

00528
20



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS
EMBRIOGÉNICOS DE ALFALFA PARA SU
POSTERIOR TRANSFORMACIÓN CON EL
GEN DE LA PROTEÍNA G DEL VIRUS DE LA
RABIA POR MEDIO DE BIOBALÍSTICA.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS
P R E S E N T A N:
JOSÉ LUIS CASTAÑEDA GIL
MIGUEL ISRAEL GIL ADAUTO



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO, D.F.

2003.

2



Universidad Nacional
Autónoma de México



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).

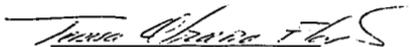
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

Jurado asignado:

Presidente Prof. OLIVERA FLORES TERESA DE JESÚS
Vocal Prof. RUÍZ TERÁN FRANCISCO
Secretario Prof. QUIRASCO BARUCH MARICARMEN
1er. suplente Prof. DE LA TORRE HERNÁNDEZ MARÍA EUGENIA
2º. Suplente Prof. BARRERA OVIEDO DIANA

Trabajo realizado en el laboratorio 116. Conjunto "E". Departamento de Bioquímica, Facultad de Química. U.N.A.M.

Asesor del Tema:



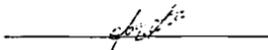
M. en C. TERESA DE JESÚS OLIVERA FLORES

Supervisor Técnico:

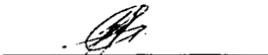


M. en C. OCTAVIO GUERRERO ANDRADE

Sustentantes:



JOSÉ LUIS CASTAÑEDA GIL



MIGUEL ISRAEL GIL ADAUTO

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM y a la Facultad de Química.

A la M. en C. Teresa de Jesús Olivera Flores , al Dr. Miguel Gómez Lim y al M. en C. Octavio Guerrero Andrade por el apoyo brindado para este trabajo.

Al CONACyT por permitirnos participar en el proyecto de grupo titulado "Expresión de la proteína G del virus de la rabia en plantas transgénicas de maíz y su evaluación como inmunógeno oral en bovinos." (34635-B)

DEDICATORIAS

Gracias DIOS por dejarme ser tan afortunado y llegar a este momento tan importante en mi vida, por estar a mi lado y ayudarme a superar todos los obstáculos presentados.

A mis padres Graciela Aduato y Miguel Gil por todo el amor y apoyo incondicional que me han brindado a lo largo de toda mi vida y por ser siempre un ejemplo de honestidad, trabajo y responsabilidad. Esto es por ustedes. Los amo.

A mi hermana Rosy por compartir tantos momentos de felicidad. Gracias por tu amor y paciencia. Sabes que puedes contar conmigo en cualquier momento de la vida en que lo necesites. Te quiero mucho.

A mi abuelita Rosa por brindarme amor y cuidados a lo largo de toda mi vida. Gracias por quererme así. Te quiero.

A mis tíos, tías y primos por su apoyo incondicional. Angel Aduato "Gracias". Jessica y Angélica saben que son muy especiales para mí.

A mis amigas de toda la vida Vanesa, Claudia y Yanely. Ya son 18 años juntos, las quiero mucho.

A mis amigos Ernesto, José Luis, Goyo, Isaac, Luis. Gracias por compartir tantas cosas, los considero como hermanos.

D

A mis amigas de generación Berenice, Deisy, Minerva, Roció, Adriana I. Gabriela, Pilar, Violeta, Adriana M, Karla C. Gracias por tantas emociones, tristezas y por estar siempre conmigo en una de las etapas más padres de mi vida.

GRACIAS

MIGUEL

DEDICATORIA

A Dios, por bendecirme cada mañana. A ti, que aunque a veces no te encuentro, basta mirarme al espejo para recordar que vives en mí.

A mi papá, por tu ayuda incondicional, por tu sonrisa incansable. Gracias por que no me has cortado las alas, me has impulsado a volar. Gracias por enseñarme con tu ejemplo diario el significado del éxito.

A mi familia, José Luis, Rosalva, Karla, Ricardo y Mónica, por ser la fuerza que me impulsa a luchar contra cualquier obstáculo que se me presente. Gracias por llevarme siempre en su corazón.

A Miguel Gil Aduato. Para pruebas de amistad, una tesis mancomunada. Gracias por tu paciencia, por tu enseñanza. Ha sido un privilegio trabajar contigo. Gracias a tu familia por que siempre me han hecho sentir parte de ella.

A mis amigos de toda la vida, Carlos Apis, Roberto Cano y Jaime Díaz. Gracias por estar siempre cuando los he necesitado. Gracias por las experiencias que hemos pasado juntos.

A mis amigos de la Facultad, para no omitir a ninguno prefiero no nombrar a nadie. Gracias por compartir un sueño. Gracias por hacer de mi carrera algo maravilloso. Gracias por su apoyo, por su regaño, por su sonrisa. Gracias por permitirme conocer a personas tan especiales. Me llevo una parte de cada uno de ustedes.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ABREVIATURAS.....	6
RESUMEN.....	8
1 INTRODUCCIÓN.....	10
2 OBJETIVO GENERAL.....	12
3 HIPÓTESIS GENERAL.....	12
4 ANTECEDENTES GENERALES.....	13
4.1 ORÍGEN.....	13
4.2 BOTÁNICA.....	13
4.3 IMPORTANCIA ECONÓMICA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.....	14
4.4 REQUERIMIENTOS EDAFOCLIMÁTICOS.....	15
4.4.1 Radiación solar.....	15
4.4.2 Temperatura.....	15
4.4.3 pH.....	16
4.4.4 Salinidad.....	16
4.4.5 Tipo de suelos.....	16
4.5 APROVECHAMIENTO DE LA ALFALFA.....	17
4.5.1 En verde.....	17
4.5.2 Ensilado.....	17
4.5.3 Henificado.....	18
4.5.4 Deshidratado.....	18
4.6 VALOR NUTRICIONAL.....	19
4.7 GENÉTICA Y CITOTAXONOMÍA.....	20
SECCIÓN I.....	21
ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS EMBRIOGÉNICOS DE ALFALFA COMO MODELO BIOLÓGICO.....	21
5 ANTECEDENTES GENERALES.....	21
5.1 Embriogénesis somática.....	21
5.1.1 Cultivo de tejidos vegetales.....	21
5.1.2 Embriogénesis somática.....	22
5.1.3 Embriogénesis somática en alfalfa.....	25
5.1.4 Factores que controlan la embriogénesis.....	26
5.1.4.1 Medios de cultivo.....	26
5.1.4.2 Reguladores de crecimiento.....	28
5.1.4.3 Condiciones ambientales.....	30
5.1.4.4 Factores que controlan la regeneración de alfalfa.....	30
5.1.5 Secuencia para la obtención de embriogénesis somática y regeneración de plántulas.....	32
6 OBJETIVOS.....	33
6.1 Objetivo General.....	33
6.2 Objetivos específicos.....	33
7 HIPÓTESIS.....	34
8 MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
8.1 Aspectos generales.....	35
8.1.1 Selección del material biológico.....	35
8.1.2 Preparación de medios de cultivo.....	35
8.1.3 Condiciones de incubación.....	36

8.2 Obtención de explantes.....	36
8.2.1 Métodos de esterilización.....	36
8.2.2 Establecimiento de cultivos asépticos con semillas de alfalfa.....	38
8.3 Establecimiento de callos embriogénicos de alfalfa.....	38
8.3.1 Inducción de callo embriogénico.....	38
8.3.2 Proliferación de callo embriogénico.....	39
8.3.3 Mantenimiento y regeneración.....	39
8.4 Curva de crecimiento de callos embriogénicos obtenidos del medio SH.....	39
9 RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	41
9.1 Método de esterilización.....	41
9.2 Establecimiento y caracterización de la cinética de crecimiento de los cultivos de callos embriogénicos de alfalfa.....	44
9.2.1 Inducción de callo embriogénico.....	44
9.2.2 Proliferación de los cultivos de callos embriogénicos.....	46
9.2.3 Mantenimiento de callos embriogénicos de alfalfa y regeneración de plántulas.....	50
9.3 Curva de crecimiento de callos embriogénicos obtenidos del medio SH.....	53
10 CONCLUSIONES.....	56
TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE ALFALFA.....	58
11 ANTECEDENTES GENERALES.....	58
11.1 Vacunas Comestibles.....	58
11.2 Virus de la Rabia.....	62
11.3 Sistemas actuales para la transformación genética de plantas.....	68
12 OBJETIVOS.....	78
12.1 Objetivo General.....	78
12.2 Objetivos Específicos.....	78
13 HIPÓTESIS.....	79
14 MATERIALES Y MÉTODOS.....	80
14.1 Materiales biológicos.....	80
14.2 Curva de tolerancia a kanamicina de los callos embriogénicos de alfalfa.....	80
14.3 Construcción del vector de expresión en plantas para el gen de la proteína "G" del virus de la Rabia.....	81
14.4 Extracción y purificación del fragmento que contiene el gen de la proteína "G" del virus de la rabia y el plásmido pBI-121 contenidos en el gel de agarosa.....	83
14.5 Ligación del fragmento que contiene el gen de la proteína "G" del virus de la rabia al plásmido pBI-121.....	85
14.6 Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> para la electroporación.....	86
14.7 Electroporación de células competentes de <i>E. coli</i> para introducir el producto de ligación.....	87
14.8 Transformación de células competentes de <i>Escherichia coli</i> cepa XI.1-BLUE con los vectores de expresión (Belsler y Hyman, 1985).....	88
14.9 Minipreparación de plásmido pBI-121/pWR-21.....	89
14.10 Extracción y purificación del ADN plasmídico (Sambrook, 1989).....	91
14.11 Preparación de las partículas de tungsteno.....	93
14.12 Precipitación del ADN (Klein <i>et. al.</i> , 1988).....	94
14.13 Bombardeo con microproyectiles de tungsteno con pistola de baja presión.....	94
14.14 Determinación de la actividad de β -glucuronidasa por el método histoquímico (Jefferson, 1987).....	96

15 RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	98
15.1 Construcción del plásmido que contiene el cassette de expresión en plantas con el gen de la proteína "G" del virus de la Rabia.	98
15.2 Curva de tolerancia a kanamicina de los callos embriogénicos de alfalfa	99
15.3 Transformación genética con micropartículas.....	103
15.4 Expresión Transitoria de callos embriogénicos transformados con el plásmido pBI-121/pWR-21.	104
15.5 Selección y proliferación de callos embriogénicos transformados.	105
15.6 Expresión estable de callos embriogénicos transformados con el plásmido pBI-121/pWR-21.	107
16 CONCLUSIONES.....	111
17 PERSPECTIVAS.....	112
18 BIBLIOGRAFÍA	113
19. ANEXOS	118

INDICE DE TABLAS

4.1 Clasificación taxonómica de la alfalfa	13
4.2 Composición química de la alfalfa	19
8.1 Composición de los medios de cultivo utilizados en la inducción de callo embriogénico en ambas variedades de alfalfa	36
9.1 Métodos de esterilización de semilla	41

INDICE DE FIGURAS

8-1 Ruta crítica para la obtención de la embriogénesis somática.....	40
9-1 Establecimiento de cultivos asépticos con semillas de ambas variedades de alfalfa.	42
9-2 Inducción de callo embriogénico a partir de explantes asépticos	45
9-3 Inducción de callo embriogénico a partir de tallo y peciolo para ambas variedades.	46
9-4 Proliferación de callo embriogénico después de tres subcultivos en un periodo aproximado de 45 días.	47
9-5 Proliferación de callo embriogénico para la variedad Aragón en los tres medios de cultivo utilizados.	48
9-6 Proliferación de callo embriogénico para la variedad Moapa en los tres medios de cultivo utilizados.	48
9-7 Regeneración de plántulas a partir de peciolo de la variedad Moapa proveniente del medio SH	51
9-8 Regeneración de plántulas a partir de tallo de la variedad Aragón proveniente del medio SH.....	51
9-9 Planta de alfalfa regenerada a partir de callo embriogénico proveniente de peciolo de la variedad Moapa.	52
9-10 Cinética de crecimiento con base en el peso fresco de los cultivos de callos embriogénicos de alfalfa provenientes del medio de cultivo denominado SH	54
9-11 Cinética de crecimiento con base en el Ln del peso fresco de los cultivos de callos embriogénicos de alfalfa provenientes del medio de cultivo denominado SH.....	55
11-1 Genoma del virus de la rabia.....	63
11-2 Representación esquemática del sistema de bombardeo con micropartículas o biolística. se muestra el sistema más moderno, en donde el macroproyectil es propulsado por una descarga de helio a alta presión.....	73
11-3 Estructura química del x-gluc.....	76
14-1 Construcción del vector pBI-121/pWR-21. se obtuvo el fragmento Xba I, correspondiente al gen de la proteína "g" del pUC-pSS/pRW-21 y se clonó en el sitio xba I del pBI-121 creándose el vector.	81
14-2 Esquema del plásmido pBI-121/pWR-21.....	82

14-3 Cassete de expresión utilizado para la transformación de los callos embriogénicos de alfalfa.	85
14-4 Ruta crítica para la transformación genética.....	97
15-1 Análisis de restricción del plásmido pBI-121/pWR-21 con endonucleasas de restricción Xho I y Xba I.	99
15-2 Curva de crecimiento en selección con kanamicina para tallo; comparación entre tratamientos. t0 0 mg.l ⁻¹ , t1 25 mg.l ⁻¹ , t2 50 mg.l ⁻¹ , t3 75 mg.l ⁻¹	100
15-3 Curva de crecimiento en selección con kanamicina para peciolo; comparación entre tratamientos. T0 0 mg.l ⁻¹ , T1 25 mg.l ⁻¹ , T2 50 mg.l ⁻¹ , T3 75 mg.l ⁻¹	102
15-4 Comparación entre el control negativo y una muestra de callo bombardeado con el gen pWR-21/pBI-121.	105
15-5 Expresión del gen <i>uid A</i> que codifica para la enzima β -galactosidasa, a los 5 meses de realizado el bombardeo.	109
15-6 Ruta para la obtención de plantas transgénicas de alfalfa.	110

ABREVIATURAS

Reguladores del crecimiento vegetal:

ABA: Ácido Abscísico.

Cinetina: 6-furfurilaminopurina.

IBA: Ácido indolbutírico.

MCPP: Ácido 2-metil-4-clorofenoxipropiónico.

ANA: Ácido naftalenacético.

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

2ip: 6-(γ,γ -Dimetilalilamino)-purina.

BAP: Bencil-aminopurina.

Medios de cultivo:

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

SH: Medio nutritivo creado por Schenk y Hildenbrandt (1972).

Myt: Medio MS modificado por Olivera F. (1995).

MJ Medio SH modificado por McKersie (1994).

Peso:

μ g: microgramos.

mg: miligramos.

g: gramos.

Volumen:

μ L: microlitros.

mL: mililitros.

L: litros.

Longitud:

μ m: micrómetros.

nm: nanómetros.

mm: milímetros.

cm: centímetros.

Concentración:

μ M: Micromolar.

mM: Milimolar.

M: Molar.

N: Normal.

Varios:

cADN: Ácido desoxirribonucleico complementario.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AARNsa: Enzima con actividad hidrolítica del ARN.

CaMV-35S: Secuencia promotora de la transcripción del virus del mosaico de la coliflor.

β -gluc: Enzima que hidroliza al sustrato x-gluc.

gus y npt II: son genes bacterianos de *Escherichia coli* que codifican, el primero, para la enzima β -gluc, y el segundo, para la neomicina fosfotransferasa II.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

SDS: Lauril sulfato de sodio.

TE: Amortiguador de Tris-EDTA.

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

dH₂O: Agua desionizada.

D O: Densidad óptica.

pH: potencial de hidrógeno.

g: gravedad.

°C: grados Celsius.

h: horas.

in Hg: Pulgadas de mercurio.

psi: unidades de presión en el sistema ingles de medidas, 14.7 psi o lb.plg⁻²= 1 atmósfera.

W.m⁻²: unidades de intensidad luminosa.

RESUMEN.

El presente trabajo de tesis se llevó a cabo en dos etapas, la primera consistió en el establecimiento y caracterización de los cultivos de callos embriogénicos de alfalfa. En la segunda etapa se construyó un vector de expresión en plantas con la secuencia codificante de la proteína "G" del virus de la rabia y se hicieron ensayos preliminares para la transformación de los callos embriogénicos generados en la primera etapa.

Durante la primera etapa se establecieron los cultivos asépticos de semillas de dos variedades de alfalfa (Aragón y Moapa). De las plántulas obtenidas a los 15 días después de la germinación de dichas semillas, se tomaron los explantes (peciolo, hoja cotiledonaria, hoja verdadera y callo) y se sembraron en tres medios de cultivo denominados como SH, MJ y Myt. Dichos medios estaban adicionados con $11.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de 2,4-D y $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de MCCP respectivamente. El mejor medio para la inducción y germinación de callos embriogénicos resultó ser el SH y los mejores explantes fueron tallo y peciolo. En esta etapa. También se caracterizaron los cultivos de callos embriogénicos a través de la cinética de crecimiento en base a curvas de peso fresco. De esta manera se determinó que la fase exponencial de crecimiento de dichos cultivos se presentó entre el segundo y quinto día después del subcultivo.

En la segunda etapa se clonó la secuencia codificante del gen de la proteína "G" del virus de la rabia en el vector pBI121; dando como resultado la obtención que denominamos pBI-121/pWR-21. En este vector la secuencia de la proteína "G" se fusionó a la secuencia de la β -*gus*, de manera que ambos genes quedaron bajo el control del promotor 35S del CaMV. También se realizó una curva de tolerancia a kanamicina por parte de los callos embriogénicos de alfalfa generados en la primera etapa y se determinó que la concentración máxima para la selección de las células transformadas fuera de 50 mg*L⁻¹.

Además se hicieron ensayos preliminares para la transformación de los cultivos de callos embriogénicos con el vector pBI-121/pWR-21, verificándose que los callos bombardeados con dicho vector presentaron expresión transitorio de la β -*gus* y después de cinco meses posteriores al bombardeo presentaron expresión estable de la β -*gus*.

De esta manera se establecieron las condiciones mínimas para la transformación de callos embriogénicos de alfalfa, aunque queda por resolver la obtención de plantas transformadas.

1 INTRODUCCIÓN

Los avances en la Biología Molecular han permitido introducir nuevos genes a muchas especies vegetales. Frecuentemente los productos de la expresión de dichos genes se acumulan en tejidos particulares de la planta, así las plantas modificadas genéticamente 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 virus, hongos, bacterias, insectos u otras especies; asimismo son capaces de llevar a cabo modificaciones postraduccionales complejas (glucosilación) y producir altas concentraciones de la proteína de interés. Con el uso de la técnica de manipulación genética ha sido posible la obtención de plantas transgénicas que sean capaces de expresar niveles altos de proteínas inmunogénicas, preferentemente en los tejidos comestibles (frutos, semillas, hojas, tallos), los cuales al ser consumidos por vía oral podrían inducir una respuesta inmune.

El concepto de producción de vacunas en plantas transgénicas fue introducido por Mason *et. al.* (1992), cuando expresaron el 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 parenteral o mejor aún, de forma oral mediante el consumo de las partes comestibles de las plantas transformadas. Esto último puede estimular respuestas inmunes en los sitios de

reconocimiento de muchos patógenos, facilitando el diseño de programas de vacunación en gran escala.

La presencia de antígenos específicos en plantas, aún a bajos niveles, pueden provocar mediante la administración por vía oral, reacciones inmunológicas comparables a aquellas suscitadas por las vacunas convencionales (Haq *et. al.*, 1995; Mason *et. al.*, 1996).

