



Instituto Politécnico Nacional

Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología

***Construcción de un vector para modificación genética de cloroplastos de alfalfa
y estudios para la regeneración in vitro de la planta***

Que para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Bioprocesos presenta:

Francisco Morales Godos

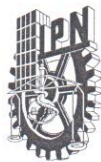
DIRECTORES DE TESIS:

Dr. Jesús Agustín Badillo Corona
Dra. María del Carmen Oliver Salvador
Departamento de Bioprocesos
UPIBI-IPN



Junio de 2011

Acta de Revisión



SIP-14-BIS

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D. F. siendo las 12:00 horas del día 30 del mes de junio del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la UPIBI – IPN para examinar la tesis titulada:

Construcción de un vector para modificación genética de cloroplastos de alfalfa y estudios para la regeneración in vitro de la planta

Presentada por el alumno:

Morales
Apellido paterno

Godos
Apellido materno

Francisco
Nombre(s)

Con registro:

B	0	9	1	5	4	4
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Bioprocesos

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Director de tesis

Dr. Agustín Badillo Corona

Dr. Gustavo Valencia del Toro

Dr. Noé Valentín Durán Figueroa

Director de tesis

Dra. María del Carmen Oliver Salvador

Dra. Claudio Garibay Orijel

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dra. María Guadalupe Ramírez Sotelo

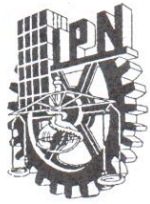


INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL
INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

Carta de Cesión de derechos

Construcción de un vector para modificación genética de cloroplastos de alfalfa y estudios para la regeneración in vitro de la planta

Carta de Cesión de derechos



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

En la Ciudad de México el día 15 del mes de junio del año 2011, el que suscribe Francisco Morales Godos, alumno del Programa de Maestría en Ciencias en Bioprocesos con número de registro B091544, adscrito a la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Jesús Agustín Badillo Corona y de la Dr. María del Carmen Oliver Salvador y que cede los derechos del trabajo titulado **Construcción de un vector para modificación genética de cloroplastos de alfalfa y estudios para la regeneración in vitro de la planta**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección jbadillo@ipn.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



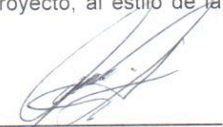
Francisco Morales Godos

Declaración de Originalidad

Construcción de un vector para modificación genética de cloroplastos de alfalfa y estudios para la regeneración in vitro de la planta

Declaración de Originalidad

"Yo declaro que esta tesis, así como los resultados en ella reportados, son producto de mi trabajo y que hasta donde yo sé no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona, ni tampoco tiene material que haya sido utilizado para obtener algún grado o diploma en alguna otra institución educativa excepto en donde se reconoce como tal. Declaro igualmente que hago justo reconocimiento en la tesis a las personas que contribuyeron con su trabajo y, finalmente, declaro que esta tesis es producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación o a la expresión escrita."


Francisco Morales Godos

Vo. Bo. Dr. Jesús Agustín Badillo Corona



Vo. Bo. Dr. María del Carmen Oliver Salvador

"Yo Francisco Morales Godos declaro que los resultados reportados en esta tesis son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Asimismo, declaro que hasta donde yo sé no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona excepto donde se reconoce como tal a través de citas y con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información presentada sin citar a un tercero es de mi autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de esta tesis es producto de mi trabajo con la dirección y apoyo de mi director de tesis y mi comité tutorial en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación o a la expresión escrita."

RESUMEN

Diversos son los ejemplos de situaciones en las que se desearía tener sistemas de producción de biofármacos más baratos, rentables y eficientes por su alta demanda en la sociedad. Al respecto, la modificación genética de cloroplastos representa una valiosa alternativa en la producción de proteínas con aplicaciones terapéuticas al reducir considerablemente los costos de producción que son inherentes a los procesos convencionales de fermentación, purificación y almacenamiento en frío.

Al ser organelos semiautónomos, los cloroplastos contienen la maquinaria metabólica necesaria para llevar a cabo la replicación, transcripción y traducción de los genes codificados en su genoma y de genes exógenos que puedan introducirse mediante alguna técnica de modificación genética, como la biobalística. Sin embargo, la mayoría de las investigaciones sobre modificación genética de cloroplastos se han realizado en *Nicotiana tabacum* que contiene altas concentraciones de alcaloides y toxinas.

