inhibitorio de crecimiento de los callos embriogénicos suficiente para permitir la selección (Gráfica 4-1), ya que se ve reducido significativamente a esta concentración sin ocasionar un daño severo a los callos.

Estas curvas de tolerancia se realizaron tanto para el explante tallo como peciolo. Ambos explantes presentaron un comportamiento similar al realizar las curvas de crecimiento y debido a que las curvas realizadas para el explante peciolo se vieron afectadas severamente por contaminación por hongos, se continuó la determinación de tolerancia a kanamicina por medio de las curvas obtenidas para el explante tallo. Por consiguiente, a través de la curva obtenida de tolerancia a la concentración de 50 mg/L de kanamicina sulfatada, se observó que es la adecuada para seleccionar a aquellos callos transformados después del bombardeo con el plásmido pBI-121/pWR-21 o pUC-pSS/pWR21. Esto se debió a que a esta concentración de antibiótico se ve un comportamiento decreciente en el crecimiento de los callos embriogénicos sin afectar la regeneración. Tanto las construcciones para el bombardeo con el plásmido pBI-121/pWR21 como para el cobombardeo con pUC-pSS/pWR21, contienen la secuencia que codifica para el gen *nptII*, el cual permite la selección de callos bombardeados y cobombardeados por su resistencia a kanamicina. Además, de contener al gen reportero *gus* el cual permite diferenciar aquellos que han sido transformados de los que no, a través de la reacción de la enzima β -glucuronidasa con el sustrato x-gluc se obtiene la coloración azul característica de dicha reacción (Mitsuhara et al., 1996), con lo cual se comprobó la inserción y expresión del gen *gus*.



Gráfica 4-1. Cinética de crecimiento de callos embrionógicos de zanahoria obtenidos del medio MS adicionado con 0 a 75 mg.L⁻¹ del antibiótico kanamicina.

4.5.2 Construcción y purificación del DNA plasmídico

Una vez obtenidas las células transformadas que contienen al plásmido pBI-121/pWR-21 (colonias blancas) se realizó una minipreparación (Brown, 1991), para posteriormente realizar un gel de agarosa al 1% del DNA obtenido con la finalidad de verificar la presencia del inserto de interés (Glicoproteína "G") en el plásmido pBI-121/pWR-21. El gel se obtuvo a partir de un análisis de restricción empleando las endonucleasas Xba I y Xho I.

En la Figura 4-5 se observa en el primer carril, como marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®), en el segundo carril se colocó la solución del DNA plasmídico digerida durante una hora a 37°C con la endonucleasa de restricción Xba I, notándose dos bandas, la de menor peso

corresponde al inserto de aproximadamente 1.5 Kb, mientras que la de mayor peso corresponde al vector pBI-121 de aproximadamente 13 Kb, el tercer carril corresponde a la misma solución, la cual fue digerida durante una hora a 37°C con la endonucleasa Xho I, notándose una sola banda que corresponde al plásmido linearizado de aproximadamente 14.5 Kb. Es por todo lo anterior que se pudo asegurar la clonación del gen de la proteína "G" del virus de la rabia con el plásmido pBI-121.

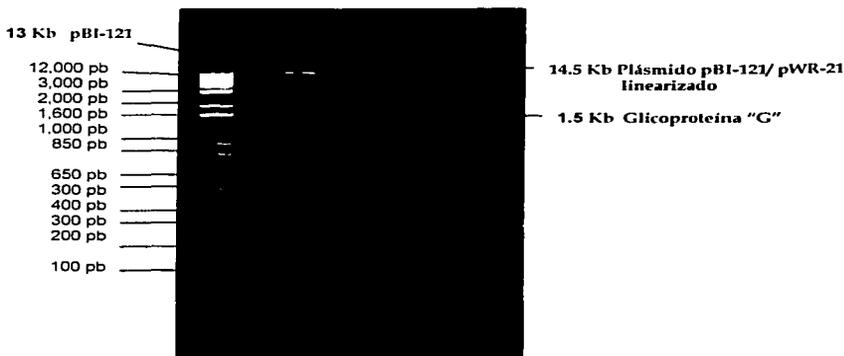


Figura 4-5. Análisis de restricción al plásmido pWR-21/pBI-121

Posteriormente con la finalidad de obtener el DNA del plásmido de interés en una forma pura se realizó la purificación del plásmido por medio de una **MAXIPREPARACIÓN** (Brown, 1991), ya que es necesario que se encuentre lo más puro posible para poder efectuar el bombardeo con micropartículas y

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

conseguir así la transformación de callos embriogénicos. Confirmando los resultados obtenidos en la MINIPREPARACIÓN por medio del mismo análisis de restricción (Figura 4-5).