Para la obtención de vacunas con plantas modificadas genéticamente, se reconoce que el modelo biológico utilizado deba ser de importancia alimenticia, poseer la habilidad de ser transformado y de producir muchas copias de dichas plantas. Son varios los modelos ya utilizados en la transformación genética; los más conocidos sin duda alguna son: zanahoria, jitomate, maíz, arábidopsis y tabaco. Sin embargo, estos dos últimos no tienen una importancia alimenticia, por lo que tan sólo se han utilizado como modelos biológicos. La alfalfa hasta el momento no se ha empleado de manera común, ya que son pocas las vacunas que se han realizado para el consumo de ganado. Se sabe hasta el momento que la rabia representa un problema serio para el ganado vacuno, es por ello que en el presente trabajo se establecieron los callos embriogénicos de alfalfa y posteriormente logró la transformación de éstos por biobalística introduciendo el gen que codifica la síntesis de la proteína "G" del virus de la rabia.

2 OBJETIVO GENERAL.

Establecer y caracterizar los cultivos embriogénicos de alfalfa así como las condiciones mínimas para su transformación por medio de bombardeo de partículas.

3 HIPÓTESIS GENERAL.

Si se transforman callos embriogénicos de alfalfa por medio de bombardeo de partículas, entonces es probable obtener plantas totalmente transformadas.

4 ANTECEDENTES GENERALES.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.1 ORIGEN.

La alfalfa tiene su área de origen en Asia Menor y sur del Cáucaso, abarcando países como Turquía, Irak, Irán, Siria, Afganistán y Pakistán; así los persas introdujeron la alfalfa en Grecia y de ahí pasó a Italia en el siglo IV A. C. La gran difusión de su cultivo fue llevada a cabo por los árabes a través del norte de África, llegando a España donde se extendió a toda Europa (Bolton *et. al.* 1972).

4.2 BOTÁNICA.

La ubicación taxonómica de la alfalfa, de acuerdo con el sistema de clasificación de Lawrence (1951) y Cronquist (1968) citado por Radford *et. al.* (1974), es la siguiente:

Tabla 4.1 Clasificación taxonómica de la Alfalfa.

Reino	Vegetal
División	Embryophyta
Subdivisión	Angiospermeae
Clase	Dicotyledoneae
Subclase	Rosidae
Orden	Rosales
Familia	Leguminosae
Subfamilia	Fabaceae
Género	Medicago
Especie	Sativa

Radford *et. al.*, 1974.

Es una planta perene, vivaz y de porte erecto. Su raíz principal es pivotante, robusta y muy desarrollada (hasta 5 m. de longitud) con numerosas raíces secundarias. Posee una corona que sale del terreno, de la cual emergen brotes que dan lugar a los tallos los cuales, son delgados y erectos para soportar el peso de las

hojas y de las inflorescencias, además son muy consistentes, por tanto es una planta muy adecuada para la siega. Sus hojas son trifoliadas, aunque las primeras hojas verdaderas son unifoliadas. Los márgenes son lisos y con los bordes superiores ligeramente dentados. La flor característica de esta familia es la de la subfamilia *Papilionoidea* que son de color azul o púrpura, con inflorescencias en racimos que nacen en las axilas de las hojas. Su fruto es una legumbre indehiscente sin espinas que contiene entre 2 y 6 semillas amarillentas, arriñonadas y de 1.5 a 2.5 mm. de longitud (Radford *et. al.* 1974).

4.3 IMPORTANCIA ECONÓMICA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.

Se trata de un cultivo muy extendido en los países de clima templado, en donde la ganadería intensiva es la que ha demandado de forma regular los alimentos que ha tenido que proveer la industria, dando lugar a su cultivo intensivo.

La importancia del cultivo de la alfalfa va desde su interés como fuente natural de proteínas, fibra, vitaminas y minerales; así como su contribución paisajística y su utilidad como cultivo conservacionista de la fauna. Además de la importante reducción energética que supone la fijación simbiótica del nitrógeno para el propio cultivo y para los siguientes en las rotaciones de las que forma parte. Por ser una especie perene, su cultivo aporta elementos de interés como limitador y reductor de la erosión y de ciertas plagas y enfermedades de los cultivos que le siguen en la rotación (Robles, 1979).

4.4 REQUERIMIENTOS EDAFOCLIMÁTICOS.

4.4.1 Radiación solar.

Es un factor muy importante que influye positivamente en el cultivo de la alfalfa, pues el número de horas de radiación solar aumenta a medida que disminuye la latitud de la región. La radiación solar favorece la técnica del presecado en campo en las regiones más cercanas al ecuador, y dificulta el secado en las regiones más hacia el norte (Bolton, 1972).

4.4.2 Temperatura.

La semilla germina a temperaturas de 2-3°C, siempre que las demás condiciones ambientales lo permitan siendo que a medida que se incrementa la temperatura la germinación es más rápida hasta alcanzar un óptimo a los 28-30°C; así temperaturas superiores a 38°C resultan letales para las plántulas y al comenzar el invierno detienen su crecimiento hasta la llegada de la primavera cuando comienzan a rebrotar (Castro, 1982).

Existen variedades de alfalfa que toleran temperaturas muy bajas (-10° C). La temperatura media anual para la producción forrajera está en torno a los 15°C, siendo el rango óptimo de temperaturas, según las variedades de 18-28°C (Castro, 1982).

4.4.3 pH.

El factor limitante en el cultivo de la alfalfa es la acidez del suelo, excepto en la germinación, pudiendo ser de hasta 4. El pH óptimo del cultivo es de 7.2, recurriendo a encalados siempre que el pH baje de 6.8, además los encalados contribuyen a incrementar la cantidad de iones de calcio en el suelo disponibles para la planta y reducir la absorción de aluminio y manganeso que son tóxicos para la alfalfa (www.infoagro.com.mx, 2003).

Existe una relación directa entre la formación de nódulos y el efecto del pH sobre la alfalfa. La bacteria nodulante de la alfalfa es *Rhizobium meliloti*, esta especie es neutrófila y deja de reproducirse por debajo de pH 5. Por tanto si falla la asimilación de nitrógeno la alfalfa lo acusa (www.infoagro.com.mx, 2003).

4.4.4 Salinidad

La alfalfa es muy sensible a la salinidad, cuyos síntomas comienzan con la palidez de algunos tejidos, la disminución del tamaño de las hojas y finalmente la parada vegetativa con el consiguiente achaparrado. El incremento de la salinidad induce desequilibrios entre la raíz y la parte aérea (Bolton, 1972).

4.4.5 Tipo de suelos.

La alfalfa requiere suelos profundos y bien drenados, aunque se cultiva en una amplia variabilidad de suelos. Así los suelos con menos de 60 cm. de profundidad no son aconsejables para la alfalfa (Bolton, 1972).

4.5 APROVECHAMIENTO DE LA ALFALFA.

4.5.1 En verde.

La alfalfa en verde constituye una excelente forma de utilización por su buena calidad e ingestibilidad, pero conlleva gastos importantes tanto en mecanización como en mano de obra. Al contrario sucede con el pastoreo directo, pues constituye la forma más económica de aprovechamiento de una pradera, junto al pastoreo rotacional (Del Pozo, 1977).

4.5.2 Ensilado.

Es un método de conservación de forrajes por medios biológicos, siendo muy adecuado en regiones húmedas, cuya principal ventaja es la reducción de pérdidas tanto en siega como en almacenamiento (Del Pozo, 1977).

La posibilidad de ensilar la alfalfa facilita la conservación de los primeros y últimos cortes (realizados durante la primavera y a principios de otoño), los cuales son más difíciles de henificar, ya que la probabilidad de lluvias durante este periodo se incrementa (Del Pozo, 1977).

Para conseguir un ensilado de calidad, el forraje debe contener un elevado porcentaje en materia seca (30-40%), debiendo estar bien troceado para conseguir un buen apisonamiento en el silo (Del Pozo, 1977).

4.5.3 Henificado.

El uso de la alfalfa como heno es característico de regiones con elevadas horas de radiación solar, escasas precipitaciones y elevadas temperaturas durante el periodo productivo (Del Pozo, 1977).

El proceso de henificado implica cambios físicos, químicos y microbiológicos que producen alteraciones en la digestibilidad de la materia orgánica del forraje respecto al forraje verde. Este proceso debe conservar el mayor número de hojas posible, pues la pérdida de las mismas supone una disminución en calidad, ya que las hojas son las partes más digestibles y como consecuencia se reduce el valor nutritivo (Del Pozo, 1977).

El periodo de secado depende de la duración de las condiciones climáticas (temperatura, humedad y velocidad del viento), de la relación hoja/tallo (es más lento a mayor proporción de tallos) y del rendimiento (el incremento del rendimiento por hectárea aumenta la cantidad de agua a evaporar) (Del Pozo, 1977).

4.5.4 Deshidratado.

Es un proceso que consiste en la recolección del forraje verde, su acondicionamiento mecánico y el secado mediante ventilación forzada. La alfalfa deshidratada incrementa la calidad del forraje, economía del transporte y almacenamiento, permaneciendo sus características nutritivas casi intactas. Los

productos obtenidos se destinan fundamentalmente a las industrias ganaderas (Del Pozo, 1977).

4.6 VALOR NUTRICIONAL.

La alfalfa es una excelente planta forrajera que proporciona elevados niveles de proteínas, minerales y vitaminas de calidad, su valor energético también es muy alto estando relacionado con el valor nitrogenado del forraje además, es una fuente de minerales como: calcio, fósforo, potasio, magnesio, azufre, etc. Los elevados niveles de β -carotenos (precursores de la vitamina A) influyen en la reproducción de los bovinos.

En la Tabla 4.2 se muestra la composición de la materia seca de hojas y tallos de la alfalfa (Bolton, 1972).

Tabla 4.2 Composición química de la alfalfa.

%	HOJAS	TALLOS
Proteína bruta	24	10.7
Grasa bruta	3.1	1.3
Extracto no nitrogenado	45.8	37.3
Fibra bruta	16.4	44.4
Cenizas	10.7	6.3

(Bolton, 1972)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.7 GENÉTICA Y CITOTAXONOMÍA.

La alfalfa es una planta alógama, es decir, que el polen que fecunda a los óvulos de una planta proviene de otro individuo dentro de la misma población. Así es que para que pueda llevarse a cabo esta polinización cruzada, actúan como agentes polinizadores las abejas (*Apis mellifera*). Es una planta que presenta autoincompatibilidad y es además poliploide lo cual habla de la enorme heterogeneidad que se observa dentro de las poblaciones de esta forrajera (Brauer, 1986). La alfalfa común o cultivada *Medicago sativa* L. es autotetraploide, es decir, que cuenta con cuatro juegos cromosómicos ($n = 8$; $4n = 32$) provenientes de la unión de gametos diploides de la misma especie. Esto le ha permitido una amplia distribución y adaptación a diferentes regiones del mundo, que van desde zonas desérticas hasta lugares fríos pasando por regiones templadas, explicándose así la presencia de este cultivo en todos los continentes en la actualidad. Su relación con la alfalfa silvestre diploide ($2n = 16$) es muy estrecha, taxonómicamente a ésta se le conoce como *Medicago coriata*. *Medicago sativa* tiene flores moradas y sus frutos son legumbres muy espiraladas. Otra especie *M. falcata*, conocida como la alfalfa de flor amarilla, es diploide ($2n = 16$) y es endémica de regiones frías, pues crece bien en lugares comprendidos entre 42° y 62° de latitud norte y su hibridación de manera natural con *M. sativa* produjo poblaciones con resistencia a bajas temperaturas y a enfermedades foliares (Brauer, 1986).

SECCIÓN 1

ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS EMBRIOGÉNICOS DE ALFALFA COMO MODELO BIOLÓGICO.

5 ANTECEDENTES GENERALES.

5.1 Embriogénesis somática.

5.1.1 Cultivo de tejidos vegetales.

El cultivo de tejidos vegetales es una técnica que consiste en sembrar *in vitro* en forma aséptica ápices de raíces y de tallos, primordios de hojas y flores, frutos inmaduros, órganos aislados, embriones maduros e inmaduros, segmentos de tallo y hojas, así como óvulos, anteras polen, protoplastos y aún plantas completas en medios nutritivos adecuados y bajo condiciones ambientales controladas (Street, 1997).

Entre las áreas principales de investigación en las que repercute esta técnica se encuentran:

- a) Multiplicación vegetativa;
- b) Preservación del germoplasma;
- c) Mejoramiento genético;
- d) Recuperación de plantas amenazadas o en peligro de extinción.
- e) Fusión de protoplastos (fitomejoramiento);
- f) Producción de metabolitos de interés comercial y
- g) Obtención de plantas transgénicas con características deseadas.

Esta técnica esta basada en la totipotencialidad de las células vegetales, es decir, una célula de un organismo multicelular posee todas las instrucciones e información necesaria para desarrollar un organismo completo multicelular, solo basta colocarla en las condiciones adecuadas para expresar dicha totipotencialidad.

Existen dos vías para la regeneración de plantas a través de la técnica de cultivo de tejidos vegetales:

- a) Organogénesis.
- b) Embriogénesis somática

5.1.2 Embriogénesis somática.

Un embrión se define como el estado inicial del desarrollo de una planta (Wardlaw 1955, 1968 en Tisserat *et.al.*, 1979) que morfológicamente se caracteriza por tener dos polos meristemáticos opuestos, el apical que dará lugar a la parte aérea de la planta y el radicular que originará la raíz. El embrión cigótico surge a partir de una serie de divisiones mitóticas que sufre el cigoto, el cual experimenta una serie de estadios de desarrollo específicos que estructuralmente se conocen como estados globular, corazón y torpedo (Sharp *et.al.*, 1980).

La embriogénesis somática es una forma de multiplicación clonal masiva en donde se lleva a cabo la diferenciación en embriones somáticos, que morfológicamente son similares a los embriones sexuales (Sharp, 1980).

La embriogénesis asexual o embriogénesis somática *in vitro*, fue reportada por primera vez por Steward, Mopes y Meras (1958, en Tisserat *et.al.*, 1979) en cultivos en suspensión y por Reinert (1959, en Tsserat *et.al.*, 1979) en cultivos de callo en medio sólido en zanahoria (*Daucus carota*).

A partir de entonces los trabajos sobre embriogénesis somática progresaron tanto en los sistemas de zanahoria así como para otras especies de plantas, algunas de las cuales pertenecen a las familias de plantas como *Graminene*, *Rutaceae*, *Solanaceae*, y *Umbelliferne* en las cuales la embriogénesis adventicia *in vivo* se pone de manifiesto de manera espontánea y en aquellas otras familias como en *Araliaceae*, *Brassicaceae*, *Caricaceae* y *Vitaceae* que no exhiben este fenómeno de manera natural.

El proceso de inducir la regeneración de plantas a través de cultivos de tejidos *in vitro* puede realizarse de manera indirecta con la producción de una masa de células desorganizadas (comúnmente conocida como callo) a partir del explante inicial, o bien directamente, con la formación de los embriones somáticos a partir de los segmentos de tejido vegetal en cultivo. Sharp *et. al.* (1980), Evans *et.al.* (1981), Ammirato (1984), Williams y Maheswaran (1986) mencionan una hipótesis para tratar de explicar estos dos procesos de desarrollo embriogénico *in vitro*. Enuncian que el proceso de embriogénesis directo procede a partir de células que ya están determinadas hacia un desarrollo embriogénico y que sólo requieren de condiciones favorables que les permitan continuar la división celular y su

expresión embriogénica. Por el contrario la embriogénesis indirecta requiere de una redeterminación de células diferenciadas, proliferación de callo y desarrollo hacia un estado embriogénicamente determinado. Para estas células que se inducen hacia una determinación embriogénica es necesaria la presencia de hormonas exógenas o reguladores de crecimiento. La importancia de los reguladores de crecimiento radica tal vez en su función como agentes permisivos de la expresión de este patrón de desarrollo intrínsecamente determinado.

El proceso embriogénico indirecto implica entonces, el establecimiento de callos en división activa obtenidos a partir de un tejido específico. Para ello se distinguen dos procesos importantes: 1) la primera fase de inducción hacia la citodiferenciación por parte de las células embriogénicas mediante la manipulación de la relación auxina/citocinina y 2) donde se continúa la secuencia de desarrollo de tales células proembriogénicas (Kohlenbach, 1978 en Dodds y Roberts, 1982) y se ponen de manifiesto los embriones somáticos.

Se conoce de manera general, que son tres los factores químicos que intervienen en la inducción y regeneración de embriones somáticos: el tipo y la concentración de la auxina utilizada, la concentración de citocinina exógena y el nivel de nitrógeno total, que es combinación de nitrato y amonio.

5.1.3 Embriogénesis somática en alfalfa.

La alfalfa es una especie que se ha regenerado por cultivo de tejidos vegetales. Hasta la década de los 80's su vía de propagación fue la organogénesis, posteriormente se ha desarrollado su propagación vía embriogénesis somática.

Ammirato (1984) concluye que tejidos embrionarios, meristemáticos, y reproductivos tienen mayor potencialidad embriogénica en los cultivos. En algunas especies, diferencias en los genotipos empleados muestran potencialidades diferentes en cuanto a respuesta embriogénica, como es el caso de la alfalfa *Medicago sativa*. Ammirato (1984) enuncia asimismo, que el estado fisiológico de la planta a partir de la cual se toma el inóculo es un factor extremadamente importante en el éxito de la respuesta embriogénica.

Los embriones somáticos de alfalfa pueden formarse de una variedad de inóculos que puede incluir embriones inmaduros, estambres, cotiledones, hipocotilo, hojas, tallos y peciolo (Villegas, 1986).

La capacidad embriogénica de la alfalfa ha mostrado ser genotipo dependiente, es decir, mientras mayor contribución genética posea la variedad con la que se va a trabajar (*Medicago sativa* L.) habrá mayor éxito de la respuesta *in vitro*, y la regeneración de los embriones somáticos será mayor (Villegas, 1986).

5.1.4 Factores que controlan la embriogénesis.

5.1.4.1 Medios de cultivo.

Para el desarrollo de la embriogénesis somática *in vitro* se han empleado diversas formulaciones nutricionales (Ammirato, 1984), desde medios simples como el White (1963) hasta aquellos más concentrados como el B₅ (Gamborg *et.al.*, 1968), incluyendo aquellos conocidos como Schenk y Hildebrandt (SH, 1972), Murashige y Skoog (MS 1962), estos tres últimos son considerados como medios de altas concentraciones en sales inorgánicas.

Las bases para todos los medios de cultivo son una mezcla de sales minerales, combinando elementos esenciales, macronutrientes, micronutrientes junto con una fuente de carbono que comúnmente es la sacarosa, (Yeoman y McLeod, 1977 en Conger, 1980) además de varios constituyentes orgánicos como vitaminas y reguladores de crecimiento (Conger, 1980).

Un factor importante para la inducción de cultivos embriogénicos es la fuente de nitrógeno, suplementada bajo la forma de nitratos, ion amonio o de complejos orgánicos nitrogenados como son los aminoácidos (Dodds y Roberts, 1982; Stuart y Strickland, 1984 y Stuart *et.al.*, 1985). El suplemento de la fuente de nitrógeno tanto en la forma de sal inorgánica oxidada o en su forma ionizada y reducida, es necesaria tanto en el medio de inducción como en el medio de regeneración. De hecho el proceso de inducción involucra la interacción del ion amonio (forma reducida) con los reguladores de crecimiento. La fuente de nitrógeno total es

determinante en la etapa de desarrollo de los embriones somáticos. Walker y Sato (1981), enuncia que el ion amonio suplementado de manera exógena tiene un efecto tanto cuantitativo como cualitativo en el patrón de morfogénesis de alfalfa *in vitro*. Asimismo, resaltan que la embriogénesis no se da en ausencia del ion amonio o del nitrato, siendo ambas fuentes igualmente necesarias. La concentración específica de uno u otro tipo de fuente nitrogenada varía de acuerdo al genotipo de la planta sometido a cultivo embriogénico, debido a las actividades particulares de reductasas que hacen disponible el nitrógeno de estos compuestos a las plantas, aunque puede generalizarse que el contenido total de nitrógeno requerido para cultivos embriogénicos tanto en el medio de inducción como en el de regeneración debe ser de 25 mM a 100 mM (Halperin, 1965).