En este trabajo se realizó el diseño y construcción de un vector específico para la modificación genética de *Medicago sativa* (alfalfa) y el establecimiento de un protocolo de regeneración para los tejidos de esta planta. Alfalfa es una especie vegetal inocua para seres humanos y animales, por lo que la expresión de proteínas terapéuticas en sus cloroplastos sería una mejora considerable con respecto al modelo convencional de tabaco.

Para la construcción del vector específico de transformación de alfalfa se utilizó la región *psbA – trnH* de *M. truncatula*, en la cual se insertó un sitio de clonación múltiple con 19 sitios de restricción únicos. De estos sitios, *EcoRV* fue utilizado para insertar el gen *aadA* que confiere resistencia a espectinomicina y/o estreptomycinina a las especies sensibles a estos antibióticos. La región *psbA – trnH* es altamente conservada entre las diferentes especies de leguminosas y podría usarse efectivamente en la modificación genética de muchas de ellas. El vector también tendría la versatilidad para utilizarse como vector de extensión, haciendo que un grupo o conjunto de genes exógenos puedan ser expresados con solo insertarlos corriente abajo del codón de término del gen *psbA* sin la necesidad de utilizar un promotor adicional al del gen *psbA*.

El protocolo de regeneración propuesto podría emplearse para la formación y propagación de callos en medio MS con ácido 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D) y bencilaminopurina (BAP) a partir de los tejidos no modificados. El tejido caloso disgregado podría ser utilizado para bombardear con el vector construido y obtener, a partir de estos, brotes resistentes a espectinomicina en medio MS con 2,4-D y cinetina.

ABSTRACT

There are several examples of situations in which systems would be cheaper, profitable and efficient for biopharmaceuticals production, due to its high demand in society. In this regard, chloroplasts genetic modification represents a valuable alternative in the production of proteins with therapeutic applications, significantly reducing the production costs that are inherent to fermentation, purification and conventional cold storage processes.

As semi-autonomous organelles, chloroplasts contain the necessary metabolic machinery to carry out replication, transcription and translation of genes encoded in its genome and exogenous genes, which can be introduced by a modification technique like biolistic. However, most research on genetic modification of chloroplasts has been made in the tobacco plant (*Nicotiana tabacum*), which contains high concentrations of alkaloids and toxins.

In this work, it was completed the design and construction of a specific vector for alfalfa genetic modification (*M. sativa*) and the establishment of a tissue regeneration protocol for this plant. Alfalfa is a safe plant species for humans and animals, so that the expression of therapeutic proteins within it represents a considerable improvement over the conventional tobacco model.

For the construction of the specific transformation vector it was used the alfalfa (*M. truncatula*) *psbA – trnH* region, which was inserted into a multiple cloning site (MCS) with 19 unique restriction sites. Of these sites, EcoRV was used to insert the *aadA* gene that confers resistance to spectinomycin and / or streptomycin to susceptible species to these antibiotics. *PsbA – trnH* is highly conserved among different legume species and could be effectively used in genetic modification of many of them. The vector would also have the versatility to be used as a extension vector, making it possible that a group or set of exogenous genes be expressed by simply inserting the codon downstream end of the *psbA* gene without the need for an additional *psbA* gene promoter.

The regeneration protocol could also be used to grow callus on MS medium with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and benzylaminopurine (BAP) from non modified tissue, and to acquire somatic embryos in MS medium with 2,4-D and kinetin to obtain genetically modified non chimeric plants.

Agradecimientos

Mis agradecimientos son para todos los que contribuyeron con mi formación académica.

Créditos

El trabajo de esta tesis fue realizado en el laboratorio de Biotecnología Molecular del Departamento de Bioprocesos de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. Jesús Agustín Badillo Corona y de la Dr. María del Carmen Oliver Salvador; con la asesoría del Dr. Claudio Garibay Orijel y del Dr. Gustavo Valencia del Toro.

Durante el desarrollo de esta tesis se obtuvo el apoyo del CONACyT a través de la beca de Maestría con número de registro 326814.