4.5.3 BOMBARDEO

Se realizó un disparo a cada una de las 80 cajas petri con callo embriogénico para efectuar el cobombardeo, mientras que para el bombardeo se realizó un disparo con el plásmido construido a únicamente 50 cajas petri con callo embriogénico ya que se observó una respuesta favorable para el cobombardeo, por lo cual se consideró suficiente realizar el bombardeo con el plásmido pWR-21/pBI-121 en un menor número de cajas petri. Este criterio estuvo apoyado en el rendimiento satisfactorio de regeneración observado para la obtención de plantas completas vía embriogénesis realizado durante la primera etapa de este trabajo. Los resultados obtenidos fueron influenciados positivamente por los parámetros elegidos para la realización de esta etapa, ya que el tamaño de partícula utilizado ($0.4 \mu\text{m}$) como lo menciona Southgate (1995), favorece la expresión transitoria ya que influyen el depósito de ADN en el tejido (Klein, 1988) permitiendo la penetración a la pared y membrana celular. Por otro lado, los parámetros elegidos de distancia, vacío y cantidad de ADN fueron los proporcionados, en los cuales se logró disminuir la resistencia al aire a la cual se enfrentan las partículas al momento del bombardeo mejorando aún más la penetración de las células. Otro factor de gran importancia para realizar un bombardeo exitoso es la precipitación del ADN ya que el uso de la concentración adecuada de CaCl_2 y espermidina reducen la probabilidad de aglomeración de

partículas, por lo que permite la integración eficiente del DNA a las partículas empleadas durante el bombardeo, además favorece que un mayor número de partículas sean cubiertas con el DNA plasmídico con lo cual se logra una mayor introducción de cantidad de DNA a las células.

4.5.4 EXPRESIÓN TRANSITORIA

El éxito del bombardeo con microproyectiles depende de la penetración y transferencia del DNA en los tejidos vegetales. El gen bacteriano *GUS*, es considerado como el gen reportero de mayor elección para monitorear la transferencia de DNA, a través de la formación de un precipitado azul, al reaccionar la enzima β -glucuronidasa con el sustrato X-Gluc (Jefferson,1987).

Este simple ensayo constituye una evidencia visible de la transferencia y expresión del DNA introducido, en donde las diferencias en la expresión son fácilmente monitoreadas a través de pruebas histoquímicas o por ensayo fluorométrico.

Es por todo lo anterior que se realizó una prueba de expresión transitoria , para lo cual se eligieron al azar callos embriogénicos bombardeados de los dos explantes (tallo y peciolo) tanto para aquellos que fueron cobombardeados como para los bombardeados con el plásmido pWR-21/pBI-121, así como para callo embriogénico no transformado empleado como control negativo.

Como se puede observar en la Figura 4-8, todos los callos bombardeados y cobombardeados presentaron una respuesta positiva a la actividad de la enzima β -glucuronidasa, observándose un nivel de expresión regular (azul claro) para

los callos bombardeados y cobombardeados provenientes del explante peciolo, y una expresión buena (azul oscuro) para los callos bombardeados y cobombardeados provenientes del explante tallo, mientras que los callos no transformados presentaron una respuesta nula (sin color) al ser colocados con el sustrato de dicha reacción, tal y como se esperaba.

Esta diferencia en la eficiencia de transferencia del DNA plasmídico a las células de zanahoria puede deberse a que aún cuando se toman los callos provenientes de ambos explantes en el octavo día después del subcultivo (momento en el cual se presenta el mayor crecimiento) para llevar a cabo la transformación, los callos del explante tallo presentan una tasa de división celular más alta que los callos del explante peciolo (Gráfica 3-6).

4.5.5 Proliferación y regeneración de callos embriogénicos transformados en medio selectivo.

Con la finalidad de permitir únicamente el crecimiento de aquellas células de zanahoria que si fueron transformadas, todos los callos bombardeados y cobombardeados fueron mantenidos en medio Myt adicionado con 50 mgL⁻¹ de kanamicina sulfatada (proliferación) y posteriormente fueron subcultivados en medio MS sin hormonas, adicionado con la misma cantidad de antibiótico para llevar a cabo la regeneración.