Bajo la forma de complejos orgánicos también se ha empleado como fuente de nitrógeno en los medios de cultivo: caseína hidrolizada (Ammirato y Steward, 1971 en Ammirato, 1984); una mezcla de aminoácidos (Kato y Takeuchi, 1966 en Ammirato, 1984), aminoácidos en forma individual (Wheterell y Dougall, 1976 en Ammirato, 1984, Stuart y Strickland, 1984*; Skokut *et al.*, 1985), de donde resalta el papel esencial de la L-glutamina, L-asparagina, L-prolina y L-alanina en calidad y frecuencia de los embriones obtenidos durante la fase de desarrollo y finalmente el extracto de levadura (Saunders y Bingham, 1972, 1975).

Otros elementos minerales importantes en la embriogénesis somática son el ion potasio especialmente cuando el suplemento de nitrógeno es inadecuado

(Tisserat *et.al.*, 1967) y el hierro que debe adicionarse en forma quelada como Fe-EDTA, ya que su ausencia impide que los embriones en estado globular pasen al estado de corazón. Esto ha sido reportado por Nitsch (1969), Haberle-Bors (1980) y Havranek y Vagera (1979) citados por Ammirato (1984) para cultivo de tabaco, belladona y zanahoria respectivamente.

5.1.4.2 Reguladores de crecimiento.

Las fitohormonas o reguladores naturales de las plantas, pueden actuar como agentes activadores de células competentes a responder hacia vías específicas de morfogénesis y de acuerdo a su concentración relativa pueden suprimir, permitir o modificar condiciones de citodiferenciación específica (Sharp *et.al.*, 1980).

Para los sistemas de embriogénesis somática, donde la producción de embriones está mediada por la formación de callo, se ha demostrado que los reguladores de crecimiento, especialmente las auxinas o las sustancias que actúan de manera similar a las auxinas en combinación con las citocininas y una adecuada concentración de compuestos nitrogenados en el medio de cultivo, son esenciales para la inducción de dicho fenómeno (Fujimura y Komamine en Ammirato, 1984). Además, se ha observado que un alto nivel de auxina inhibe el desarrollo de los embriones somáticos. Al respecto, Bingham *et.al.*, (1975) concluye que, el nivel óptimo de hormonas se desconoce, aunque se ha observado que elevados niveles de la auxina sintética ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) promueven la embriogénesis durante el estado preglobular en los cultivos, en cambio, que el

mantenimiento de una alta concentración de este agente inductor, inhibe el desarrollo de los embriones o en ocasiones provoca que los embriones globulares reviertan a forma de callo nuevamente.

El 2,4-D ha sido la auxina sintética más ampliamente usada, pero también se han manejado otras auxinas como el ácido α -naftalenacético (ANA), el ácido indol acético (AIA) que es una auxina natural y en menor escala el ácido 2-benzotiazolacético (BTOA), el ácido p-clorofenoxiacético (p-CPA) y el picloram (Evans *et.al.*, 1981). Bingham *et.al.* (1980) observaron que en cultivos de alfalfa el papel del ANA y AIA no era necesario en la inducción de la embriogénesis, más bien permiten la formación del callo, pero si éste no es sometido al 2,4-D no se observará embriogénesis. El rango de concentración de las auxinas varía enormemente. Kao y Michayluk (1981) en los sistemas para alfalfa, establecen que la concentración óptima de los reguladores del crecimiento resultan ser específicos de acuerdo al genotipo del material empleado por lo que debe ser determinado empíricamente.

En relación a las citocininas, Fujimura y Komamine (1980) citados por Ammirato (1984), sostienen que estos compuestos son importantes para promover la maduración de los embriones y especialmente el desarrollo de los cotiledones, por lo que pueden emplearse tanto en medio de inducción como en medio de regeneración. En ocasiones asimismo, se ha reportado que las citocininas se requieren para el desarrollo de los embriones y para su conversión en plantas

(Kavatherkar *et.al.*, 1978 en Ammirato, 1984). La citocinina más empleada es la cinetina con un rango efectivo de concentración de $0.5\mu\text{M}$ a $5.0\mu\text{M}$ (Ammirato, 1984).

5.1.4.3 Condiciones ambientales.

En este aspecto no es posible generalizar en cuanto a las condiciones de luz o de temperatura que engloben todos los sistemas de regeneración de plantas por embriogénesis somática. Ammirato (1984) menciona que la embriogénesis somática se ha observado bajo una variedad de regímenes luz/oscuridad (fotoperiodo) así como diferencia en cuanto a la calidad de la luz. En lo referente a la temperatura, este mismo autor enuncia que existen pocos trabajos sobre el efecto de este factor en los cultivos.

5.1.4.4 Factores que controlan la regeneración de alfalfa.

Genotipo.

Se ha corroborado ampliamente que la regeneración de alfalfa está plenamente influenciada por el genotipo del material con el que se trabaje. La alfalfa es una planta de polinización abierta, además es una especie con variedades muy heterogéneas, por lo que de entrada se cuenta con una variabilidad inherente en el germoplasma y esto debe considerarse para cualquier trabajo que se realice con esta planta (Kao y Michayluk, 1981).

Saunders y Bingham (1972,1975), concluyen que la obtención de brotes en los cultivos de alfalfa esta condicionada por la interacción del genotipo y los medios de cultivo de inducción y regeneración.

La regeneración de alfalfa ha sido estudiada durante los últimos veinte años y aún no ha sido posible establecer un sistema universal para la regeneración *in vitro* de todas las variedades. En el orden en el que se incrementa la incidencia de embriones somáticos se ve reflejada en la regeneración de plantas. La variedad Moapa ha presentado respuesta positiva a la embriogénesis somática, no así a la regeneración de plantas (Hernández, 1993).

Fuente de nitrógeno.

Walker y Sato (1981) mencionan que los niveles óptimos para la producción de embriones es de 25 mM a 100 mM de nitrógeno reducido bajo la forma de ion amonio, ya que a niveles inferiores a 12.5 mM sólo se observa la formación de raíces. Walker *et.al* (1978-1979) concluyen que la fuente de nitrógeno reducido en el medio de regeneración es fundamental para tener éxito en la obtención de embriones somáticos. Stuart y Strickland (1984 a,b) complementan esta información al adicionar aminoácidos al medio de regeneración como fuente de nitrógeno reducido en combinación con el ion amonio, observando que la combinación de la L-prolina y NH_4^+ o la L-glutamina sola, estimulan

favorablemente la embriogénesis en cultivos de la línea RA 3 (Regen S) de *Medicago sativa*.

5.1.5 Secuencia para la obtención de embriogénesis somática y regeneración de plántulas.

El primero implica someter al explante a una alta concentración de 2,4-D en el medio de cultivo, esta fase se considera como fase de inducción de la embriogénesis. El segundo paso es el desarrollo y germinación de los embriones somáticos, esto implica transferir el callo formado a partir del explante inicial a un medio de cultivo sin 2,4-D y en ocasiones sin ningún otro regulador de crecimiento. Existen variaciones en este protocolo donde se incluyen hasta tres fases (Atanassov y Brown, 1984; Dos Santos *et.al.*, 1980; Walker y Sato, 1981), la de inducción, una segunda en donde se incluye al ANA, cinetina y/o BAP para mejorar la calidad de los embriones y la última sin hormonas exógenas para la maduración y/o germinación de los embriones somáticos.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Establecer y caracterizar cultivos de callos embriogénicos de alfalfa (*Medicago sativa* L.) como modelos biológicos, de transformación biológica.

6.2 Objetivos específicos

- Establecer cultivos asépticos de semillas de alfalfa.
- Determinar el medio de cultivo en base a las sales inorgánicas (nitratos principalmente), reguladores de crecimiento y compuestos orgánicos del medio de cultivo para la inducción de embriones somáticos.
- Seleccionar el mejor explante (peciolo, hojas cotiledonarias, hojas verdaderas y tallo) para la obtención de cultivos de callos embriogénicos.
- Regeneración de plantas a partir de los cultivos de callos embriogénicos de alfalfa en medio nutritivo sin reguladores de crecimiento.
- Realizar cinéticas de crecimiento de cultivos de callos embriogénicos en base a curvas de peso fresco.

7 HIPÓTESIS.

Si la respuesta del proceso de embriogénesis somática es dependiente de la presencia de auxinas como reguladores de crecimiento y del tipo de explante utilizado entonces, la formación de callo embriogénico se verá favorecida en estas condiciones; asimismo se obtendrán diferentes respuestas utilizando distintos tejidos y concentración de auxinas.

8 MATERIALES Y MÉTODOS.

8.1 Aspectos generales.

8.1.1 Selección del material biológico.

Los cultivos de callos embriogénicos se establecieron a partir de explantes obtenidos de plántulas de 15 días de germinadas bajo condiciones *in vitro* de alfalfa (*Medicago sativa* L.) de las variedades Aragón y Moapa.

8.1.2 Preparación de medios de cultivo.

Los medios de cultivo se prepararon a partir de soluciones concentradas 100X (ver Anexo 1) y se probaron tres diferentes en base a las sales inorgánicas: SH (Schenk y Hildenbrant 1972), Myt (MS modificado) y MJ (SH modificado) (ver Tabla 8-1), todos los medios fueron suplementados con 30 g.L^{-1} de sacarosa como fuente de carbono. Como reguladores de crecimiento se utilizaron dos auxinas 2,4-D en los medios SH y MJ en diferente concentración y MCPP para el medio Myt. También se adicionaron dos citocininas BAP para el medio MyT y cinetina para los otros medios, asimismo L-prolina según el medio utilizado (ver Tabla 8-1). Con lo que respecta a los compuestos orgánicos se utilizaron vitaminas SH y una mezcla de aminoácidos y vitaminas denominados cocktail 20 (ver Anexo 1). El pH fue ajustado antes de su esterilización con NaOH 1N a 5.8 ± 0.1 para todos los medios. Como agente gelificante se utilizó Gellan a razón de 2.5 g.L^{-1} . Los medios de cultivo se vertieron en frascos de alimento infantil, depositando 30 mL en cada recipiente. Finalmente los medios se esterilizaron en autoclave vertical a una presión de 1.3 kg.cm^{-2} o 18 lb.pulg^{-2} durante 18 minutos.

Tabla 8-1 Composición de los medios de cultivo utilizados en la inducción de cultivos de callos embriogénicos en dos variedades de alfalfa.

SH	MJ	MyT
Sales inorgánicas SH ¹	Sales inorgánicas SH ¹	Sales inorgánicas MS ¹
Vitaminas SH ¹	Vitaminas SH ¹	Cocktail 20 ¹
Cinetina 0.2 mg.L ⁻¹	Cinetina 0.2 mg.L ⁻¹	BAP 0.3 mg.L ⁻¹
2,4-D 11.2 mg.L ⁻¹	2,4-D 1.0 mg.L ⁻¹	MCPP 3.0 mg.L ⁻¹
	L-prolina 288 mg.L ⁻¹	Adenina 10 mg.L ⁻¹
		¹ Antioxidante 15 mg.L ⁻¹

(1) ver Anexo 1

8.1.3 Condiciones de incubación.

Los cultivos se incubaron en un cuarto de ambiente controlado con un fotoperiodo de 16 horas luz/8 h de oscuridad, una temperatura de 25±2°C y una intensidad luminosa de 24 W.m⁻² por 15 días.

8.2 Obtención de explantes.

8.2.1 Métodos de esterilización.

Las semillas de alfalfa de ambas variedades se esterilizaron probando 2 métodos que a continuación se describen:

Método 1.

1. Se sumergieron aproximadamente 100 semillas de cada variedad (por separado) en etanol al 70% (v/v) durante un minuto.
2. Se enjuagaron tres veces con agua desionizada estéril, durante un minuto por cada enjuague.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3. En seguida se colocaron las semillas en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 30%(v/v) (Cloralex® con 6% de ingrediente activo) durante 7-8 minutos con agitación constante.
4. Finalmente se realizaron cuatro enjuagues de 2 minutos cada uno con agua desionizada estéril.

Método 2

1. Se sumergieron aproximadamente 100 semillas de cada variedad (por separado) en etanol al 70% (v/v) durante un minuto.
2. Se enjuagaron tres veces con agua desionizada estéril, durante un minuto por cada enjuague.
3. En seguida se colocaron las semillas en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 35%(v/v) (Cloralex® con 6% de ingrediente activo) más un surfactante (Tween 20) y una solución de plata coloidal (Microdín®) (1 y 5 gotas respectivamente por cada 100 mL) durante 7-8 minutos con agitación constante.
4. Finalmente se realizaron cuatro enjuagues de 2 minutos cada uno con agua desionizada estéril.

8.2.2 Establecimiento de cultivos asépticos con semillas de alfalfa.

Una vez esterilizadas las semillas de ambas variedades de alfalfa, se sembraron en frascos de alimento infantil con 30 mL de medio MS (Murashige y Skoog 1962) (ver Anexo 1) a razón de 30 semillas por frasco y se mantuvieron bajo condiciones de incubación con un fotoperiodo de 16 horas luz/8 h de oscuridad, una temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ y una intensidad luminosa de $24 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$.

8.3 Establecimiento de callos embriogénicos de alfalfa.

8.3.1 Inducción de callo embriogénico.

Transcurridos los 15 días de la germinación de las semillas, los explantes se disectaron separando a las plántulas en hojas cotiledonarias, hojas verdaderas, peciolo y tallos. Para las hojas verdaderas se realiza un corte en la parte superior e inferior, mientras que para el tallo y peciolo se cortan fragmentos de 0.5 cm de longitud aproximadamente. Posteriormente, los explantes fueron colocados en contacto con el medio de inducción por un periodo de 21 días en las condiciones antes mencionadas. En cada frasco con medio se colocan entre 10 y 15 explantes aproximadamente. Los subcultivos de los callos formados se realizan cada 21 días y/o de acuerdo a la producción de éste, quitando las partes que presenten oxidación y el tejido madre.

8.3.2 Proliferación de callo embriogénico.

En esta etapa los reguladores de crecimiento se mantuvieron en la misma concentración que en la etapa de inducción, al igual que los demás componentes del medio de cultivo y condiciones de incubación.

8.3.3 Mantenimiento y regeneración.

Los cultivos de callos se mantuvieron reduciendo de manera gradual la cantidad de reguladores de crecimiento. La reducción fue hecha en primer lugar al 50% de su concentración original en el medio de proliferación, posteriormente se eliminaron y se subcultivaron los callos a medio MS al 100%.

Las plantas que se lograron regenerar fueron transplantadas a una mezcla de tierra-hojarasca estéril (2:1) cuando presentaron un tamaño aproximado de 10 cm de longitud. Se mantuvieron en condiciones de invernadero.

8.4 Curva de crecimiento de callos embriogénicos obtenidos del medio SH.

Habiendo seleccionado el mejor explante y medio para la regeneración de plántulas se realizó la cinética de crecimiento de los callos embriogénicos a través de curvas de peso fresco. Se inoculó con 1.0 g de callo proveniente del medio SH en frasco de 50 mL que contenía 15 mL de medio de inducción. Se realizaron 5 repeticiones por explante para cada variedad, de las cuales se tomó el peso fresco de cada gramo de callo tres veces por semana durante 24 días (registrando los

incrementos en peso) para determinar todas las fases de crecimiento para el callo formado.

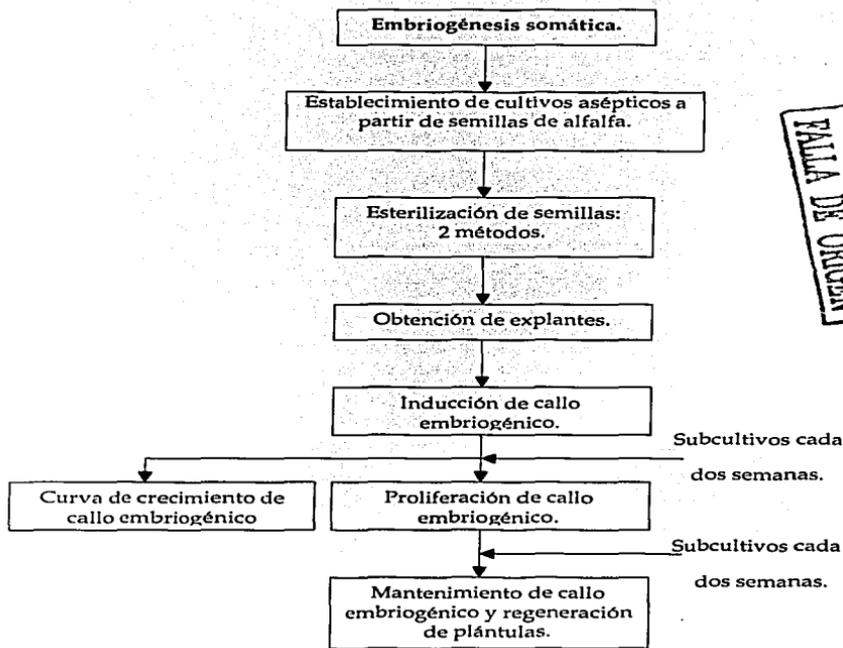


Figura 8.1 Ruta crítica para la obtención de plantas a partir de la embriogénesis somática.

9 RESULTADOS Y ANÁLISIS.

9.1 Método de esterilización.

Para el establecimiento de cultivos asépticos de alfalfa, se necesitó partir de semillas de ambas variedades comerciales (Aragón y Moapa), para lo cual, se probaron dos métodos de esterilización superficial de la semilla, con los que se obtuvieron los resultados presentados en la Tabla 9-1.

Tabla 9-1 Métodos de esterilización de semilla.

MÉTODO DE ESTERILIZACIÓN	VARIEDAD	SEMILLAS SEMBRADAS	SEMILLAS CONTAMINADAS (%)
EtOH 70% (v/v), 1min. NaClO ₂ 30% (v/v), 5min.	Aragón	300	60
	Moapa	300	70
EtOH 70%, 1min. NaClO ₂ 30% (v/v), 8min. Tween, 1 gota Microdín@, 5gotas	Aragón	300	0
	Moapa	300	0

Como se muestra en la Tabla 9-1 utilizando el primer método de esterilización se logró una asepsia del 40% para la variedad Aragón y un 30% para la variedad Moapa, por lo que se decidió probar un segundo método de esterilización ya que el anterior mostró muy baja eficiencia, así se logró una asepsia total de las semillas ya que no hubo presencia de contaminación (ver Figura 9-1).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

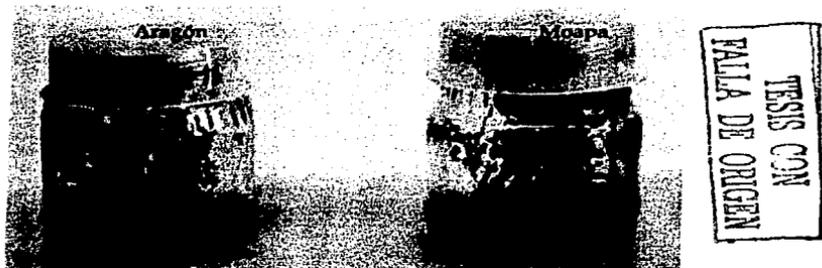


Figura 9-1 Establecimiento de cultivos asépticos con semillas de ambas variedades de alfalfa.