Dedicatorias

*Dedico el sencillo trabajo que realicé a mis papás,
Yolanda Godos Cortina y
Francisco Morales Landa*

Comité tutorial

Dr. Jesús Agustín Badillo Corona*	Director de tesis
Dr. María del Carmen Oliver Salvador*	Director de tesis
Dr. Claudio Garibay Orijel*	Asesor de tesis
Dr. Gustavo Valencia del Toro*	Asesor de tesis
Dr. Noé Valentín Durán Figueroa	Asesor de tesis

* Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología de Instituto Politécnico Nacional

Índice

Acta de Revisión	i
Carta de Cesión de derechos	ii
Declaración de Originalidad	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
Agradecimientos	vi
Créditos	vii
Dedicatorias	viii
Comité tutorial	ix
Índice	x
Índice de figuras	xii
Índice de tablas	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Proteínas recombinantes (Heterólogas)	3
2.2. Cloroplastos	5
2.3. Producción de compuestos de interés terapéutico en plantas	6
2.4. Expresión de proteínas en Células Vegetales	6
2.5. Aspectos Genéticos de la Expresión de Proteínas en Plantas	8
2.6. Métodos utilizados para la transformación genética de cloroplastos	9
2.7. Vectores para la transformación genética de cloroplastos	10
2.8. Elementos de control para la expresión en cloroplastos	11
2.8.1. Transcripción y regulación transcripcional en cloroplastos	11
2.9. Regeneración de tejidos Vegetales	13
2.9.1. Reguladores de crecimiento vegetal	14
2.9.1.1. Auxinas	15
2.9.1.2. Citocininas	16
2.10. Regeneración de tejidos de alfalfa	16
3. JUSTIFICACIÓN	18
4. OBJETIVOS	19
5. MATERIALES Y MÉTODOS	20

5.1. MATERIALES.....	20
5.1.1. Reactivos.....	20
5.1.2. Medios de cultivo para bacterias y tejidos vegetales.....	20
5.1.3. Cepas bacterianas.....	22
5.1.4. Plásmidos.....	22
5.1.5. Iniciadores.....	23
5.2. MÉTODOS.....	23
5.2.1. Extracción de ADN de células vegetales.....	23
5.2.2. Amplificación de la secuencia homóloga por la técnica de PCR.....	24
5.2.3. Preparación de células químicamente competentes.....	25
5.2.4. Transformación de <i>E. coli</i> DH5 α por choque térmico.....	25
5.2.5. Extracción de ADN bacteriano a pequeña escala.....	25
5.2.6. Extracción de ADN bacteriano a mediana escala.....	27
5.2.7. Secuencia utilizada para el diseño <i>in silico</i> del vector de transformación.....	27
5.2.8. Construcción del vector transformante.....	27
5.2.9. Digestión de ADN con enzimas de restricción.....	28
5.2.10. Ligación de fragmentos de ADN.....	28
5.2.11. Análisis cualitativo de bandas de ADN a partir de geles de agarosa.....	28
5.2.12. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.....	29
5.2.13. Secuenciación de plásmidos.....	29
5.3. PROTOCOLO DE REGENERACIÓN DE TEJIDOS DE ALFALFA.....	29
5.3.1. Material Biológico.....	29
5.3.2. Siembra, incubación y germinación de semillas.....	30
5.3.3. Desinfección de semillas.....	30
5.3.4. Protocolo para desinfección de tejidos vegetales.....	31
5.3.5. Siembra de explantes en medios de cultivo.....	31
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
6.1. Construcción del vector pFM244b.....	33
6.1.1. Selección de la Región Homóloga del genoma plastidial de Alfalfa.....	34
6.1.2. Construcción de plásmidos de la serie FM.....	36
6.1.3. Construcción del plásmido pFM244.....	40
6.1.4. Construcción del plásmido pFM244b.....	42
6.1.5. Construcción del plásmido pFM244b- <i>aadA</i>	44

6.2. Protocolo de regeneración para tejidos vegetales de alfalfa.....	45
6.2.1. Regeneración celular de explantes de alfalfa.....	48
7. CONCLUSIONES.....	56
8. PERSPECTIVAS.....	56
9. BIBLIOGRAFÍA.....	57