De estos callos se logró la proliferación satisfactoria de callo embriogénico para ambos explantes (Figura 4-6), observándose a las seis semanas después de la transformación la germinación de embriones somáticos (Figura 4-7) los cuales

posteriormente se subcultivaron en medio MS completo para lograr la regeneración.



Figura 4-6. Callos embriogénicos bombardeados de los explantes tallo y peciolo



Figura 4-7. Germinación de embriones somáticos en callos embriogénicos bombardeados mantenidos con kanamicina.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

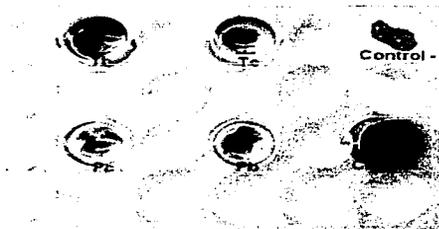


Figura 4-8. Expresión transitoria en callos embriogénicos

4.5.6 REGENERACIÓN DE PLANTAS TRANSFORMADAS

Al cabo de 2 meses aproximadamente, empezaron a germinar los embriones bombardeados Figura 4-10(b), por lo cual fue necesario realizar los siguientes subcultivos en medio MS sin kanamicina, ya que en esta etapa las plántulas obtenidas ya están transformadas debido a que fueron seleccionadas desde el momento de la formación de los proembriones en callos embriogénicos mantenidos en medio de proliferación con antibiótico, es decir, medio Myt con kanamicina (Figura 4-9).

Las plántulas fueron individualizadas de los callos embriogénicos bombardeados a partir de los cuales germinaron (Figura 4-10(d)), y una vez alcanzado el tamaño de aproximadamente 8 cm, fueron transferidas a tierra estéril de hojarasca en proporción 2:1 y mantenidas en condiciones de invernadero (Figura 4-11). Estas plantas fueron regadas con agua estéril cada tercer día, tal y como se hizo para las plantas regeneradas de zanahoria no transformadas (ver figura 4.6).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 4-9. Plantas completas transformadas

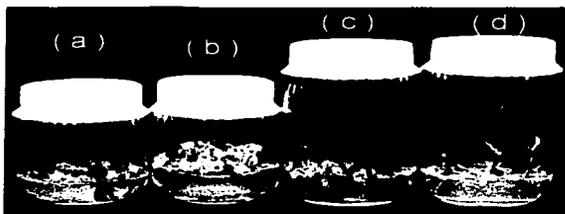


Figura 4-10. Proceso para la obtención de plantas transgénicas. (a) Callo bombardeado (b) embrión germinado (c) plántulas (d) individualización de plantas



Figura 4-11. Plantas crecidas en condiciones de invernadero



Figura 4-12. Plantas transformadas por bombardeo provenientes del explante tallo



(a)



(b)

Figura 4-13 (a) Planta obtenida por cobombardeo proveniente del explante peciolo. (b) Planta transformada por cobombardeo proveniente del explante tallo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



(a)



(b)

Figura 4-14 (a)Planta bombardeada en el explante peciolo (b)Planta de zanahoria no transformada

4.5.7 EXPRESIÓN PERMANENTE

Al cabo de 5 meses del bombardeo de los callos embriogénicos de zanahoria, se realizó una prueba de expresión permanente tal y como se efectuó para la expresión transitoria, esto con la finalidad de comprobar la presencia del plásmido que contiene a la glicoproteína "G" del virus de la rabia en plantas completas transformadas elegidas al azar comparadas con plantas no transformadas como control negativo. Esta prueba se realizó inicialmente en hojas verdaderas de dichas plantas obteniendo una respuesta positiva en la mayoría de éstas, ya que presentaron la coloración azul característica esperada tanto para las obtenidas del cobombardeo como las del bombardeo (Figura 4-15).