Los resultados obtenidos se derivan de que factores físicos y químicos como agitación, adición de desinfectantes y de tensoactivos, tienen efectos sobre la viabilidad de los microorganismos, además de los tensoactivos como el Tween 20 (Mejía, *et al.* 1998).

En primer lugar se pusieron en contacto las semillas con etanol que dado sus propiedades que lo caracterizan como antiséptico, inhibe la actividad de la mayoría de los microorganismos, pero no la totalidad, sin dañar los tejidos vegetales (Mejía, *et al.* 1998) dado que actúan lesionando la membrana celular de los microorganismos desorganizando la estructura fosfolípidica y desnaturalizando proteínas celulares. Posteriormente las semillas fueron colocadas en una solución que contenía NaClO_2 el cual, es un desinfectante que actúa sobre proteínas y ácidos nucleicos de los microorganismos, oxidando grupos sulfidrilo,

además de atacar grupos aminos, indoles y al hidroxifenol de la tirosina, es activo sobre todas las bacterias, incluyendo sus esporas, y además es efectivo en un amplio rango de temperaturas. La actividad bactericida del hipoclorito de sodio se debe al ácido hipocloroso (HClO) y al Cl₂ que se forman cuando el hipoclorito es diluido en agua. La actividad germicida del ion hipocloroso es muy reducida debido a que por su carga no puede penetrar fácilmente en la célula a través de la membrana citoplasmática. En cambio, el ácido hipocloroso es neutro y penetra fácilmente en la célula, mientras que el Cl₂ ingresa como gas (www.microbiologia.com.ar/bacteriologia/esterilizacion).

Aunado al hipoclorito de sodio, los cationes de plata (Ag⁺), elementos activos del Microdín®, que se encuentra en una concentración del 0.36%, actúan sobre elementos celulares oxidándolos y provocando así la muerte microbiana, además de que actúa de forma simultánea con un surfactante (Tween 20) que disminuye la tensión superficial y permite la difusión hacia el interior de la célula manteniendo una mayor área de contacto y mayor tiempo de exposición a éstos agentes. Con esto se logró la asepsia total de las semillas permitiéndonos establecer los cultivos de callos embriogénicos de alfalfa .

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

9.2 Establecimiento y caracterización de la cinética de crecimiento de los cultivos de callos embriogénicos de alfalfa.

9.2.1 Inducción de callo embriogénico.

Con la finalidad de encontrar un medio que favoreciera la formación de embriones somáticos y proporcionara una buena proliferación celular se probaron tres composiciones de los medios de cultivo, éstos consistieron de las sales inorgánicas del SH y MS con 30 g.L⁻¹ de sacarosa como fuente de carbono, además de la adenina y L-prolina. Como reguladores de crecimiento se utilizaron citocininas como BAP y las auxinas 2,4-D y MCP. De los componentes orgánicos también se probaron las vitaminas del medio SH y R₂, así como una mezcla de aminoácidos y vitaminas denominada cocktail 20. Cabe mencionar que los tres explantes que se probaron para la inducción (peciolo, hoja cotiledonaria y tallo) dieron una respuesta positiva a la formación de callo.

Todos los medios de cultivo probados indujeron la misma respuesta en cuanto a formación de callo al mantenerse en contacto con los tres medios probados para la inducción (SH, MJ y Myt). Estos callos tuvieron una consistencia friable, textura granular, de color blanquecino a amarillento y principalmente presentaron una alta tasa de crecimiento (Figuras 9-2 y 9-3).

Los tres explantes evaluados (peciolo, hoja cotiledonaria y tallo) presentaron una respuesta satisfactoria para la inducción de callo debido a que los tres presentan zonas meristemáticas. Las zonas meristemáticas tienen una alta capacidad de división celular ya que en ellas se biosintetizan y/o liberan factores

de crecimiento naturales (George and Sherrington, 1984). Asimismo, la presencia de auxinas fuertes como el 2,4-D ó MCPP en combinación con las citocininas, estimula la producción de callo y división constante de las células.



Figura 9-2. Inducción de callo embriogénico a partir de explantes asépticos

El MCPP es una auxina sintética, que tiene como función la modulación morfogenética cuando se presenta en altas concentraciones. Su función es actuar sobre las peroxidasas que se encuentran presentes en las paredes celulares llevándose así la formación de proembriones (George and Sherrington, 1984).

El 2,4-D estimula la división celular, síntesis de proteínas y ARNm en las células del tejido en crecimiento, además de que favorece la síntesis de algunos polipéptidos mientras que reprime la de otros. Produce cambios en los productos de traducción que ocurren rápidamente después de su aplicación. Así, el aumento

de m-ARN puede ser debido a una mayor tasa de estimulación como consecuencia de la aplicación de dicha auxina sugiriéndose así que la transcripción es un mecanismo de acción primario de esta auxina (Hartmann, *et.al.* 1997).



TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

Figura 9-3 Inducción de callo embriogénico a partir de tallo y peciolo para ambas variedades.

9.2.2 Proliferación de los cultivos de callos embriogénicos.

El callo producido en la etapa de inducción se subcultivó para llevar a cabo su proliferación. Los callos formados en la primera etapa se subcultivaron a los tres medios utilizados anteriormente respetando los mismos niveles en cuanto a sales inorgánicas y reguladores de crecimiento además de quitar partes que presentaron oxidación y tejido madre (ver Figura 9-4). En esta etapa se encontró que el mejor medio para la proliferación de callo es el medio Myt para ambas variedades siendo el peciolo el que proporciona mayor rendimiento para la variedad Aragón y

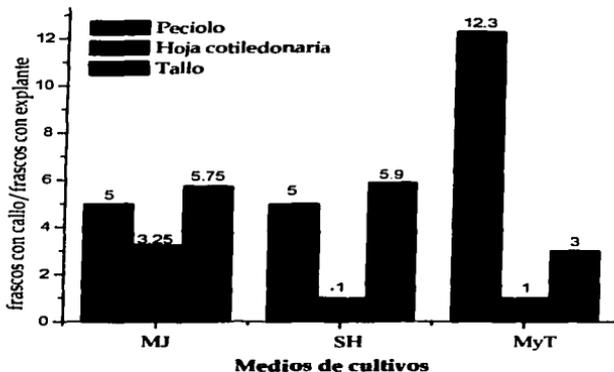
peciolo tallo para la variedad Moapa, seguido por el medio MJ con un mayor rendimiento para tallo y peciolo en la variedad Aragón y de hoja cotiledonaria, peciolo y tallo respectivamente para la variedad Moapa. Por último el medio SH es en el que menor rendimiento se obtuvo en cuanto a proliferación de callo se refiere como se muestra en la Figura 9-5 y 9-6.

En los tres medios de cultivo empleados se cuenta nitrógeno reducido en forma de iones de amonio y junto con los aminoácidos añadidos (L-prolina) estimulan la proliferación de callo y formación de embriones somáticos, tal como lo describen Walker y Sato (1981).



TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

Figura 9-4 Proliferación de callo embriogénico después de tres subcultivos en un periodo aproximado de 45 días.



PEPIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 9-5 Proliferación de callo embrionógico para la variedad Aragón en los tres medios de cultivo utilizados.

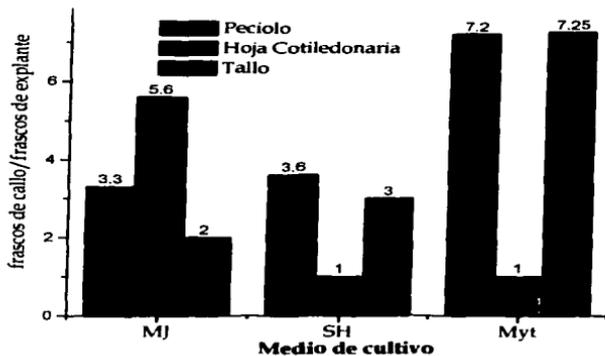


Figura 9-6 Proliferación de callo embrionógico para la variedad Moapa en los tres medios de cultivo utilizados.

El medio Myt resultó ser el más efectivo para la inducción y proliferación de callo embriogénico debido a que contiene la auxina MCPP la cual, en altas concentraciones favorece la formación de proembriones debido a que actúa sobre las peroxidasas de la pared celular (George and Sherrington, 1984). De igual forma en el medio de cultivo MJ se obtuvo buen rendimiento de callo embriogénico, esto debido a que se encuentra presente la auxina 2-4-D que actúa de manera similar al MCPP sobre las peroxidasas de la pared celular. El menor rendimiento se obtuvo en el medio SH ya que tiene una gran cantidad de 2,4-D (11.2 mg L^{-1}) y provoca fácilmente la rápida oxidación del tejido. Por otra parte se ha reportado que una alta cantidad de esta auxina inhibe el desarrollo de los embriones y en ocasiones provoca que los embriones globulares reviertan a forma de callo nuevamente (Bingham *et.al.*, 1975).

En ambas variedades el explante que produjo mayor cantidad de callo fue el peciolo, debido a que es un tejido altamente meristemático, así pues contiene mayor potencialidad embriogénica, además de que la morfología de este explante lo destina a ser un órgano que tiene como función el alargamiento, crecimiento de la planta y sostén de las hojas. Así pues, observando las Figuras 9-5 y 9-6 no se puede aseverar que existe diferencia en esta etapa en dicho explante de las dos variedades.

Para los cultivos de callos embriogénicos proveniente del explante tallo, presenta el segundo mejor rendimiento después del explante peciolo. El tallo

realiza principalmente dos funciones en la planta, la de soporte y crecimiento, y al igual que el peciolo contiene células meristemáticas tanto en la zona apical como en la radicular que da origen a la raíz. Además de que contiene gran cantidad de nodos donde la división celular es muy alta.

La hoja cotiledonaria no está orientada hacia el crecimiento de la planta sino a la reserva de nutrientes y respiración, presenta escasas zonas meristemáticas, es por esto que la división celular es menor a comparación de los explantes tallo y peciolo. Lo anterior da como resultado que la respuesta a la formación de callo embriogénico fuera menor que los dos explantes anteriores.

En general entre el explante peciolo y el tallo no hay diferencia significativa, ya que en ambos explantes se observa una respuesta favorable a la inducción y proliferación de callos embriogénicos, no así a la hoja cotiledonaria.

9.2.3 Mantenimiento de callos embriogénicos de alfalfa y regeneración de plántulas.

La germinación de los embriones somáticos se logró en los callos provenientes del medio SH en el cual, el 2,4-D (auxina sintética) estuvo presente en mayor concentración, lo que indica que la cantidad de dicho regulador de crecimiento ($11.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) es el factor limitante para lograr la formación de dichos embriones y su posterior germinación (ver Figuras 9-7 y 9-8). En presencia de 2,4 D en menor cantidad se obtienen embriones deformes que únicamente dan lugar a la formación

de raíces pero sin desarrollo de la parte aérea y no se logra su germinación (ver Figura 9-9).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 9-7 Regeneración de plántulas a partir de peciolo de la variedad Moapa proveniente del medio SH

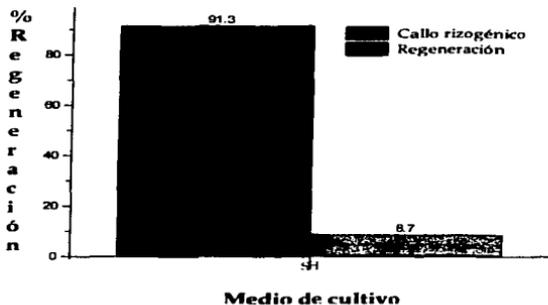
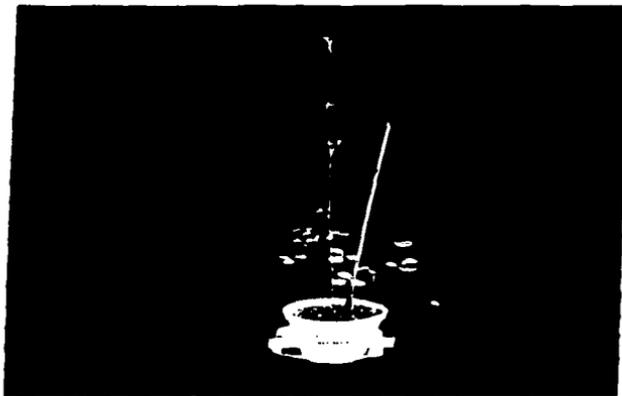


Figura 9-8 Regeneración de plántulas a partir de tallo de la variedad Aragón proveniente del medio SH



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 9-9 Planta de alfalfa regenerada a partir de callo embriogénico proveniente de peciolo de la variedad Moapa.

Se observa que la variedad Moapa presenta mayor regeneración que la variedad Aragón por lo que el genotipo de las variedades de Alfalfa es un factor determinante para la regeneración de plántulas a partir de callos embriogénicos.

El callo embriogénico proveniente del explante peciolo presenta mayor resistencia a la concentración del 2,4-D que el que proviene del explante tallo y es capaz de regenerar tanto la parte aérea como la raíz. Con esto también se demuestra que tanto el tipo de explante como el estado fisiológico de la planta a partir del cual se tomó son factores extremadamente importante en el éxito de la regeneración de plantas; así los callos embriogénicos provenientes del explante

peciolo de la variedad Moapa presentaron mayor proliferación y regeneración de plántulas.

9.3 Curva de crecimiento de callos embriogénicos obtenidos del medio SH.

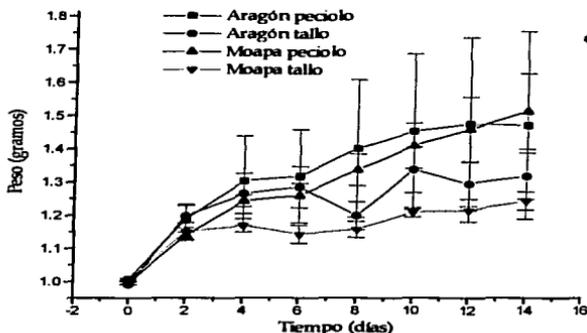
En lo referente a la cinética de crecimiento evaluada a través del peso fresco, existe un comportamiento similar entre explantes de las dos especies es decir, el tallo y peciolo presentan el mismo patrón de multiplicación celular. Los incrementos se dieron en relación al peso fresco que presentaban los callos el día de la inoculación y representan también la ganancia a los 14 días después del subcultivo (ver Figura 9-10).

Con base en los resultados obtenidos de las curvas de peso fresco, se determinó que la fase exponencial de multiplicación celular comienza al segundo día y abarca hasta el quinto día del primer subcultivo en el medio de inducción.

Es notable que ambos explantes presentaron diferentes comportamientos entre ellos, no así el mismo explante entre variedades es decir, el peciolo de ambas variedades presenta un curva similar en donde su fase exponencial de crecimiento es efectiva a partir del segundo día y presenta un crecimiento continuo aún después del quinto día, no así el tallo, que después del quinto, día presenta un decaimiento en la curva lo que nos indicaría comienzo de muerte celular presente como oxidación del tejido por la producción de compuestos fenólicos. Cabe mencionar que es recomendable realizar una curva de peso seco para asegurarse

que la ganancia es en masa y no retención o absorción de agua por parte de las células.

A partir de los resultados obtenidos en inducción, proliferación y regeneración del callo embriogénico, se determinó que los mejores callos a bombardear con microproyectiles cubiertos de ADN fueron los obtenidos de los explantes peciolo y tallo inducidos en el medio SH (11.2 mg.L⁻¹ de 2,4-D) ya que tuvieron altas tasas de producción de embriones y se presentó la regeneración.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 9-10 Cinética de crecimiento con base en el peso fresco de los cultivos de callos embriogénicos de alfalfa provenientes del medio de cultivo denominado SH.

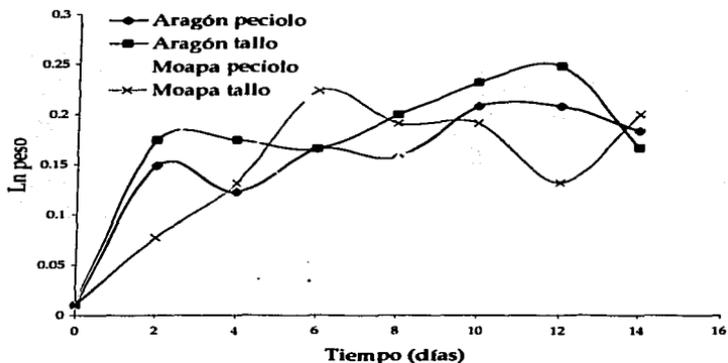


Figura 9-11 Cinética de crecimiento con base en el Ln del peso fresco de los cultivos de callos embriogénicos de alfalfa provenientes del medio de cultivo denominado SH.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

10 CONCLUSIONES

- Se obtuvo el método de esterilización que consiste en sumergir las semillas un minuto en etanol al 70% v/v, colocarlas en una solución de NaCl₂ al 35 % v/v con Tween 20 y plata coloidal durante 8 minutos.
- Las variedades de alfalfa en estudio resultaron ser embriogénicas en ambos casos.
- Se establecieron y caracterizaron los cultivos de callos embriogénicos de dos variedades comerciales de alfalfa. Una proporción mayor de callo embriogénico se obtuvo de los explantes peciolo y tallo para ambas variedades.
- Los reguladores de crecimiento 2,4-D en una concentración de 11.2mg.L⁻¹ en el medio de inducción SH y cinetina en el medio MS sin hormonas para la germinación son los responsables de la formación de embriones y la regeneración de plántulas completas, resultando ser los mejores medios para la germinación de los embriones.

- La regeneración de plántulas se realizó induciendo el callo embriogénico en el medio SH durante dos semanas en cada subcultivo, siendo en total 2 subcultivos. Posteriormente se subcultivó el callo embriogénico al medio MS sin la presencia de la auxina 2,4-D. Presentándose la regeneración de los embriones a los quince días del segundo subcultivo.
- La fase exponencial de crecimiento celular para callos de ambas variedades se presenta a partir del segundo y hasta el quinto día después del subcultivo.

SECCIÓN 2

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE ALFALFA

11 ANTECEDENTES GENERALES

11.1 Vacunas Comestibles

Una vacuna es una suspensión de microorganismos muertos, debilitados o de fragmentos de los mismos. Al introducirla en el organismo, desencadena la producción de anticuerpos contra el agente infeccioso. Así, cuando más tarde se produce un contacto con el agente introducido, el cuerpo puede desplegar una respuesta inmune contra dicho agente (<http://www.mundogar.com>, 2002).

Las plantas se han utilizado por miles de años, con fines medicinales, ha sido recientemente que por medio de la ingeniería genética se han utilizado como biofábricas o como biorreactores para producir diversos compuestos de interés farmacéutico. Dado que la demanda por estos compuestos va en aumento en todo el mundo, el uso de esta tecnología también está cada vez más extendido. Actualmente, el alto costo de muchos compuestos farmacéuticos limita su disponibilidad y aplicación. Los producidos en plantas transgénicas son, por el contrario, baratos para producir y almacenar, de fácil escalamiento para producción en masa y más seguros que los derivados de otros sistemas (Gómez, 2001).

Gran cantidad de compuestos de diversos tipos se han estado produciendo por muchos años en diversos sistemas. El sistema de expresión ideal sería el que

produce el material en mayor cantidad, más seguro y biológicamente más activo con el costo más bajo. El uso de células de mamíferos modificadas con técnicas de ADN recombinante tienen la ventaja de producir compuestos idénticos a los naturales. Sin embargo, cultivar estas células es muy costoso y se puede realizar solamente en escala limitada (Gómez, 2001).