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

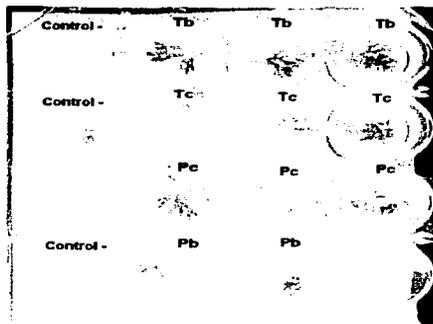


Figura 4-15. Expresión permanente de plantas transformadas

La expresión del gen de la glicoproteína "G" del virus de la rabia está dirigida por el promotor 35S, por lo cual se esperaba que dicho gen fuera expresado en todas las partes de la planta transformada, para ello se realizó una vez más la prueba en plantas completas regeneradas después del cobombardeo y bombardeo, y de esta manera se descartó la obtención de plantas quimeras. Como se observa en la figura 7, se obtuvo la coloración azul en todas las regiones de la planta para ambos tipos de bombardeo, por lo cual puede afirmarse que debido a la utilización de callos embriogénicos la probabilidad de recuperar plantas totalmente transformadas es mayor.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Figura 4-16. Expresión permanente de una planta transformada.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.6 CONCLUSIONES

1. Se logró la construcción del plásmido pBI-121/pWR-21 ya que por medio de un análisis de restricción con las enzimas XbaI y Xho I se observaron las bandas correspondientes al inserto pWR-21 el cual contiene a la glicoproteína "G" de la rabia, así como la banda correspondiente al vector pBI-121.
2. Al cabo de 5 meses del bombardeo se realizó la prueba de expresión estable de *gus*, en la cual se observó una respuesta positiva para plantas transformadas por ambos tipos de bombardeo, por lo que se comprobó la incorporación del transgen al DNA genómico de las células de zanahoria.
3. Se eligió como mejor método de bombardeo al que utilizó al plásmido pBI-121/pWR-21, debido a que resultó mas confiable a su respuesta con *gus*.
4. Se logró la obtención de plantas completas transformadas con un alto grado de regeneración.
5. La transformación se realizó con éxito ya que por medio de la expresión estable en plantas completas no se presentaron plantas quimeras, con lo cual se logró la expresión del inserto pWR-21 en todas las partes.

4.7 BIBLIOGRAFÍA

Aragao, F.J.L., M.F. Grossi de Sa, M. R. Davey, A. C. M. Brassileiro, J. C. Faria & E. L. Rech (1993). Factors influencing transient gene expression in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using an electrical particle acceleration device, *Plant Cell Rep.*, 12: 483-490.

Arakawa, T., D.K.X.Chong y W.H.R. Langridge (1998). Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine. *Nature Biotechnology* 16:292-297.

Armstrong, C., A. Barnason, S. Brown, D. Dean, R. Deaton, B. Dennehey, S. Elmer, M. Fromm, B. Hairston, B. LaVallee, G. Maher, G. Meek, F. Morrish, M. Pajeau, W. Peterson, M. Reedy, P. Samders, C. Santino, S. Sims & D. Songstad (1991). 1991 Symposium of the European Association for Research on Plant Breeding, Reus, Spain (EUCARPIA, Wageningen, The Netherlands). Abstract I.L3.

Banerjee, A.K. 1987. Transcription and replication of Rhabdoviruses. *Microbiol. Rev.* 51: 66-87.

Briggs, J.D., Dreesen, W.D., Wunner, H.W. 2002. Vaccines. In: Jackson, A.C., Wunner, H.W. ed. Rabies. Academic Press. London, U.K. p. 371- 400.

Brock., M.T.Madigan., J.M Martinko., J. Parker. *Biología de los Microorganismo.* Editorial. Prentice Hall,1997

Brown, T.A. (1991). *Essential Molecular Biology a Practical Approach*. Vol. I. Oxford University Press. New York, USA 229 p.

Charest, P. J., N. Calero, D. Lachance, D. S. S. Datta, L. C. Duchense & E. W. T. Tsang (1993). Microprojectile-DNA delivery in conifer species, factors affecting assesment of transient gene expression using the β - glucuronidase reporter gene, *Plant Cell Rep.*, 12: 189-193.

Christou, P., D.E. McCabe & W.F. Swain (1988).Stable transformation of soybean callus by DNA-coated gold particles, *Plant Physiol.*, 87:671-674.

Christou, P., W. F. Swain, N. Yang & D. E. McCabe (1989). Inheritance and expression of Foreign genes in transgenic soybean plants, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 86: 7500-7504.

Finner J. J. & M. D. McMullen (1990). Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via particle bombardment, *Plant Cell Rep.*, 8: 586-589.

Fitch, M. M. M, R. M. Manshardt, D. Gonsalves, J. L. Slightom & J. C. Stanford (1990). Stable transformation of papaya via microprojectile bombardment, *Plant Cell Rep.*, 9: 189-194.

Fromm, M.E., F.M. Morrish, C. Armstrong, R. Williams, J. Thomas & T.M. Klein (1990). Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants, *Biotechnology*, 8: 833-839.

Gordon-Kamm, W. W., T. M. Spencer, M. L. Mangano, T.R. Adams, R.J. Daines, W. G. Start, J.V. O'Brien, S.A. Chambers, W.R. Jr. Adams, N. G. Willets, T. B. Rice, C. V. Mackey, R. W. Krueger, A. P. Kaush & P.G. Lemaux (1990). Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants, *Plant Cell*, 2: 603- 618.

Guerrero-Andrade, O. Tesis Maestría: Construcción de vectores para la transformación de plantas con los genes de las glicoproteínas de fusión y de la hemaglutinina-neuraminidasa del virus de la enfermedad aviar del Newcastle y optimización de las condiciones de bombardeo. C.I.N.V.E.S.T.A.V., I.P.N. Irapuato, 2000.

Haq, T.A., H.S. Mason, J.D. Clemens y Ch. J. Arntzen (1995). Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science* 268:714-716.

Jefferson, R. A., T. A. Kavanagh & W. Bevan (1987). GUS fusions; β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants, *EMBO J.*,6: 3901-3907.

Kaplan, M.M. 1973. Safety precautions in handling rabies virus. En Kaplan, M.M., Kopowsky, H. Eds. Laboratory techniques in rabies. WHO. Geneva. p 13-17.

Kaufman, P.B. Wu, W. 1995. Gene transfer and expression in plants. In: Kaufman, P.B. Wu, W. Molecular and cellular methods in biology and medicine. CRC Press Inc. Florida, U.S.A. p 367-393.

Klein, T.M., T. Gradziel, M.E. Fromm & J.C. Stanford (1988). Factors influencing gene delivery into *Zea mays* cells by high-velocity microprojectiles, *Biotechnology*, 6: 559-563.

Landridge, W. Edible Vaccines". Scientific American online (septiembre 2000).

Larrick, J.W., Thomas, D.W. 2001. Producing proteins in transgenic plants and animals. *Curr Opin Biotech* 12:411-418.

Loza-Rubio, E., Setien, A.A., Bahloul, C., Brochier, B., et. al. 1999. Discrimination between epidemiological cycles of rabies in Mexico. *Arch. Med. Res.* 30:144-149.

Mason, H.S., D.M-K Lam y Ch. J. Arntzen. (1992). Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proceeding of the National Academy of Science USA* 89:11745-11749.

Mason, H.S., J.M Ball, J.J. Shi, X.Kiang, M.K. Estes y CH. J. Arntzen. (1996). Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proceeding of the National Academy of Science USA* 93:5335-5340.

McGarvey, P.B., J. Hammond, M.M. Dienelt, D.C. Hooper, Z.F.Fu, B. Dietzschold, H. Koprowski y F. H. Michaels. (1995). Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes. *Bio/Technology* 13:1484-1487.

Mitsuhara, I., M. Ugaki, H.Hirocika, T. Murakami, Y. Gotoh, Y.Katayose, S. Hakamura, T. Honkura, S. Nishimiya, K. Ueno, A. Mochizuki, H. Tanimoto, H. Tshawa, Y. Otsuki y Y. Ohashi. (1996) Efficient promoter cassettes for enhanced expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants. *Plant Cell Physiology* 37:49-59

Modelska, A., B. Dietzschold, n. Sleysh, Z.F.Fu, K . Steplewski, D.C.Hooper, H. Kropowski y V. Yusibov. (1998). Immunization against rabies with plant derived antigen. *Proceeding of the National Academy of Science USA* 95:2481-2485

Murashige, T. & F. Skoog (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant* 15:473-497.

Nicholson, G.K.2000. Rabies. En: Zuckerman, A.J.eds. Principles and practice of clinical virology. 4ª ed. Wiley, London. p 583-606.