El uso de microorganismos, tales como bacterias, permite la reproducción a escala mucho mayor, pero tiene la desventaja de originar en algunos casos, productos que no son exactamente iguales a los de origen natural. La producción de proteínas recombinantes en plantas tienen muchas ventajas potenciales para generar compuestos farmacéuticos de importancia en medicina clínica. En primer lugar, los sistemas vegetales son más económicos que la infraestructura industrial utilizada en sistemas de fermentación o biorreactores. En segundo lugar, ya está disponible la tecnología para procesar y cosechar plantas y sus productos a escala industrial. En tercer lugar, el requisito de la purificación del compuesto puede ser eliminado cuando el tejido de la planta que contiene la proteína recombinante se utiliza como alimento. En cuarto lugar, se puede dirigir a las proteínas recombinantes a determinados compartimentos (como por ejemplo el cloroplasto). En quinto lugar, se puede producir la proteína recombinante a escala industrial. Finalmente, los riesgos a la salud que se presentan por posible contaminación del producto recombinante con patógenos humanos son mínimos. Hay dos áreas en donde esta tecnología está teniendo un impacto importante: en la producción de

anticuerpos y sus receptores y en la producción de vacunas comestibles (Gómez, 2001).

La producción de diversos antígenos en plantas transgénicas es un hecho demostrado desde hace años. El interés para hacer estos experimentos fue que determinadas proteínas inmunogénicas clave del patógeno se pudieran sintetizar en plantas y después utilizar el tejido vegetal como vacuna comestible en seres humanos o animales (Gómez, 2001).

La mayoría de los anticuerpos expresados hasta la fecha han sido en tabaco, aunque también se han utilizado papa, soya, alfalfa, arroz y trigo. La ventaja principal de usar hojas (como en tabaco y alfalfa) para producir el anticuerpo es su rendimiento. Tanto la alfalfa como el tabaco pueden ser cosechados varias veces al año, con una producción potencial de biomasa por año de 17 toneladas/ha y mayor que 50 toneladas/ha respectivamente. En contraste, la producción máxima de trigo, arroz o maíz difícilmente rebasa las 6 toneladas/ha. Otras ventajas del tabaco incluyen su facilidad para la manipulación genética, la producción de un gran número de semillas (hasta un millón por planta) y la imperiosa necesidad de explorar otros usos para este cultivo (Gómez, 2001).

Actualmente, la vacunación a gran escala enfrenta una serie de dificultades. Por un lado los altos costos de las vacunas y por el otro el riesgo de que la distribución en lugar remotos y de difícil acceso no sea adecuado. La mayoría de las vacunas disponibles se aplican por vía parenteral (inyecciones). La OMS ha

recomendado en diversas ocasiones buscar alternativas para sustituir a las inyecciones, debido a que se ha encontrado en algunos países que hasta un 30% de las inyecciones se realizan con jeringas no estériles (Gómez, 2001).

La aplicación de vacunas vía oral es una buena alternativa para las vacunas vía parenteral, en gran parte por razones de bajo costo y fácil administración. Asimismo, con las vacunas orales se incrementa la probabilidad de adquirir inmunidad en mucosas contra los agentes infecciosos que entran al cuerpo a través de una superficie mucosal (Gómez, 2001).

Una preocupación importante con las vacunas orales es la degradación de los antígenos en el estómago e intestinos antes de que puedan producir una respuesta inmune. Para protegerlos de la degradación se han desarrollado varios métodos. Entre estos se encuentran el uso de cepas recombinantes de microorganismos atenuados, de vehículos de bioencapsulación y finalmente las plantas transgénicas. Los primeros trabajos con vacunas de plantas se utilizaron en tabaco y la papa. La especie ideal para expresar los antígenos debe consumirse en fresco y tener altos niveles de proteína soluble. En este sentido, frutas como el plátano y el jitomate o alternativamente los cereales son sistemas convenientes para este fin (Gómez, 2001).

Los antígenos derivados de plantas han inducido respuestas inmunes a nivel de mucosas y de suero cuando han sido administrado tanto con inyecciones como por vía oral en animales de laboratorio y en varios experimentos. Por esta razón se

considera que las vacunas preparadas en plantas tienen un gran potencial. La cantidad de tejido vegetal que considera una dosis de vacuna debe ser pequeña. Por ello es importante alcanzar altos niveles de expresión en el tejido vegetal. En general, los niveles de expresión de las proteínas con aplicación farmacéutica producidas en plantas transgénicas ha sido menor al 1 % de la proteína soluble total. Este límite del 1% es muy importante para una posible aplicación comercial, si es que la proteína se debe purificar.

11.2 Virus de la Rabia.

Clasificación

El virus de la rabia pertenece a la orden *Mononegavirales*, virus con genomas no segmentados, negativo-trenzados del ARN. Dentro de este grupo, los virus con una forma distinta de la "bala" se clasifican en la familia de *Rhabdoviridae*, que incluye por lo menos tres géneros de los virus animales, de *Lyssavirus*, de *Ephemerovirus*, y de *Vesiculovirus*. El género *Lyssavirus* incluye el virus de la rabia (Bac. 1991).

Estructura

Rhabdovirus es aproximadamente 180 nm de largo y 75 nm de ancho. El genoma de la rabia codifica cinco proteínas: nucleoproteína (n), fosfoproteína (p), proteína de la matriz (m), G de la glicoproteína y polimerasa. Todos los rhabdovirus tienen dos componentes estructurales importantes: una base helicoidal de la ribonucleoproteína (RNP) y una cubierta circundante. En la RNP,

el ARN genómico es encajonado firmemente por la nucleoproteína. Otras dos proteínas virales, la fosfoproteína y la proteína grande (L-proteína o polimerasa) se asocian al RNP. La glicoproteína forma aproximadamente 400 puntos triméricos que se arreglan firmemente en la superficie del virus. La proteína M se asocia a la cubierta y al RNP y puede ser la proteína central de la asamblea del *rhabdovirus*. La estructura y la composición básica del virus de la rabia se representa en la Figura 11.1 (Baer, 1991).

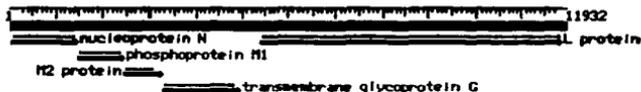


Figura 11.1. Genoma del virus de la rabia.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Historia natural.

El virus de la rabia causa una encefalitis aguda en todos los anfitriones de sangre caliente, incluyendo seres humanos, y el resultado es casi siempre fatal. Aunque todas las especies de mamíferos son susceptibles a la infección del virus de la rabia, sólo algunas especies son importantes como depósitos para la enfermedad. En los Estados Unidos, algunas variantes distintas del virus de la rabia se han

identificado en mamíferos terrestres, incluyendo mapaches, zorrillos, zorros, y coyotes (Baer, 1991).

Transmisión

La transmisión del virus de la rabia comienza generalmente cuando la saliva infectada de un anfitrión se pasa a un animal no infectado. Las varias rutas de la transmisión se han documentado e incluyen la contaminación de las membranas mucosas (ojos, nariz, boca), de la transmisión del aerosol, y de trasplantes córneos. El modo más común de la transmisión del virus de la rabia está a través de la mordedura y de la saliva viral de un anfitrión infectado. Las investigaciones han demostrado en ambos la entrada directa del virus en los nervios periféricos en el sitio de la infección y la entrada indirecta después de la réplica viral en el tejido fino (es decir, células del músculo). Posterior a la infección, las defensas inmunes del anfitrión pueden conferir inmunidad transmitida por células contra la infección viral porque el virus de la rabia es un buen antígeno. Después de adherirse en los nervios periféricos, el virus de la rabia se transporta al sistema nervioso central (CNS). Esto ocurre típicamente vía los nervios sensoriales y del motor en el sitio inicial de la infección. El periodo de la incubación es el tiempo de la exposición al inicio de muestras de la enfermedad clínicas. El periodo de la incubación puede variar a partir de algunos días a varios años, pero es típicamente 1 a 3 meses. La difusión del virus dentro del CNS es rápida. La infección cerebral activa es seguida por la extensión del virus a los nervios periféricos. La amplificación de la infección dentro del CNS ocurre durante ciclos de la transferencia viral de la réplica y de la

célula a célula del virus de la progenie. La extensión del virus puede conducir a la invasión de sitios de varios tejidos finos, incluyendo las glándulas salivales (Baer, 1991).

Sintomatología

Los primeros síntomas de la rabia pueden ser no específicos como gripe, fiebre, o dolor de cabeza, que puede durar por días. Puede haber malestar en el sitio de la exposición (mordedura), progresando dentro de días a los síntomas de la disfunción cerebral, ansiedad, confusión, agitación, progresando al delirium, al comportamiento anormal, a las alucinaciones, y al insomnio. El período agudo de la enfermedad termina típicamente después de 2 a 10 días. Una vez que aparezcan las muestras clínicas de la rabia, la enfermedad es casi siempre fatal, y el tratamiento es típicamente de apoyo. La prevención de la enfermedad es enteramente profiláctica e incluye el anticuerpo pasivo (globulina inmune) y la vacuna. las excepciones no mortales son extremadamente raras (Baer, 1991).

Prevención.

No existe tratamiento médico eficaz, solo de prevención como el aislamiento de los animales sospechosos 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. 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 (www.viarural.com.ar, 2002).

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, posteriormente la vacunación antirrábica puede hacerse según dos protocolos probados de tratamiento por vía intramuscular: uno en 5 inyecciones practicadas los D0, D3, D7, D14 y D28, y el otro, simplificado en 4 inyecciones, 2 practicadas el D0 en dos puntos diferentes, 1 el D7 y D21. (Baer, 1991).

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. No fue hasta 1900 que se realizó la primera vacuna inactivada para rabia, la cual contenía fenol sin embargo esta vacuna fue descontinuada 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 (www.drscope.com).

Las vacunas de virus muerto 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, acetilenoetiliminina y otras aminos. Estas vacunas pueden contener algún adyuvante (p. ej. saponina) para potenciar la respuesta inmune (www.drscope.com).

Rabia Paralítica Bovina en México

La Rabia Paralítica Bovina o Derriengue, 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 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. 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.sagarpa.gob.mx, 2000).

Importancia Económica

El tratamiento de los bovinos con anticoagulantes inyectados es una acción útil, pero combinada con otras, ya que la circulación de la sustancia sólo dura cinco días con dosis letales para el vampiro, siendo inocua en todo momento para el bovino. Debido al costo no es posible aplicarlo a todos los animales del rancho, sino únicamente a los que presentan mayor frecuencia de mordedura siendo menos eficaz que la pomada aplicada en la captura de corral o refugio. Debido a la importancia de los vampiros 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. La rabia parálitica 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 a mordeduras de murciélagos, resulta por demás importante, entre otras causas de pérdidas económicas (www.chp.sagarpa.gob.mx , 2001)

11.3 Sistemas actuales para la transformación genética de plantas.

La manipulación o transformación genética de plantas se refiere a la alteración racional y deliberada del genoma de las células vegetales a partir de las que se obtiene una planta completa. La introducción e integración estable de un gen

extraño en el genoma de la planta le confiere una nueva característica de interés (mejor calidad de frutos, tolerancia a enfermedades, plagas y condiciones ambientales adversas, etc.) (Jofre y Garfias, 1997). Con estas técnicas de bioingeniería disponibles actualmente, solo es posible introducir (e integrar en forma estable) uno o pocos genes de interés (Herrera, 1997).

La introducción de información genética (ácido desoxirribonucleico o ADN) foránea a células vegetales puede lograrse mediante diversas técnicas que hacen uso de la capacidad de manipular el ADN a través de metodologías de ADN recombinante. En general, las estrategias de transformación genética de plantas se han agrupado en dos: la transformación mediada por vectores vivos (*Agrobacterium*) y la transferencia directa de genes (Herrera, 1997).

La transferencia directa de ADN puede lograrse a través de diferentes métodos físicos tales como bombardeo de tejidos o células con micropartículas (biolística) cubiertas de ADN, permeación de membranas celulares al ADN, inducida por corrientes eléctricas (electroporación), tratamientos químicos (polietilenglicol (PEG)), abrasión con fibras de silicio, microinyección y láser (Jofre y Garfias, 1997).

Estos métodos, especialmente la electroporación y la transformación mediada por PEG han demostrado ser útiles para introducir ADN con éxito en protoplastos (células vegetales sin pared). Desafortunadamente la regeneración de plantas completas a partir de protoplastos es difícil en algunas especies y

frecuentemente es dependiente del genotipo. De las técnicas directas, la más utilizada actualmente para cultivos de células y tejidos es el bombardeo con micropartículas (biolística). Este método permite la penetración de la pared celular y ha demostrado ser eficiente para muchas especies vegetales. Micropartículas de tungsteno u oro (aproximadamente de 1 a 4 micras de diámetro) se recubren con el ADN y son utilizadas como proyectiles que una vez se "disparan" a las células, liberan el ADN con la información genética de interés. Mediante técnicas de cultivo *in vitro* las células transformadas se desarrollan para finalmente dar origen a una planta completa (Herrera, 1997).

Para que la transformación genética de plantas cumpla con los objetivos para los cuales ha sido desarrollada, es decir, para que sea efectiva como herramienta en los programas de mejoramiento de cultivos, deben tenerse en cuenta las siguientes consideraciones (Herrera, 1997):

- Se debe desarrollar un sistema de regeneración de plantas completas a partir del explante (porción de la planta) que va a ser transformado en el laboratorio.
- Debe haber disponibilidad del gen que solucione efectivamente el problema y se debe construir un vector adecuado que contenga todos los genes y secuencias reguladoras requeridas.

- Se debe desarrollar o adaptar un sistema eficiente de transformación y selección de transformantes "in vitro".
- Se requiere la verificación (comprobación) de la integración estable del gen introducido (transgen) mediante técnicas de biología molecular.
- Adicional a la corroboración molecular de que efectivamente la transformación ha ocurrido, debe realizarse una evaluación fenotípica del comportamiento de la planta en relación con la característica deseada y con el crecimiento y desarrollo de la misma.
- Deben seguirse rigurosa y cuidadosamente las normas y regulaciones de bioseguridad que aseguran que el producto obtenido no es una amenaza para la salud humana, animal ni representa ningún riesgo ambiental.
- Deben considerarse las normas y regulaciones de protección a la propiedad intelectual.
- Debe establecerse un sistema adecuado de enlace con el usuario (el cultivador) para la utilización del producto obtenido.

La técnica más comúnmente utilizada para la transformación de plantas se basa en la utilización de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* como vehículo, esta bacteria fitopatógena presente en el suelo tiene la capacidad de transferir ADN de sus plásmidos (ADN circular extracromosómico) a las células vegetales.

Introduciendo un segmento de su ADN; (denominado ADN transferido), contenido en sus plásmidos Ti(inductor de tumores) y Ri(inductor de raíces), estos se resecuencializan para eliminar así los genes que inducían la formación de tumores y raíces, introduciendo a la vez los genes deseados, el proceso culmina con la regeneración de tejidos creando plantas completas. Sin embargo esta técnica está casi exclusivamente restringida para dicotiledóneas (E.M.Southgate *et. al...* 1995).

La biobalística o bombardeo con micropartículas es un proceso muy original desarrollado por el grupo del Dr. John Sanford, que permite introducir ADN a virtualmente cualquier tipo de célula. En este procedimiento el ADN es introducido a las células por medio de partículas microscópicas aceleradas a velocidades supersónicas, que atraviesan la pared y la membrana celular sin causar, por lo general, efectos letales. Los microproyectiles son partículas de forma aproximadamente esférica (de 0.4 a 2.0 micrómetros de diámetro), hechas con materiales densos como tungsteno u oro, y que se recubren con el ADN que se desea transferir a las plantas. Para acelerar los microproyectiles y que adquieran un *momentum* (masa x velocidad) suficiente para penetrar a las células blanco, se utilizan "macroproyectiles" que son impulsados a grandes velocidades (los microproyectiles son colocados sobre su superficie) por un choque de gas, que puede derivarse de una explosión química, la explosión eléctrica de una gota de agua, o una descarga de un gas inerte. Las células o tejidos que constituyen el blanco de los proyectiles se disponen de tal forma que presentan la máxima

superficie para el bombardeo, en una área de cerca de 5 cm de diámetro (ver Figura 11.2) (Herrera, 1997).



Figura 11-2 Representación esquemática del sistema de bombardeo con micropartículas o biolística. Se muestra el sistema más moderno, en donde el macroproyectil es propulsado por una descarga de helio a alta presión.

Existen varios factores de afectan la transformación por bombardeo de micropartículas:

1) Naturaleza de las micropartículas:

Se han utilizado micropartículas de tungsteno y de oro. El tungsteno es un material de bajo costo y disponible en una gran variedad de tamaños. Sin embargo es tóxico

para algunos tipos de células además de sufrir oxidación en la superficie lo cual puede afectar al ADN que se le adhiere causando su degradación. El oro es un material biológicamente inerte, no es tóxico para las células vegetales y no cataliza la degradación del ADN que se le adhiere. Sin embargo es un material de alto costo (Klein *et. al.*, 1988).

Finalmente se debe considerar la concentración de las micropartículas . Una concentración muy baja no logrará cubrir el área deseada mientras que una alta concentración puede resultar en la aglomeración de partículas que puedan causar un gran daño a las células blanco (Southgate *et. al.*, 1995).

2) Adherencia de ADN a las micropartículas.

La adherencia eficiente del ADN a las micropartículas es esencial para el buen transporte del mismo. El método de Klein *et. al.*, (1988) involucra la adición del plásmido disuelto en un buffer a una suspensión estéril de micropartículas de tungsteno, seguido por la adición de cloruro de calcio 2.5 M y espiromidina 0.1 M. La suspensión de micropartículas se sonica para evitar la formación de agregados.

Altas concentraciones de ADN producen la aglutinación de las micropartículas, lo cual reduce la frecuencia de transformación.

3) Transporte de las micropartículas al tejido.

Existen varios factores principales que afectan la velocidad y por lo tanto la penetración de las micropartículas en los tejidos. Estos factores incluyen el vacío aplicado, poder de aceleración y distancia entre el soporte de las micropartículas y el tejido. El rango de vacío para obtener buenos resultados se sugiere que sea de 10-280 in HG según estudios realizados (Klein *et. al.*, 1988).

Así también, la distancia de las micropartículas al tejido blanco afecta la velocidad de las mismas y su distribución en el tejido. Mientras más grande sea la distancia entre las micropartículas y el tejido blanco, mayor tendrá que ser la fuerza requerida para impulsar las micropartícula y que la transformación sea eficiente.

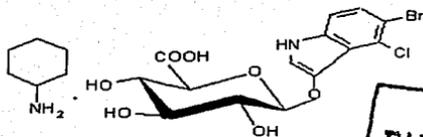
4) Incorporación del ADN introducido en el genoma del huésped.

La expresión del gen depende de varios factores que incluyen la incorporación del ADN externo al genoma del huésped. En la transformación por bombardeo de micropartículas, los niveles de expresión transitoria del gen son mucho mayores a los de la expresión permanente. Siempre que se utilice esta técnica de transformación se deberá estar consiente de que un alto nivel de expresión transitoria no esta relacionado con un alto nivel de expresión permanente u obtención de plantas transgénicas. Una ineficiente incorporación del gen externo al genoma del huésped, puede conducir a la inicial expresión de la

proteína de interés pero el gen externo se perderá en la siguiente replicación del ADN genómico durante la división celular. (Southgate, 1995).

5) Elección de la construcción de ADN.

La elección de la construcción de ADN utilizada para la transformación por bombardeo de micropartículas depende del objetivo del estudio en específico. La expresión transitoria del gen requiere un producto que pueda ser rápida y sencillamente monitoreado. El sistema del gen reportero GUS, desarrollado por Jefferson *et. al.*, 1987, se basa en el gen *gus* que codifica para la enzima β -glucuronidasa, que al unirse al sustrato incoloro X-gluc (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D- glucurónico) (ver Figura 11-3), da lugar a un producto que, al oxidarse, produce una coloración indigo. De esta forma las células transformadas pueden ser identificadas por su coloración. El sistema GUS ha sido utilizado extensamente para optimizar el bombardeo de micropartículas (Jefferson *et. al.*, 1987).