Núñez, G.S. 1998. La rabia Humana una alerta epidemiológica contra la salud pública. Informes técnicos del Instituto Nacional de Salud Pública de Colombia. No. 4.

Perl, A., H. Kless, A. Blumenthal, G. Galili & E. Gallun (1992). Improvement of plant regeneration and GUS expression in scutellar wheat calli by optimization of culture conditions and DNA-microprojectile delivery procedures, *Mol. Gen. Genet.*, 235: 279-284.

Ryan, J.E., Daly, M.L., Millis, H.G.K. 2001. Immunomodulators and delivery systems for vaccination by mucosal routes. *Trends Biothech* 19(8):293-304.

Sanford, J.C., T. M. Klein, E. D. Wolf & N. Allen (1987). Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process, *J. Particle Sci. Technol.*, 5: 27-37.

Sanford, J. V., F. D. Smith & J. A. Russell (1993). Optimising the biolistic process for different biological applications, *Methods Enzymol.*, 217: 483-509.

Sanford, J.V., F.D. Smith & J.A. Rusell (1993). Optimising the Biolistic Process for Different Biological Applications. *Methods Enzymol.* 217:483-509.

Smith, J., Fishbein, B., Rupprecht, E.R., Clark, K. 1991. Unexplained rabies in three immigrants in the United States. *324:205-211.*

Southgate, E.M., M.R. Davey, J.B. Power & R. Marchant (1995). Factors Affecting the Genetic Engineering of Plants by Microprojectile Bombardment. *Biotec. Advanc.* 13:631-651.

Taylor, M.G. & I.K. Vasil(1991). Effect of physical factors, and the histology of transient GUS expression in pearl millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) embryos following microprojectile bombardment, *Plant Cell Rep.*, 10: 120-125.

Tomes, D.T. Transformation in maize: nonsexual gene transfer, *Annual Meeting Proceedings of 26th Annual Maize Breeders School* (J.Dudley,ed.) University of Illinois, Urbana,1990, pp. 7-9.

Tordo, N., Sacramento, D., Bouthy, H., 1996. The polymerase chain reaction technique for diagnosis, typing and epidemiological studies of rabies. En: Meslin, F.X., Kaplan, M.M., Koprowsky, H. eds. *Laboratory techniques in rabies*, 4th edn. W.H.O., Geneva, p. 157-169.

Trigiano, R. N., D.J. Gray . *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises*, CRC Press, New York, 2000, 297- 305.

Twell, D., T.M. Klein, M.E. Fromm & S. McCormick (1989). Transient expression of chimeric genes delivered into pollen by microprojectile bombardment, *Plant Physiol.*, 91: 1270- 1274.

Vasil, V., S.M. Brown, D. Re, M.E. Fromm & I.K. Vasil (1991). Stably transformed callus lines from microprojectile bombardment of cell suspension cultures of wheat, *Biotechnology*, 9 : 743- 747.

Walmsley, A.M. y Ch. J. Artzen. (2000). Plants for delivery of edible vaccines. *Current Opinion in Biotechnology* 11:126-129.

Wigdorovitz, A., C. Carrillo, M.J. Dus Santos, K. Trono, A. Peralta M.C Gómez, R.C. Ríos, P.M. Franzon, A.M. Sadir, J.M. Escibano y M.V. Borca. (1999). Induction of a protective antibody response to foot and mouth disease virus in mice following oral or parental immunization with alfalfa transgenic plants expressing the viral structural protein VP1. *Virology* 255:347-353.

Wunner, W., Larson, J.K., Dietzchold, B., Smith, L.C. 1988. The molecular biology of rabies viruses. *Rev. Infec. Dis.* 10. S771-S784.

Yusibov, V., A. Modelska, Steplewski, M. Agadjanyan, D. Weiner, D.C. Hooper y H. Koprowski. (1997). Antigens produced in plants by infection with chimeric plant viruses immunize against rabies virus and HIV-1. *Proceeding of the National Academy of Science USA* 94:5784-5788.

Páginas web:

<http://tusalud.com.mx>, 2003

<http://www.facmed.unam.mx>

www.pasteur.fr, 2003

www.vianural.com.ar, 2002

<http://www.bact.wiscedu>, 2002

<http://www.bact.wiscedu>, 2000

<http://www.hemerodigital.unam.mx/ANUIES>

http://revistadelsur.org.uy/revista_113-114/Tapa5.html

www.ejournal.unam.mx/vet_mex/vol31-02/RVM31210.pdf, 1999

www.sagarpa.gob.mx, 2000

www.sedafop.gob.mx, 2002

www.mexicoganadero.com, 2003

www.chp.sagarpa.gob.mx, 2001

www.oje.com , 2003

<http://www.drscope.com/privados/pac/pediatrica/pbl5/rabia.html>

<http://www.grain.org/sp/docs/biodiv29.pdf>

ANEXOS

ANEXOS

Tabla 1. Composición de Medios de cultivo

	Medio Myt	Medio Z-1
Sales MS		
▪ Solución I	10 ml / L	10 ml / L
▪ Solución II	10ml/ L	10ml/ L
▪ Solución III	10ml/ L	10ml/ L
▪ Solución IV	10ml/ L	10ml/ L
▪ Solución V	10ml/ L	10ml/ L
Vitaminas R ₂	-	10 ml/ L
Cocktel 20	10 m/ L	-
Adenina	10 ml/ L	-
MCPP	30 ml/ L	-
2,4-D	-	10 mg/ L
BAP	3.25 ml/ L	-
Antioxidante	30 ml/ L	-
Azúcar	30 g/ L	30 g/ L
Gellan	2.5 g/ L	2.5 g/ L

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1. VITAMINAS R₂

COMPUESTO	PM (g)	CONCENTRACIÓN		STOCK
		mg.L ⁻¹	μM	μM
Inositol	180.160	100.0	555.00	5.5X10 ⁻⁴
Ácido nicotínico	123.110	1.0	8.12	812
Tiamina	337.270	2.0	5.93	593
Piridoxina	205.640	1.0	4.90	490

Para preparar 1 L de medio se toman 10 ml de cada una de las soluciones arriba mencionadas.

2. ANTIOXIDANTE

COMPUESTO	PM (g)	CONCENTRACIÓN	
		mg.L ⁻¹	μM
Ácido ascórbico	176	15	85.23
Ácido cítrico	210.46	15	71.27

3. REGULADORES DE CRECIMIENTO

COMPUESTO	PM (g)	CONCENTRACION		STOCK 10X
		mg.L ⁻¹	μM	μM
2,4-D	221.04	1.0	4.52	45.2
MCPP	214.50	1.0	4.66	46.6

Para agregar 1 mg del regulador a 1 L de medio se toman 10 ml de la solución stock correspondiente.

4. AMINOÁCIDOS Y OTRO

COMPUESTO	PM (g)	CONCENTRACIÓN		STOCK 100X μM
		$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	μM	
$\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_5\cdot\frac{1}{2}\text{H}_2\text{SO}_4$ (Adenina)	184.20	10.0	54.30	543.0

Para añadir 10 mg de adenina al medio de cultivo correspondiente se toman 10 ml de la solución stock por litro de medio.

4.1 Composición de la mezcla de aminoácidos y vitaminas denominada cocktail 20.

COMPUESTO	PM (g)	CONCENTRACIÓN		STOCK 100X mM
		$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	μM	
L-asparagina	150.10	10.0	66.62	6.66
L-arginina	174.20	10.0	57.40	5.74
L-ác. aspártico	133.10	7.5	56.35	5.63
Glicina	75.07	23.0	306.38	30.64
Glutamina	146.10	60.0	410.67	41.06
Ac. glutámico*	147.10	7.5	51.00	5.10
Biotina (Vit. B ₈)*	244.30	1.0	4.10	0.41
Ac. fólico (B ₉)*	441.40	1.0	2.26	0.23
Ac. nicotínico(B ₃)	123.10	1.5	12.18	1.22
Piridoxina (B ₆)	205.60	1.5	7.30	0.73
Riboflavina (B ₂)	376.40	0.1	0.26	0.03
Tiamina (B ₁)	337.30	3.0	8.90	0.89
Myo-inositol	180.16	145.0	804.84	80.48
Urea	60.06	45.0	749.25	74.92

Para preparar 1 l de medio se toman 10 ml del cocktail.

*Disolver con 3 gotas de NaOH 1 N.