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Figura 11-3 Estructura química del x-gluc.

Un problema potencial es la actividad endógena semejante a la enzima β -glucuronidasa de las células huésped, por lo tanto es necesario utilizar controles negativos.

Los genes externos requieren usualmente de promotores para poder ser expresados en las células huésped. El promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor ha sido extensamente utilizado con distintos grados de eficiencia en distintas especies de plantas, en ocasiones con un doble o triple promotor para incrementar la expresión del gen (Klein *et. al.*, 1988).

Construcciones que codifican para dar resistencia a antibióticos o herbicidas pueden ser utilizadas para seleccionar células transformadas de las que no lo están. Ejemplos de estos genes utilizados para la selección incluyen al gen *npt II*, que codifica para la enzima neomicina fosfotransferasa, la cual confiere resistencia a los antibióticos neomicina, kanamicina, geneticina y paramomicina (Pearl, 1992).

El tamaño del plásmido también puede influenciar en la expresión del gen de interés. Plásmidos de tamaño grande (más de 10 kb) son más susceptibles a la fragmentación durante el bombardeo, lo que resulta en bajos niveles de expresión del gen (Southgate *et. al.*, 1995).

12 OBJETIVOS

12.1 Objetivo General

Elaboración de una construcción genómica y transformación genética de callos embriogénicos de alfalfa por bombardeo de partículas

12.2 Objetivos Específicos

- Construcción de un vector que contenga el gen codificante de la proteína "G" del virus de la rabia.
- Determinación de la concentración óptima de kanamicina para la selección de las células de alfalfa transformadas.
- Determinación de parámetros óptimos (distancia del disparo, cantidad de ADN, cantidad de callo embriogénico) para el bombardeo de los callos embriogénicos de alfalfa con el plásmido que portan los genes tanto de la proteína "G", el gen de selección *nptII* y el gen reportero *gus*.
- Transformación de callos embriogénicos de alfalfa por bombardeo de partículas con el vector construido.
- Realizar pruebas de expresión transitoria y permanente para los callos transformados.

13 HIPÓTESIS

Si se transforman callos embriogénicos de alfalfa por medio de bombardeo de partículas con plásmidos que portan el gen de la glicoproteína "G" del virus de la rabia entonces, es posible obtener plantas transgénicas que expresen dicha proteína.

14 MATERIALES Y MÉTODOS.

14.1 Materiales biológicos

- Los plásmidos pUC-pSS/pWR-21 que porta de manera individual el cADN de la glicoproteína "G" del virus de la rabia y pBI-121, que porta el gen de la neomicina fosfotransferasa y el de la 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 embriogénicos de seis semanas de edad de dos variedades de alfalfa.

14.2 Curva de tolerancia a kanamicina de los callos embriogénicos de alfalfa.

Se inocularon 0.5 g de callo en frascos de 50 mL que contenían 20 ml del medio SH adicionado con kanamicina, en concentraciones de 0, 25, 50, y 75, mg.L⁻¹. De cada tratamiento se hicieron 5 repeticiones, de las cuales se tomó el peso fresco pesando un gramo de callo y registrando el incremento en peso del mismo cada 3 días durante 3 semanas para determinar la concentración en la cual el crecimiento era significativamente menor y de esta manera seleccionar posteriormente las células transformadas.

14.3 Construcción del vector de expresión en plantas para el gen de la proteína "G" del virus de la Rabia.

EL CADN del gen que codifica para la proteína "G" se encuentra clonado en el vector pUC-pSS/pRW-21, de donde se obtuvo el fragmento Xba I de 1500 pb, correspondiente a la región codificante completa de la proteína "G" del Virus de la Rabia. Este fragmento se clonó en el sitio Xba I del vector pBI-121, el cual contiene el promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor, así como el terminador de este mismo virus. De esta manera se creó el vector pBI-121/pWR-21 en donde el tamaño del plásmido es de 14.5 Kb (ver Figura 14-1).

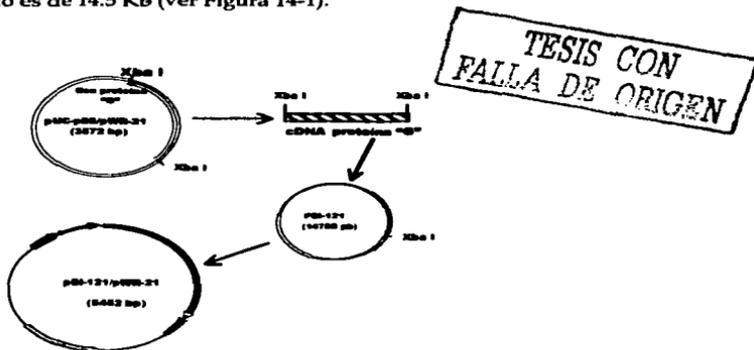
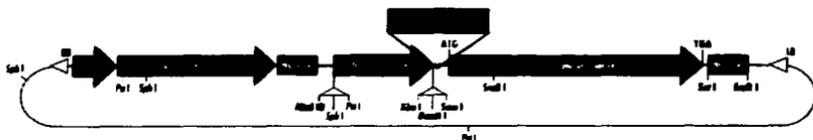


Figura 14-1 Construcción del vector pBI-121/pWR-21. Se obtuvo el fragmento Xba I, correspondiente al gen de la proteína "G" de pUC-pSS/pRW-21 y se clonó en el sitio Xba I de pBI-121 creándose el vector para expresión en plantas.

De esta forma se obtuvo el plásmido pBI-121/pWR-21 que contiene el gen de la proteína "G" del virus de la rabia fusionado a el gen de la β -glucuronidasa así

como el gen de la neomicina fosfotransferasa II que confiere resistencia a la kanamicina bajo control del promotor de la nopalina sintetasa.



Sma I
TCT AGA GGA TCC CCG GGT GGT CAG TCC CTT ATG
Xba I BamH I

Figura 14-2 Esquema del plásmido pBI-121/pWR-21

A continuación se presenta la metodología para la purificación de las bandas de los fragmentos de los plásmidos contenidas en el gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio.

**TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN**

14.4 Extracción y purificación del fragmento que contiene el gen de la proteína "G" del virus de la rabia y el plásmido pBI-121 contenidos en el gel de agarosa

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 600 μ l.

1. Se pesó un tubo de microcentrifuga vacío de 1.5 mL y se registró el dato.
2. Se utilizó una navaja para cortar la porción de agarosa que contiene la banda de ADN que va ser purificada, procurando obtener pequeñas piezas, las cuales se transfirieron al tubo de microcentrifuga previamente pesado.
3. 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.
4. Se adicionaron 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).
5. Se cerró el tubo y se agitó vigorosamente en un vortex. Incubándose a 60°C hasta lograrse la disolución de agarosa (5-15 minutos).
6. Durante la incubación, se colocó una columna GFX en un tubo colector para cada purificación que se llevó a cabo.

7. Después de que la agarosa fue completamente disuelta, se centrifugó para colectar el ADN en el fondo del tubo.
8. Posteriormente se transfirió la muestra a la columna GFX y se incubó a temperatura ambiente por un minuto.
9. Se centrifugó en microcentrifuga a máxima velocidad (10,000 a 16,000 x g) por 30 segundos.
10. Se desechó el líquido vaciando el tubo colector y se colocó la columna GFX de nuevo en el tubo colector.
11. Se adicionó 500 μ L del buffer de lavado a la columna, se centrifugó a máxima velocidad por 30 segundos.
12. Se desechó el tubo colector y se transfirió la columna GFX a un tubo nuevo de microcentrifuga de 1.5 mL.
13. Se aplicó 50 μ l de buffer de elución (10mM Tris-HCl pH 8.0, TE pH 8.0 ó agua esterilizada doblemente destilada)
14. Para eluir el ADN en forma más concentrada se redujo el volumen de elución a no más de 10 μ l.
15. Se incubó la muestra a temperatura ambiente por 1 minuto.

16. Se centrifugó a máxima velocidad por un minuto para recuperar el ADN purificado.

14.5 Ligación del fragmento que contiene el gen de la proteína "G" del virus de la rabia al plásmido pBI-121.

Una vez purificado, se hizo la ligación de los fragmentos correspondientes de la siguiente forma:

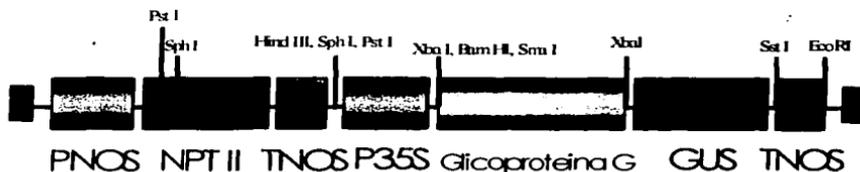


Figura 14-3 Cassete de expresión utilizado para la transformación de los callos embriogénicos de alfalfa.

PNOS: Promotor de la nopalina sintetasa,

NPT II: Gen de la neomicina fosfotransferasa II que confiere resistencia a kanamicina,

TNOS: Terminador de la nopalina sintetasa,

P35S: Promotor 35S del virus del Mosaico de la Coliflor,

Glicoproteína G del virus de la Rabia cepa PWR-21,

GUS: gen que codifica para la beta glucuronidasa y

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TNOS: terminador de la nopalina sintética.

Posterior a la ligación se hizo la diálisis de ADN para extraer y eliminar las sales remanentes para disminuir la conducción y así reducir el shock para las células, siguiendo la metodología:

Se enjuaga una caja petri con agua estéril y luego se llena con agua desionizada y se coloca la membrana con límite de exclusión de $0.25 \mu\text{m}$ sobre la que se agregan $5 \mu\text{L}$ del ADN previamente ligado. Se deja dializar por 20 minutos.

14.6 Preparación de células competentes de *E. coli* para la electroporación.

Se prepararon 500 mL de las células para introducir la construcción del ADN plasmídico siguiendo la siguiente metodología:

1. Se inocularon 5 ml de *E. coli* DH5 α en medio YENB (2 tubos).
2. Al día siguiente se vertieron 5 mL del cultivo anterior a un matraz con 250 ml de YENB y se incubó a 37°C por 3 horas hasta alcanzar una densidad D.O a $600 \text{ nm} = 1$.
3. Se enfrió el cultivo 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 destilada fría estéril.
6. Se centrifugó como en el paso 4 y se repitió el paso 5 y 6.

7. Se resuspendió el paquete celular 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 .

14.7 Electroporación de células competentes de *E. coli* para introducir el producto de ligación.

Transcurrido el tiempo de diálisis, se procedió a electroporar para facilitar la incorporación del ADN a las células, con la siguiente metodología:

- A. A cada tubo que contenía 40 μ L de células competentes se agregó el ADN dializado y se colocó en hielo.
- B. Posteriormente se traspasó a cada una de las celdas de plástico (en campana de flujo laminar) la mezcla células-ADN en hielo.
- C. Se colocaron las celdas en el electroporador Booster y se procedió a electroporar en las siguientes condiciones: 24 k Ω , capacitancia= 330 μ F y un voltaje= 400 volts.
- D. Se adicionó a cada celda 500 μ L de medio SOC y se dejó recuperar a las células por una hora con agitación a 37 $^{\circ}\text{C}$.
- E. Se vertió todo el contenido de las celdas a un tubo eppendorf nuevo.
- F. Se dio un pulso en la centrífuga para bajar la pastilla que contiene al ADN.

- G. Se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células en aproximadamente 100 μ L de medio SOC.
- H. Se colocaron 50 μ L de células en placas que contenían kanamicina (50 mg.L⁻¹).
- I. A la par se preparó un control positivo que contiene células y el plásmido pBI-121; y un control negativo que únicamente contiene células.
- J. Se incubó a 37°C hasta el día siguiente.

Las células que crecieron en la selección con kanamicina fueron únicamente las transformadas.

14.8 Transformación de células competentes de *Escherichia coli* cepa XL1-BLUE con los vectores de expresión (Belser y Hyman, 1985).

1. La noche anterior a la transformación, se inoculó *E. coli* XL1-BLUE en un tubo de ensayo con 5 mL de medio LB y se incubó a 37°C con agitación.
2. Al día siguiente, del cultivo anterior se tomó 1 mL de la suspensión bacteriana y se inoculó en 50 mL de medio LB fresco.
3. Se incubó a 37°C con agitación. La densidad óptica a 650 nm fue verificada varias veces hasta que el cultivo presentó 2.0 unidades de D.O.
4. Después, el cultivo se colocó en hielo durante 10 minutos.
5. Posteriormente el cultivo se transfirió a tubos de centrifuga estériles y se obtuvo el paquete celular por centrifugación a 5,000 rpm por 10 minutos en rotor SS-34.

6. Las células se resuspendieron en 20 mL de CaCl_2 0.1M estéril.
7. Una vez resuspendidas las células, se incubaron en hielo por 20 minutos.
8. Enseguida se obtuvo el paquete celular por centrifugación a 5,000 rpm por 10 minutos en rotor SS-34.
9. Las células se resuspendieron en 0.5 mL de CaCl_2 0.1M estéril.
10. Después de resuspender las células se incubaron en hielo por 1 hora.
11. Se añadieron de 0.1 a 1.0 μg del producto de la reacción de ligación a 0.1 mL de células competentes.
12. Se incubó en hielo por 20 minutos.
13. Posteriormente se dio un choque térmico a las células colocándolas a 42°C durante dos minutos.
14. Para la recuperación de las células se añadió 1 mL de medio LB fresco y se incubaron a 37°C .
15. Finalmente, 0.1 mL de las células se sembraron en placas de medio LB.

14.9 Minipreparación de plásmido pBI-121/pWR-21

Una vez que se obtuvieron las células transformadas que contienen al plásmido pBI-121/PWR-21 se procedió a realizar una minipreparación para corroborar la presencia de los fragmentos constituyentes del plásmido y así verificar la obtención del plásmido, por medio de la siguiente metodología:

1. Crecer un cultivo de las células transformadas de 2 mL toda la noche en medio LB con el antibiótico apropiado.
2. Pasar el cultivo a un tubo eppendorf y centrifugar 30 seg.

3. Decantar el sobrenadante dejando aproximadamente 50 μ L de medio.
4. Resuspender completamente el paquete celular en agua desionizada estéril.
5. Agregar 300 μ L de TENS, mezclar suavemente, e incubar por 5 min a temperatura ambiente. (1 mL de TENS contiene : 25 μ L de SDS al 20 %, 10 ml de NaOH 10 N y 965 μ L de H₂O).
6. Pasar los tubos al hielo y agregar 250 μ L de NH₄Oac 7 M estéril.
7. Incubar en hielo por 5 min.
8. Centrifugar por 5 min a 4 °C.
9. Transferir el sobrenadante (550 μ L aprox.) 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 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 o TE pH 8.0 y resuspender.
18. Realizar un análisis de restricción del ADN obtenido con las enzimas apropiadas y llevar a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

14.10 Extracción y purificación del ADN plasmídico (Sambrook, 1989).

1. Se cultivaron en 250 mL de medio ETB cada una de las cepas bacterianas conteniendo los vectores construidos y se incubaron durante toda la noche a 37°C.
2. Los cultivos se centrifugaron al día siguiente a 5,000 rpm por 10 minutos en rotor GSA.
3. El sobrenadante se decantó, y después se añadió a cada paquete celular 5 mL de solución I (50mM de glucosa, 25mM de Tris-HCl pH 8.0 y 10mM de EDTA pH 8.0); posteriormente las células se resuspendieron con pipeta Pasteur.
4. Enseguida se pusieron 10 mL de solución II (0.2N de NaOH y 1% de SDS). Se agitó suavemente dejando reposar durante 3 minutos a temperatura ambiente.
5. Se añadieron 7.5 mL de solución III (acetato de potasio 3M y ácido acético 5M) agitándose suavemente.
6. Después de agitar, se incubó durante 30 minutos en hielo.
7. Posteriormente se centrifugó en rotor GSA a 5,000 rpm por 10 minutos.
8. El sobrenadante se recuperó por filtración pasándolo a un tubo de 50 mL.
9. Se agregaron 0.6 volúmenes de isopropanol helado (-20°C).
10. Enseguida se agitó, y se dejó precipitando a -20°C durante 30 minutos.
11. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos en rotor SS34.
12. El sobrenadante se decantó, y la pastilla se resuspendió en 3 mL de H₂O desionizada estéril; además se añadieron 3 mL de cloruro de litio 5M helado.
13. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos en rotor SS34.

14. Se tomó el sobrenadante pasándolo a un tubo corex de 50 mL, se añadieron 6 mL de isopropanol helado (-20°C) y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos en rotor SS34.
15. La pastilla se resuspendió en 500 µL de H₂O desionizada estéril añadiendo 20 µL de ARNsa (10 mg.mL⁻¹).
16. El ADN se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL y se incubó con la ARNsa durante 30 minutos a temperatura ambiente.
17. Posteriormente se añadieron 500 µL de la siguiente mezcla: 320 µL de NaCl 5M, 325 µL de PEG al 40% y 355 µL de H₂O desionizada estéril.
18. Se agitó suavemente y se centrifugó durante 5 minutos a temperatura ambiente.
19. La pastilla se resuspendió en 400 µL de H₂O desionizada estéril.
20. Después se añadieron 400 µL de fenol, se agitó brevemente y se centrifugó durante 2 minutos.
21. La fase acuosa fue recuperada, se añadieron 400 µl de fenol-cloroformo y se agitó brevemente, centrifugándose durante 2 minutos.
22. Nuevamente se recuperó la fase acuosa, se añadieron 400 µL de cloroformo-alcohol isoamílico agitándose brevemente en el vórtex y se centrifugó durante dos minutos.
23. Se recuperó la fase acuosa, precipitando el ADN con 100 µL de acetato de amonio 10M y 2 volúmenes de etanol absoluto (1 mL) helado (-20°C).
24. Se dejó incubando a temperatura ambiente durante 10 minutos y posteriormente se centrifugó durante 5 minutos.

25. La pastilla se lavó con 200 μ L de etanol al 70% helado (-20°C).
26. El ADN se resuspendió con 100 μ L de H_2O .
27. Finalmente, para examinar el ADN plasmídico obtenido se hicieron restricciones con las endonucleasas de restricción adecuadas y electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

14.11 Preparación de las partículas de tungsteno.

1. Se pesaron 60 mg de partículas de tungsteno de 0.4 μm de diámetro (M5) colocándose en un tubo de centrifuga de 15 mL.
2. Después se añadieron 2 mL de HNO_3 0.1M y se sonicó en hielo durante 20 minutos.
3. Posteriormente se eliminó el HNO_3 , agregándose 1 mL de agua desionizada estéril, la muestra se transfirió a un tubo de 2 mL y se sonicó brevemente.
4. Las micropartículas se centrifugaron de 30 segundos a 10,000 rpm.
5. El agua se eliminó, se agregó 1mL de etanol absoluto y se sonicó brevemente.
6. Se centrifugaron las micropartículas 30 segundos a 10,000 rpm.
7. El etanol se eliminó, se agregó 1 mL de agua desionizada estéril y se sonicó brevemente.
8. Se colocaron 200 μ L de la suspensión en tubos eppendorf.
9. Después se agregaron 750 μ L de agua desionizada estéril a cada tubo.
10. Finalmente los tubos se almacenaron a -20°C .