5. COMPOSICIÓN DEL MEDIO MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962)

COMPUESTO	PM (g)	CONCENTRACIÓN		STOCK 100X
		mg.L ⁻¹	mM	mM
Solución I				
NH ₄ NO ₃	80.040	1650	20.6	2060
KNO ₃	101.108	1900	18.8	1880
Solución II				
MgSO ₄ .7H ₂ O	246.480	370.0	1.5	150
MnSO ₄ .H ₂ O	169.010	16.9	1X10 ⁻²	1
ZnSO ₄ .7H ₂ O	287.540	8.6	3X10 ⁻²	3
CuSO ₄ .5H ₂ O	249.680	2.5X10 ⁻²	1X10 ⁻⁴	1X10 ⁻²
Solución III				
CaCl ₂ .2H ₂ O	147.020	440.00	3.0	300
KI	166.010	0.83	5X10 ⁻³	5X10 ⁻¹
CoCl ₂	237.930	2.5X10 ⁻²	1X10 ⁻⁴	1X10 ⁻²
Solución IV				
KH ₂ PO ₄	136.090	170.00	1.25	125
H ₃ BO ₃	61.860	6.20	1X10 ⁻¹	10
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	241.950	2.5X10 ⁻¹	1X10 ⁻³	1X10 ⁻¹
Solución V				
FeSO ₄ .7H ₂ O	278.028	27.80	1X10 ⁻¹	10
EDTA.2H ₂ O	372.300	37.30	1X10 ⁻¹	10
—				
Sacarosa*	342.310	30.00	87.63	

*Fuente de carbono

Para preparar 1 L de medio se toman 10 ml de cada una de las soluciones arriba mencionadas.

6. SOLUCIONES PARA PREPARAR X-GLUC (10X) Y MEDIR LA EXPRESIÓN TRANSITORIA DE GUS (JEFFERSON ET AL., 1987).

1) Amortiguador de fosfato de sodio (1 M)*

	Pesar	Volumen	Concentración	Stock
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.38 g	50 ml dH_2O	200 mM	39 ml
Na_2HPO_4	2.84 g	100 ml dH_2O	200 mM	+ <u>61.00</u> 100 ml

2) Ferrocianuro de potasio**

	Pesar	Volumen	Stock
$\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0.211 g	100 ml dH_2O	5 mM

3) Ferricianuro de potasio**

	Pesar	Volumen	Stock
$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	0.164 g	100 ml dH_2O	5 mM

4) EDTA*

	Pesar	Volumen	Stock
$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3.72 g	100 ml dH_2O	100 mM

5) Tritón X-100*

1 ml de Tritón X-100 en 99 ml de H_2O desionizada	Stock 1%
---	-------------

*Esterilizar en autoclave durante 18 minutos a 1.3 kg.cm^{-2} ó 18 lb.pulg^{-2} .

** Esterilizar por filtración en membrana millipore™ de $0.22 \mu\text{m}$ de diámetro.

Preparar solución de X-Gluc de la siguiente manera en condiciones de esterilidad:

	Concentración (mM)	Stock 10X	Para 25 ml (ml)
Amortiguador de Fosfato de sodio pH 7.0	100.0	1 M	2.5
EDTA	10.0	100 mM	2.5
Ferricianuro de K	0.5	5 mM	2.5
Ferrocianuro de K	0.5	5 mM	2.5
Tritón X-100	0.5	5 mM	2.5
X-Gluc en DMSO	1.0 mg.ml ⁻¹		25 mg/150 µl de DMSO

Aforar a 25 ml con agua desionizada estéril.

Una vez preparada esta solución se almacena a -20°C y se descongela lentamente al momento de utilizarla.

7. SOLUCIONES PARA MEDIR EXPRESIÓN TRANSITORIA DE GUS.

a) Buffer "Z" pH 7.4*

	CONCENTRACION (mM)	Pesar/500 ml (g)
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	40	2.76
Na ₂ HPO ₄	60	4.26
KCl	10	0.37
MgSO ₄ .7H ₂ O	1	0.12

b) Etanol al 70%

350 ml de etanol absoluto + 150 ml de agua desionizada estéril.

c) Acetona-Metanol (1:3)

166 ml de acetona + 333 ml de metanol.

d) Glicerol al 50%*

250 ml de glicerol absoluto + 250 ml de agua desionizada

*Esterilizar en autoclave 18 minutos a 1.3 kg.cm² ó 18 lb.pulg².