14.12 Precipitación del ADN (Klein *et. al.*, 1988).

1. En un tubo eppendorff se colocaron 50 μ L de la suspensión de micropartículas de tungsteno, después se agregaron los siguientes reactivos uno a uno, agitando bien la suspensión entre adiciones.
2. 5 μ L de ADN (1 μ g, μ L⁻¹). Evitar que el ADN se mezcle con las partículas hasta el siguiente paso, depositándolo en la pared del tubo.
3. 50 μ L de cloruro de calcio 2.5M.
4. 20 μ L de espermidina 0.1M.
5. La mezcla se agitó en vortex brevemente.
6. Posteriormente se centrifugó durante 10 segundos.
7. Se eliminaron 100 μ L del sobrenadante.
8. Las partículas se resuspendieron en el líquido remanente.
9. Finalmente se aplicaron 2.5 μ L de las micropartículas cubiertas con el ADN en el centro del filtro del bombardeador.

14.13 Bombardeo con microproyectiles de tungsteno con pistola de baja presión.

La transformación se llevó a cabo con el plásmido pBI-121/PWR-21, dicho vector porta el gen de la glicoproteína "G" del virus de la rabia bajo el control del promotor 35S del CaMV, además del gen de la β -glucuronidasa bajo control del mismo promotor, además del gen de la neomicina fosfotransferasa II que confiere resistencia a kanamicina bajo control del promotor de la nopalina sintetasa.

Se tomaron 2.5 μ L de la solución de partículas cubiertas con el ADN plasmídico y se colocaron en el centro del filtro utilizado para el disparo. La transformación se llevó a cabo con una presión de helio de 120 psi a una distancia de 13.5 cm entre el filtro y el tejido blanco, en un vacío de 20-22 in Hg.

Se tomaron los callos embriogénicos de 2 días después del subcultivo, los cuales fueron colocados un día anterior al bombardeo en cajas de Petri de 60x15 mm con 15 mL de medio, pero gelificados con 2.7 g.L⁻¹ de Gellan®. Se colocó una porción extendida de callo embriogénico de 1 cm de diámetro (una capa delgada de aproximadamente 3 mm de espesor) en el centro de la caja. Una vez bombardeados los callos, se sellaron las cajas y se mantuvieron en incubación a 27 \pm 1°C con fotoperíodo de 16 h luz/8 horas oscuridad.

Dos días después del bombardeo se eligieron al azar unos cuantos callos para medir la expresión transitoria de *gus* y los demás fueron colocados en medio de cultivo adicionado con kanamicina para la selección de las células transformadas.

14.14 Determinación de la actividad de β -glucuronidasa por el método histoquímico (Jefferson,1987).

La prueba de expresión transitoria se realizó de la siguiente manera:

1. Se colocaron los callos bombardeados en la solución de X-gluc* y se incubaron a 37°C por un período de 12 a 16 horas.
2. Esta solución se desechó y se lavaron los callos dos veces con buffer "Z"* pH 7.4.
3. Después se lavaron con etanol al 70% cuatro veces.
4. La clorofila se eliminó con una mezcla de acetona-metanol (1:3), lavando con esta solución los tejidos el tiempo necesario, haciendo varios cambios de la mezcla.
5. Después de que se observó el color azul producto de la reacción, el tejido se lavó cuatro veces con buffer "Z".
6. Finalmente, para conservar los tejidos, se cubrieron con glicerol al 50% y se almacenaron a 4°C*.

* Para su preparación ver Anexo.

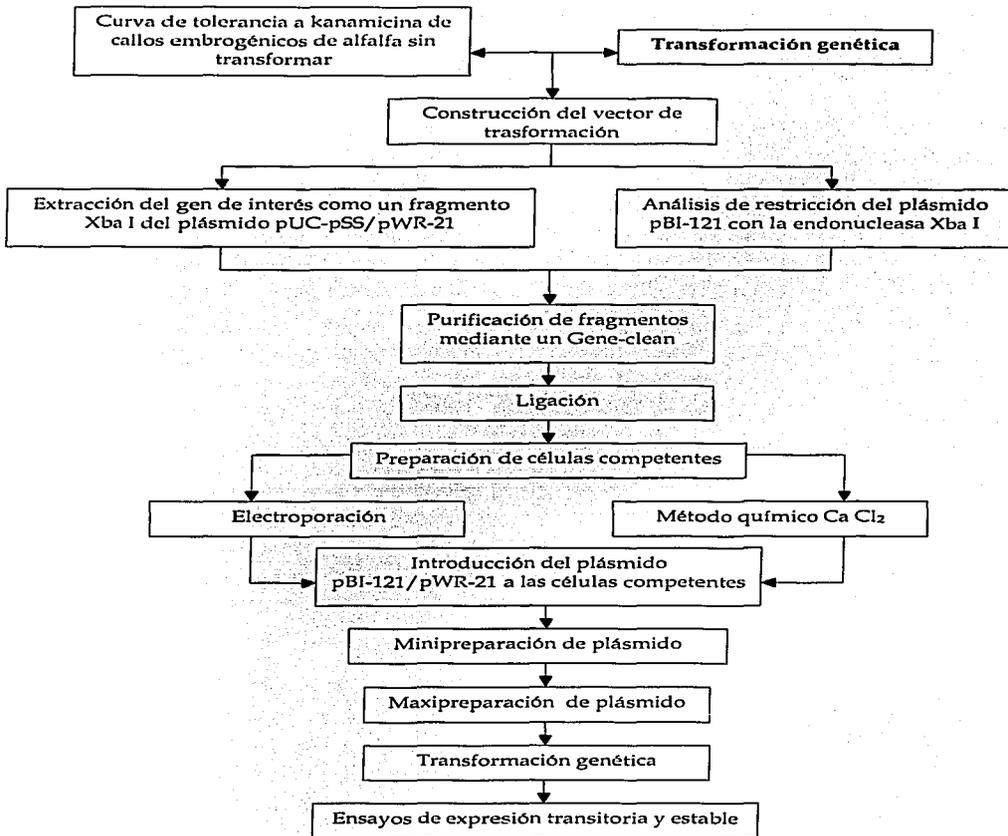


Figura 14.4 Ruta crítica para la transformación genética.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

15 RESULTADOS Y ANÁLISIS

15.1 Construcción del plásmido que contiene el cassette de expresión en plantas con el gen de la proteína "G" del virus de la Rabia.

Con la finalidad de confirmar que el gen que codifica para la proteína "G" del virus de la rabia fue incorporado en el plásmido pBI-121, a las células resultantes de la transformación caracterizadas por formar colonias de color blanco, se les realizó un MINIPREP el cual consiste en extraer el ADN plasmídico del resto del material genético, con el cual se realizó un análisis de restricción generando extremos cohesivos para confirmar la presencia del inserto, ya que éste tipo de enzimas reconoce sitios específicos en la secuencia del genoma. Con la finalidad de verificar lo anterior se realizó un gel de agarosa al 1% empleando las endonucleasas Xba I y Xho I.

En la Figura 15-1 se observa en el primer carril al marcador de peso molecular proveniente del Invitrogen 1 kb plus ADN Ladder . En el segundo carril se colocó la solución del ADN plasmídico digerida durante una hora a 37°C con la endonucleasa de restricción Xba I, en donde se observan 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, con la cual se observa una sola banda correspondiente al plásmido lineal de aproximadamente 14.5 Kb.

13 Kb pBI-121

12,000
3,000
2,000
1,600
1,000
850
650
500
400
300
200
100



14.5 Kb Plásmido pBI-121/
pWR-21

1.5 Kb Glicoproteína
"G"

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 15-1 Análisis de restricción del plásmido pBI-121/pWR-21 con endonucleasas de restricción Xho I y Xba I en gel de agarosa al 0.8%.

Una vez confirmado la presencia del inserto de interés y con la finalidad de multiplicar las células y obtener una cantidad considerable de ADN puro se realizó una maxipreparación (Brown, 1991), ya que es necesario que se encuentre lo más puro posible para poder efectuar el bombardeo con micropartículas y conseguir así la transformación eficiente de callos embrionarios de alfalfa.

15.2 Curva de tolerancia a kanamicina de los callos embrionarios de alfalfa

Para seleccionar las células transformadas de las que no lo están, se utilizan genes que confieren resistencia a antibióticos o herbicidas. En este caso el vector pBI-121/pWR-21, cuenta también con el gen de nptII que da resistencia al antibiótico kanamicina. Por lo que se realizaron curvas de tolerancia a este antibiótico en callos no transformados.

Como era de esperarse el mayor crecimiento se obtuvo en el tratamiento sin kanamicina. También se observó un comportamiento similar para el tratamiento con 25 mg.L⁻¹ del agente selectivo, aunque con una disminución de peso no significativa para la selección. En los tratamientos correspondientes a 50 y 75 mg.L⁻¹ se observó un crecimiento muy deficiente ya que a estas concentraciones el agente selectivo no permite el desarrollo ni la división celular, además de causar la oxidación en prácticamente todo el tejido celular (ver Figura 15-2).

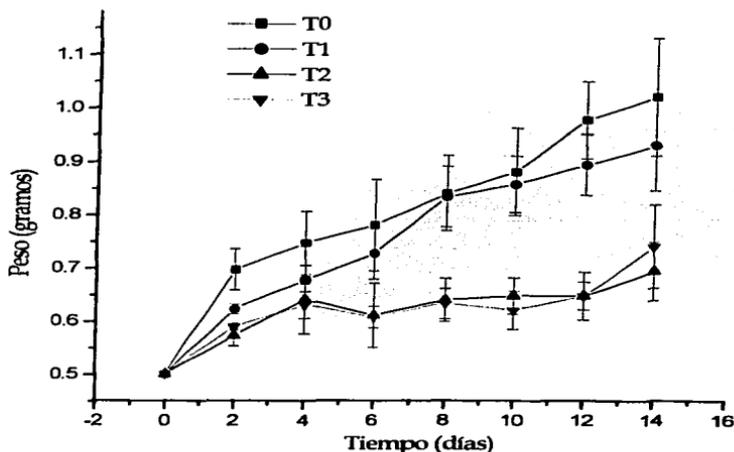


Figura 15-2 Curva de crecimiento en selección con kanamicina para callo embriogénico de alfalfa obtenido de tallo; comparación entre tratamientos. T0 0 mg.L⁻¹, T1 25 mg.L⁻¹, T2 50 mg.L⁻¹, T3 75 mg.L⁻¹.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En cuanto al callo embriogénico de alfalfa obtenido de peciolo se observó que al aumentar la concentración de kanamicina disminuyó el crecimiento de manera proporcional. Aunque los tratamientos con $50\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y $75\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ no muestra diferencia significativa entre si en cuanto al desarrollo y división celular (ver Figura15-3). Al igual que en el caso del explante de tallo se presentó la oxidación en el tejido celular.

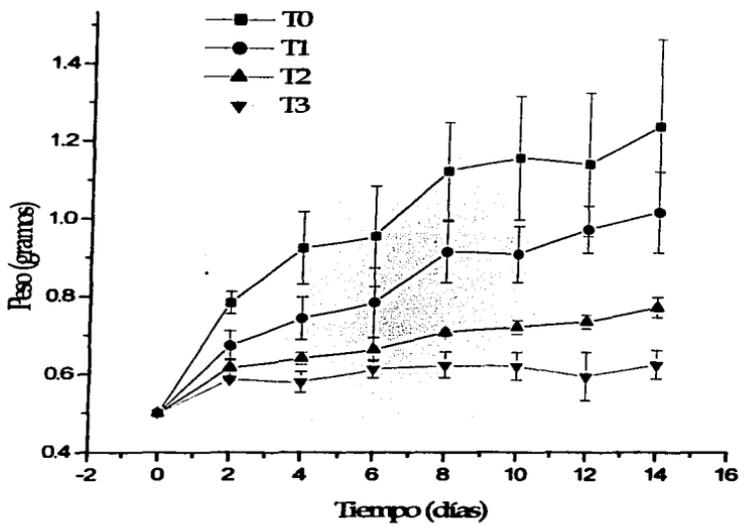


Figura 15-3 Curva de crecimiento en selección con kanamicina para peciolo; comparación entre tratamientos. T0 0 mg.L⁻¹, T1 25 mg.L⁻¹, T2 50 mg.L⁻¹, T3 75 mg.L⁻¹.

Con base en estos resultados se determinó que la concentración a la cual se observa una marcada disminución de crecimiento celular para ambos explantes es a los 50mg.L⁻¹ de kanamicina.

15.3 Transformación genética con micropartículas.

Se realizaron 280 disparos con la construcción del gen de la proteína "G" del virus de la rabia. En el bombardeo se evaluaron varios parámetros (distancia, concentración de ADN y cantidad de callos) en donde se obtuvieron los siguientes resultados.

Al realizar un solo disparo a cada callo embrionario se provocó el menor daño posible a las células por lo que la cantidad de células muertas después del disparo fue mínima tal como lo describe Taylor, 1991.

Al utilizar 50 μL de cloruro de calcio 2.5 M y 20 μL de espermidina 0.1 M se logró que las partículas de tungsteno cubiertas del ADN no formaran conglomerados. De esta manera se evitó que las células bombardeadas reciban un impacto más fuerte y por consiguiente que muriera una poca cantidad de las mismas. También fue importante evitar la aglomeración de las partículas porque así se pudieron dispersar en el tejido celular y transportar el ADN a las células de manera eficiente de acuerdo a lo descrito por Southgate, 1995.

El tamaño de partículas de tungsteno utilizado ($4\mu\text{m}$) resultó efectiva ya que lograron penetrar en la pared y la membrana celular y así transportar el ADN hasta el interior de las células corroborando lo mencionado por Klein, 1988.

La combinación de distancia y vacío utilizada (13.5 cm y 20 - 22mm Hg) nos permitió acelerar las partículas lo suficiente para que pudieran penetrar las

primeras capas del tejido celular pero sin provocar que en el trayecto las partículas colisionaran y cambiaran de dirección sin hacer contacto con el tejido al igual que lo que reporta Guerrero (2001). Una semana después de realizar el bombardeo no se observaron cambios en los callos bombardeados, es decir, continuó el crecimiento y desarrollo celular y tampoco se observó oxidación de los mismos.

Se presentó contaminación por hongos en el 5% de los callos atribuida a la manipulación de los mismos. Sin embargo, al ser una pequeña cantidad con respecto al total de callos bombardeados, no afectó los resultados.

15.4 Expresión Transitoria de callos embriogénicos transformados con el plásmido pBI-121/pWR-21.

A las 48 horas de realizado el bombardeo se llevó a cabo la prueba histoquímica de gus para verificar la expresión transitoria del ADN contenido en el plásmido pWR21/pBI-121. Al colocar las 22 muestras de callo bombardeado se observó que en el 54% había una coloración azul tenue de manera homogénea en ciertos sectores del tejido celular. En el 46% restante no se observó un cambio de coloración. Mientras que en las muestras de callos bombardeados únicamente con partículas (sin el plásmido) utilizados como controles negativos tampoco hubo cambio de coloración.

La aparición del precipitado azul en el 54% de las muestras nos indica que las células fueron capaces de introducir y expresar el plásmido pWR21/pBI-121 ya que dicho precipitado es el resultado de la reacción enzimática entre la β -

glucuronidasa, cuyo gen (*uidA*) se encuentra en el plásmido y el sustrato X-gluc (Jefferson, 1987). No se observó diferencia en la intensidad de la coloración entre ambas variedades ni tampoco entre los explantes peciolo y tallo (ver Figura 15-4).



Figura 15-4 Comparación entre el control negativo y una muestra de callo bombardeado con el gen pWR-21/pBI-121.

Al realizar el bombardeo se liberan enzimas contenidas principalmente en las vacuola, las cuales pudieran ser capaces de reaccionar con el sustrato x-gluc y por lo tanto provocar la presencia de precipitado azul dando como resultado falsos positivos. Sin embargo, al no haber presencia de precipitado en los controles negativos nos indica que en las células bombardeadas no se presenta por si sola la reacción con el sustrato X-gluc por lo que se demuestra que la presencia del precipitado azul es consecuencia de la introducción y expresión de los genes presentes en el vector pWR21/pBI-121 en las células bombardeadas.

15.5 Selección y proliferación de callos embriogénicos transformados.

Para llevar a cabo la selección de células transformadas de las que no lo estaban, los callos se subcultivaron en medio de cultivo SH y posteriormente a medio MS

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

sin hormonas adicionados con 50 mg.L⁻¹ de kanamicina sulfatada como agente selectivo.

Durante el primer subcultivo en la mayoría de los callos bombardeados se observó la proliferación sin presentar disminución en cuanto a su cinética de crecimiento y tampoco presentaron zonas de oxidación. Mientras tanto hubo callos que presentaron una notable disminución de su crecimiento así como la aparición de oxidación en diversas zonas. Se subcultivaron los callos bombardeados únicamente con partículas observándose los mismos resultados. Al subcultivar nuevamente en medio SH con la kanamicina, comenzó el desarrollo de embriones en las partes superficiales presentando oxidación solo en pequeñas zonas, las cuales eran removidas del medio de cultivo. Por otro lado los controles negativos ya se encontraban completamente oxidados y con una gran disminución de peso por lo que fueron desechados.

Con la finalidad de que germinaran los embriones, se subcultivaron los callos en medio MS sin hormonas adicionado con kanamicina y durante la primeras semanas aumentó la cantidad de embriones en la superficie de los callos. En la segunda semana se observó un número constante de embriones. Y posteriormente en el siguiente subcultivo comenzaron a disminuir la cantidad de los mismos aunque el crecimiento de los callos seguía aumentando. En las semanas subsecuentes se comenzó a endurecer el callo embriogénico y la cantidad de embriones había prácticamente desaparecido. Mientras que comenzaba la

aparición de raíces a partir de los embriones que aún permanecían. Para tratar de que regeneraran los embriones que permanecían, se subcultivaron los callos a medio MS sin hormonas y se disminuyó la cantidad de kanamicina gradualmente hasta eliminarla del medio de cultivo. Se observó el aumento en la aparición de raíces en los callos embriogénicos y aumento la oxidación de los mismos.

Durante los subcultivos en SH se logró seleccionar a los callos que presentaron resistencia a la kanamicina ya que tanto los controles negativos como una pequeña cantidad de callos bombardeados murieron durante las dos primeras semanas, mientras que la mayoría de los callos bombardeados continuaron su crecimiento y desarrollo normal hasta la generación de embriones. Sin embargo, al subcultivar los callos embriogénicos a medio MS no se logró la regeneración de ningún embrión en ninguna de las dos variedades de alfalfa. Esto puede ser debido a que la concentración de la kanamicina fue demasiado alta y esto provocó que el callo embriogénico únicamente creciera y produjera embriones pero sin lograr su desarrollo y crecimiento.

15.6 Expresión estable de callos embriogénicos transformados con el plásmido pBI-121/pWR-21.

A los 5 meses de realizado el bombardeo con el plásmido pWR21/pBI-121 se realizó la prueba de expresión de β -gus con el fin de determinar si los genes incorporados a las células vegetales seguían transfiriéndose de generación en generación además de corroborar que seguían expresándose.

Se observó la obtención del precipitado azul en el 59% de los callos expuestos al sustrato x-gluc. Esto nos indica que el plásmido que contenía los genes de obtención fue expresado e incorporado al genoma vegetal y transmitido a nuevas generaciones celulares a partir de células madre que fueron transformadas inicialmente (ver Figura 15-5).

Se observó la obtención de la coloración azul en el 59% de los callos incubados en x-gluc. Esto nos indica que la transferencia de ADN que porta el plásmido pWR21/pBI-121 a las células embriogénicas de alfalfa, fue exitosa y que además las células transformadas incorporaron dicho ADN a su genoma y son capaces de transmitirlo a las células hijas.

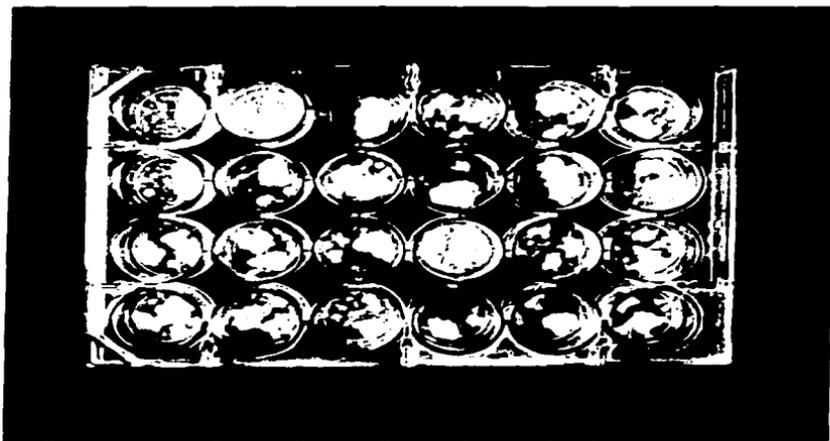


Figura 15-5 Expresión del gen *uidA* que codifica para la enzima β -galactosidasa, a los 5 meses de realizado el bombardeo.

TESIS CON
FALLA EN

16 CONCLUSIONES

- Se logró obtener la construcción del vector de expresión en plantas que contiene el gen codificante de la proteína "G" del virus de la rabia.
- Se determinó que la concentración de kanamicina de 50 mg.L⁻¹ para la selección de las células de alfalfa transformadas, es efectiva para ésta pero inhibe la regeneración de plantas
- Se utilizaron los parámetros establecidos como distancia del disparo 13.5 cm, cantidad de ADN 5µL, cantidad de callo embriogénico 0.5 g, para el bombardeo de los callos embriogénicos de alfalfa con el plásmido que portan los genes tanto de la proteína "G", el gen de selección *nrIII* y el gen reportero *gus*.
- Se logró la transformación de callos embriogénicos de alfalfa por bombardeo de partículas con el vector obteniendo.
- Se realizaron pruebas de expresión transitoria y estable para los callos transformados, obteniendo una respuesta positiva en el 53% y 59% respectivamente.

17 PERSPECTIVAS

- **Determinar la concentración óptima de kanamicina que permita regenerar plantas transformadas.**
- **Mejorar la eficiencia de regeneración de plantas.**

18 BIBLIOGRAFÍA

- AMMIRATO, P. V. (1984). Embryogenesis. En: Handbook of Plant Cell Culture. Vol. 2.
- AMMIRATO P.V., Evans D. A., Sharp W.R., Yamada Y. Eds. McMillan Publishing Co. New York. pp. 82-123.
- AMMIRATO, P.V. (1987). Organizational events during somatic embryogenesis. En: Plant Tissue and cell culture. V. 3. Green, Eds. Alan, R. Liss Inc. New York. Pp. 57-81.
- ATANASSOV, A.& Brown, D.C. (1984). Plant regeneration from suspension culture and mesophyll protoplasts of *Medicago sativa* L. Plant Cell Tissue and Organ Culture 3, 149-162.
- BINGHAM, E.T., L.V. Hurley, D.M. Kaatz y J.W.Saunders. (1975) Breeding alfalfa which regenerates from callus tissue in culture. Crop. Sci. 15: 719-721
- BOLTON J.L., B.P. Golpen y H. Baezinger. (1972). World distribution and historical developments. En: Alfalfa Science and Technology. No 15 series Agronomy. Hanson C. H. Ed. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin.
- BRAHUER H.B. (1986). Fitogénetica Aplicada. Ed. Limusa, México D.F.
- CASTRO A.L. (1982). Gupia para cultivar alfalfa en los estados de México e Hidalgo. Folleto para productores No. 15. INIA-SARH. México.
- CONGER B.V. (1980). Agronomic Crops. En: Cloning agricultural plants via in vitro techniques. Conger B.V. Ed. C.R. C. Press. Florida. Pp 165-215.
- Del Pozo I.M. (1977). La alfalfa su cultivo y aprovechamiento. Segunda Edición. ED. Mundi Prensa España.
- DODDS J. H. Y L. W. Roberts (1982). Experiments in Plant Tissue Culture. Cambridge University Press. New York.
- DOS SANTOS A. V. P., D. E. Outka, E. C. Cocking y M.R. Davey. (1980). Organogenesis and somatic embryogenesis in tisúes derived from leaf protoplasts and leaf explants of *Medicago sativa*. Z. Pflanzenphysiol. 99: 261-270.
- EVANS D.A., W.R. Sharp y C. E. Flick. (1981). Growth and behavior of cell cultures, embryogenesis and organogenesis. EN: Plant Tissue Culture Methods

and Applications in Agriculture. Thorpe T. A. Ed. Proceedings of UNESCO Symposium, Sao Paulo Brazil. Academic Press, New York. Pp 45-113.

GAMBORG U.L., R.A. Miller y K. OJIMA. (1968). Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151-158.

GÓMEZ L. M. (2001) Producción de vacunas y compuestos farmacéuticos en plantas transgénicas. CINVESTAV. Irapuato. pp. 365-375.

GUERRERO, A.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. CINVESTAV., 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.

HEARNNDEZ G. (1993) Embryogenic response of mexican alfalfa (*Medicago sativa*) varieties. *Plant Cell*: 34 Holanda pp 299-302.

HERRERA E. L., JOFRE. A., GARFIAS. (1997) Transformación genética de plantas. CINVESTAV Irapuato.

JACKSON, A.C., Wunner, H.W. ed. 2002. Rabies. Academic Press. London, U.K. p. 371

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.

KAO K.N. y M. R. Mychayluk. (1981). Embryoid formation in alfalfa cell suspension cultures from different plants. *In vitro* 17 (7): 645-648.

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.

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.

MEJÍA, A. (1998) Manual de prácticas de microbiología general. Facultad de Química, UNAM pp 222-254.

NUÑEZ, 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 ADN-microprojectile delivery procedures, *Mol. Gen. Genet.*, 235: 279-284.

RADFORD A.E., W. C. Dickinson, J. Massey y R.C. Bell (1974). Vascular Plants Systematics. Harper & Row Publishers INC. U. S. A. Pp 651-669.

ROBLES S.R. (1979). Producción de granos y forrajes. Segunda edición. Ed. Limusa.. México. D.F.

SAUNDERS J.W. y E. T. Bingham. (1972). Production of alfalfa plants from callus tissue. *Crop. Sc* 12: 804-808.

SAUNDERS J.W. y E. T. Bingham. (1975). Growth regulator effects on bud initiation in callus cultures of *Medicago sativa*. *Amer. J. Bot.* 62 (8): 850-855.

SHARP W. R., M.R. Sondhal, L.S. Caldas y S.B. Maraffa.. (1980). The physiology of asexual embryogenesis. *Hort. Rev.* 2: 268-310.

SKOKUT T.A., J. Manchester y J. Schaefer. (1985). Regeneration in alfalfa tissue culture stimulation of somatic embryo production by amino acids and N-15 NMR determination of nitrogen utilization. *Plant. Physiol.* 79: 579-583.

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.

STREET, H.E. (1977). Plant tissue and cell culture botanical monographs. Vol. II Blackwell Scientific. Publications Oxford. Pp.614.

STUART D.A. y S.G. Strickland (1984). Somatic embryogenesis from cell cultures of *Medicago sativa* L. The role of amino acids additions to the regeneration medium. *Plant Sci. Lett.* 34: 165-174.

STUART D.A., J. NELSEN y J.W. Nichol. (1985). Factors affecting developmental processes in alfalfa cell cultures. En: *Tissue Culture in Forestry and Agriculture*. Henke K. W., Contantin M.P. y Hollander A. Ed. Plenum Publishing Co. New York. Pp 59-73.

TISSERAT B., E. B. Esau y T. Murashige. (1979) Somatic embryogenesis in angiosperms. *Horticultural Rev.* 1: 1-78.

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.

VILLEGAS, T.L. (1986) Developmental study of somatic embryogenesis in *Medicago sativa* . Research proposal to the department of Biology. University of Ottawa. Canada. Pp 27

WAGNER, K.E. Basic Virology. Blackwel Science. U.S.A. 1999. P 33-44.

WALKER K.A. y S.J. Sato (1981). Morphogenesis in callus tissue of *Medicago sativa* : The role os ammonium ion in somatic embryogenesis.. *Plant Cell Tiss. & Org. Cult.* 1: 109-121.

WALKER K.A., P. C. Yu, S. J. Sato y E.G. Jaworski (1978). The hormonal control of organ formation in callus of *Medicago sativa* L. cultured *in vitro*. *Amer. J. Bot.* 65 (5): 654-659.

WILLIAMS E.G. y G. Maheswaran (1986). Somatic Embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. *Ann. Bot.* 57: 443-462.

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

Páginas web:

1. <http://tusalud.com.mx>, 2003
2. www.mundogar.com, 2002
3. www.el_mundo.es/salud.html, 2000
4. www.ancpu.org, 2002
5. www.infoagro.com.mx, 2003
6. www.pasteur.fr, 2003
7. www.viarural.com.ar, 2002
8. www.drscope.com
9. www.chp.sagarpa.gob.mx , 2001

19. ANEXOS

ANEXO 1

Medios de Cultivo de Bacterias

ETB (por litro):

A 900 ml de H₂O_d agregar:

Bacto-triptofano 12 g

Bacto-extracto de levadura 24 g

Glicerol 4 ml

Agitar hasta que los solutos de disuelvan y esterilizar en autoclave a 15 lb/aq.in 20 min en ciclo líquido. Dejar enfriar a 60°C o menos y después agregar 100 ml de una solución de KH₂PO₄ 0.17 M, K₂HPO₄ 0.72M.

SOC (por litro):

A 950 ml H₂O_d agregar:

Bacto-triptofano 20 g

Bacto-extracto de levadura 5 g

NaCl 0.5 g

Agitar hasta que los solutos de disuelvan. Agregar 10 ml de una solución estéril de KCl 250 mM, ajustar pH a 7.0 con NaOH. Justo antes de usar agregar 5 ml de una solución de MgCl₂ 2M. Ajustar el volumen a 100 ml con H₂O_d y esterilizar en autoclave a 15 lb/aq.in 20 min. Dejar enfriar a 60 °C o menos y agregar 100 ml de una solución estéril de glucosa 1M (la cual se esteriliza por filtración a través de un filtro de 0.22 micrones).

YENB (Yeast extract Nutrient Broth)(por litro):

A 950 ml H₂O_d agregar

Extracto de Levadura: 7.5 g

Caldo nutritivo: 8 g

Esterilizar en autoclave a 15 lb/aq.in 20 min en ciclo líquido.

LB (Por litro)

Peptona de caseína: 10 g

Extracto de levadura: 5 g

Agar-agar : 15 g

Se adicionan 7.5 mL de MgSO₄ 1 M. Esterilizar en autoclave a 15 lb/aq.in 20 min.

Composición de medios de cultivo y suplementos.

Medio MS (Murashige & Skoog, 1962)

Compuesto	PM(g/mol)	Concentración		Stock 100X(mM)
		mg.L ⁻¹	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 ⁻¹	1x10 ⁻²
Solución III				
CaCl ₂ .2H ₂ O	147.020	440.00	3.0	300
KI	166.010	0.83	5X10 ⁻³	0.5
CoCl ₂	237.930	2.5X10 ⁻²	1X10 ⁻¹	1X10 ⁻²
Solución IV				
KH ₂ PO ₄	136.090	170	1.25	125
H ₃ BO ₃	61.860	6.20	0.1	10
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	241.950	0.25	1X10 ⁻³	0.1
Solución V				
FeSO ₄ .7H ₂ O	278.028	27.80	0.1	10
EDTA.2H ₂ O	372.300	37.30	0.1	10
Fuente de carbono				
Sacarosa	342.310	30.00	87.63	
Vitaminas R₂				
Compuesto	PM(g/mol)	Concentración		Stock 100X(μM)
		mg.L ⁻¹	μM	
Tiamina	337.270	2.0	5.93	593
Piridoxina	205.640	1.0	4.90	490
Ac. nicotínico	123.110	1.0	8.12	812
Myo-inositol	180.160	100	555	55506.2
Aminoácidos				
Glicina	75.070	2	26.64	2664

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

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Medio SH (Schenk y Hildenbrant 1972)

Compuesto	PM(g/mol)	Concentración		Stock 100X(mM)
		mg.L ⁻¹	mM	
Solución I				
KNO ₃	101.108	2500	24.72	2472
NH ₄ H ₂ PO ₄	80.040	300	2.609	260.9
Solución II				
MgSO ₄ .7H ₂ O	246.480	400	1.623	162.3
MnSO ₄ .H ₂ O	169.010	10	0.059	5.9
ZnSO ₄ .7H ₂ O	287.540	1	3.4x10 ⁻³	0.34
CuSO ₄ .5H ₂ O	249.680	0.2	8x10 ⁻⁴	0.0801
Solución III				
CaCl ₂ .2H ₂ O	147.020	200	1.3603	136.03
CoCl ₂	237.930	0.1	4.2x10 ⁻⁴	0.04203
Solución IV				
H ₃ BO ₃	61.860	5	0.081	8.1
KI	166.010	0.1	6.x10 ⁻³	0.6024
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	241.950		4.1x10 ⁻³	0.4133
Solución V				
FeSO ₄ .7H ₂ O	278.028	15	0.054	5.4
EDTA.2H ₂ O	372.300	20	0.054	5.4
Fuente de carbono				
Sacarosa	342.310	30.00	87.63	
Vitaminas SH				
Compuesto	PM(g/mol)	Concentración		Stock 1000X(μM)
		mg.L ⁻¹	μM	
Tiamina	337.270	5.0	14.82	14820
Piridoxina	205.640	0.5	2.4314	2431.4
Ac. nicotínico	123.110	5.0	40.614	40614.08
Myo-inositol	180.160	200	1110.124	1110124.3
Reguladores de crecimiento				
2,4-D	221.04	11.2	50.669	5066.9
Cinetina	215.21	0.2	0.9293	92.93

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Medio MJ (Medio SH modificado por McKersie,1994) .

Compuesto	PM(g/mol)	Concentración		Stock 100X(mM)
		mg.L ⁻¹	mM	
Solución I				
KNO ₃	101.108	2500	24.72	2472
NH ₄ H ₂ PO ₄	80.040	300	2.609	2609
Solución II				
MgSO ₄ ·7H ₂ O	246.480	400	4.623	462.3
MnSO ₄ ·H ₂ O	169.010	10	0.059	5.9
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	287.540	1	3.4×10 ⁻³	0.34
CuSO ₄ ·5H ₂ O	249.680	0.2	8×10 ⁻⁴	0.0801
Solución III				
CaCl ₂ ·2H ₂ O	147.020	200	1.3603	136.03
CoCl ₂	237.930	0.1	4.2×10 ⁻⁴	0.04203
Solución IV				
H ₃ BO ₃	61.860	5	0.081	8.1
KI	166.010	0.1	6×10 ⁻³	0.6024
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	241.950		4.1×10 ⁻³	0.4133
Solución V				
FeSO ₄ ·7H ₂ O	278.028	15	0.054	5.4
EDTA·2H ₂ O	372.300	20	0.054	5.4
Fuente de carbono				
Sacarosa	342.310	30.00	87.63	
Vitaminas SH				
Compuesto	PM(g/mol)	Concentración		Stock 1000X(μM)
		mg.L ⁻¹	μM	
Tiamina	337.270	5.0	14.82	14820
Piridoxina	205.640	0.5	2.4314	2431.4
Ac. nicotínico	123.110	5.0	40.614	40614.08
Myo-inositol	180.160	200	1110.124	1110124.3
Reguladores de crecimiento				
2,4-D	221.04	1.0	4.524	452
Cinetina	215.21	0.2	0.9293	92.93
Aminoácidos				
L-prolina	115	288	2504.34	250434.7

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Medio MyT (Medio MS modificado por Olivera F 1995).

Compuesto	PM(g/mol)	Concentración		Stock 100X(mM)
		mg.L ⁻¹	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	0.5
CoCl ₂	237.930	2.5X10 ⁻²	1X10 ⁻⁴	1X10 ⁻²
Solución IV				
KH ₂ PO ₄	136.090	170	1.25	125
H ₃ BO ₃	61.860	6.20	0.1	10
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	241.950	0.25	1X10 ⁻³	0.1
Solución V				
FeSO ₄ .7H ₂ O	278.028	27.80	0.1	10
EDTA.2H ₂ O	372.300	37.30	0.1	10
Fuente de carbono				
Sacarosa	342.310	30.00	87.63	
Vitaminas Cocktel 20				
Reguladores de crecimiento				
Compuesto	PM(g/mol)	Concentración		Stock 100X(μM)
		mg.L ⁻¹	μM	
MCPP	214.5	3.0	13.986	1398.6
BAP		0.3		
Aminoácidos				
L-prolina	115	288	2504.34	250434.7
Adenina	184.20	10	54.30	5430
Antioxidante				
Ac. ascórbico	172.0	15	87.20	8720.93
Ac. cítrico	210.46	15	71.272	7127.24

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Mezcla de aminoácidos y vitaminas denominada cocktail 20. Olivera F 1990

Compuesto	PM(g)	Concentración		Stock 100X(mM)
		mg.L ⁻¹	µM	
L-asparagina	150.10	10	66.62	6.66
L-arginina	174.20	10	57.40	5.74
L-ác. aspártico	133.10	7.5	56.35	5.63
Glicina	75.07	23	306.38	30.64
Glutamina	146.10	60	410.67	41.06
Ac. glutámico	147.10	7.5	51	5.10
Biotina (Vit. B ₈)*	244.30	1	4.10	0.41
Ac. fólico (B ₉)*	441.40	1	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	8.90	0.89
Myo-inositol	180.16	145	804.84	80.48
Urea	60.06	45	749.25	74.92

*Disolver con 3 gotas de NaOH 1 N.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Soluciones para preparar X-Gluc (10X) y medir la expresión transitoria de gas
(Jefferson et al., 1987).

1) Amortiguador de fosfato de sodio*

	Peso (g.)	Volumen dH ₂ O (mL)	Concentración (mM)	Stock (mL)
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	1.38	50	200	39
Na ₂ HPO ₄	2.84	100	200	61
Total				100

2) Ferrocianuro de potasio**

	Peso (g.)	Volumen dH ₂ O (mL)	Stock (mM)
K ₄ Fe(CN) ₆ .3H ₂ O	0.211	100	5

3) Ferricianuro de potasio**

	Peso (g.)	Volumen dH ₂ O (mL)	Stock (mM)
K ₃ Fe(CN) ₆	0.164	100	5

4) EDTA*

	Peso (g.)	Volumen dH ₂ O (mL)	Stock (mM)
C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₁₀ Na ₂ 2H ₂ O	3.72	100	100

5) Tritón X-100*

	Volumen (mL)	Volumen dH ₂ O (mL)	Stock (%)
Tritón X-100	1	99	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 μm de diámetro.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

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

	Concentración (mM)	Stock (10X)	Para 25 mL
Amortiguador de Fosfato de Sodio pH 7.0	100	1 M	2.5
EDTA	10	100 mM	2.5
Ferricianuro de Potasio	0.5	5 mM	2.5
Ferrocianuro de Potasio	0.5	5 mM	2.5
Tritón X-100	0.5	5 mM	2.5
X-Gluc en DMSO	1.0mg.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.

Soluciones para medir expresión transitoria de gluc.

a) Buffer "Z" pH 7.4

	Concentración (mM)	Peso (g)/500 mL dH ₂ O
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.cm⁻² ó 18 lb.pulg⁻².