Índice de figuras

<i>Figura 1. Estrategia seguida para la construcción del vector transformante.....</i>	<i>33</i>
<i>Figura 2. Secuencia psbA – trnH con sitio de restricción único dentro en la región intergénica de psbA y trnH.....</i>	<i>35</i>
<i>Figura 3. ADN plastidial extraído de las cuatro variedades de trabajo de alfalfa:.....</i>	<i>36</i>
<i>Figura 4. Estructura general de los plásmidos de la serie FM.</i>	<i>37</i>
<i>Figura 5. Incorporación de la secuencia homóloga psbA – trnH en el plásmido pBsKSII.....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 6. Restricciones realizadas con Paul a los plásmidos de la serie FM.....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 7. Restricción realizada con Paul y NdeI a plásmidos que contienen las regiones del sitio de clonación múltiple de pBsKSII (17, 25, 33, 47, 51 y 54) y al plásmido FM244 (44) que ya no las contiene.....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 8. Estructura general del plásmido FM244.....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 9. Restricción realizada a pBsKSII para extraer el sitio de clonación múltiple.....</i>	<i>42</i>
<i>Figura 10. Estructura general del plásmido FM244b.....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 11. Plásmido pFM244b-aadA obtenido al insertar el gen de resistencia a espectinomomicina en pFM244b.....</i>	<i>45</i>
<i>Figura 12. Explantes de alfalfa empleados para el establecimiento del protocolo de regeneración de tejidos.</i>	<i>46</i>
<i>Figura 13. Semillas de alfalfa variedad (M. truncatula) sembradas en medio MS con y sin antibiótico.</i>	<i>47</i>
<i>Figura 14. Desarrollo mixto del tejido a partir de hojas de alfalfa (M. truncatula).</i>	<i>48</i>
<i>Figura 15. Brotes directos obtenidos de meristemos de alfalfa M. sativa variedad Cuf-101..</i>	<i>49</i>
<i>Figura 16. Callos obtenidos de a) tallos, b) hojas y c) meristemos de M. sativa L. después de 30 días de cultivo. El medio MS fue complementado con 2,4-D y BAP a concentraciones de 1.0 mg/L y 0.2 mg/L, respectivamente.</i>	<i>50</i>

Figura 17. Tallos sembrados en medios complementados 2,4-D y BAP, por separado. 51
Figura 18. Tejido calloso de tallos después de 45 días de incubación. 52
Figura 19. Crecimiento semiconfluyente de callos a partir de meristemos de M. sativa L. 52
Figura 20. Embriones somáticos obtenidos de meristemos de la planta M. sativa. 53

Índice de tablas

Tabla 1. Antígenos virales y bacterianos expresados exitosamente en cloroplastos. 7
Tabla 2. Elementos reguladores de la transcripción usados en cloroplastos de plantas superiores. 12
Tabla 3. Medios MS complementados con sacarosa (10g/L), vitamina B5, Agar (7g/L), 2,4-D y BAP a diferentes concentraciones. 21
Tabla 4. Iniciadores para amplificación y secuenciación de plásmidos. 23
Tabla 5. Secuencias homólogas empleadas para insertar genes exógenos en plástidos de plantas superiores. 34
Tabla 6. Sitios de restricción que se encuentran en el sitio de clonación múltiple de pBsKSII. 44
Tabla 7. Inducción de callo después de 30 días a partir de peciolo de las cuatro variedades de trabajo de Alfalfa. 75
Tabla 8. Inducción de callo después de 30 días a partir de tallos de las cuatro variedades de trabajo de Alfalfa. 76
Tabla 9. Inducción de callo después de 30 días a partir de hojas de las cuatro variedades de trabajo de Alfalfa. 77
Tabla 10. Inducción de callo después de 30 días a partir de meristemos de las cuatro variedades de trabajo de Alfalfa. 78

1. INTRODUCCIÓN.

Una de las áreas de mayor impacto de la Biotecnología, no solo desde el punto de vista tecnológico sino económico y social, es la producción de proteínas recombinantes (heterólogas) con aplicaciones terapéuticas, ya que estas pueden producirse en grandes cantidades de forma segura y continua y con ello abastecer la gran demanda de estas para el tratamiento de diversas enfermedades.

En sus inicios, la producción de proteínas recombinantes se limitó al empleo de la ingeniería genética para manipular el material genético contenido en el citoplasma celular de algunas bacterias, levaduras y células animales, y aun en la actualidad la mayoría de las proteínas recombinantes disponibles comercialmente son producidas usando sistemas eucarióticos y procarióticos tradicionales, incluyendo aquellas de uso terapéutico humano y animal (Huang y McDonald, 2009). Sin embargo, en los últimos años el empleo de células vegetales y de los plástidos contenidos en ellas, en especial los cloroplastos, han cobrado importancia como medio de producción de proteínas recombinantes debido a que estos últimos son centros biosintéticos trascendentales que además de llevar a cabo el proceso de la fotosíntesis son responsables de la producción de importantes compuestos como proteínas, aminoácidos, carbohidratos complejos, ácidos grasos y pigmentos (McBride y Stalker, 2006). Mediante la modificación *in vitro* del genoma de cloroplastos se puede lograr la expresión de diversas proteínas con primordiales aplicaciones terapéuticas en la medicina; tema de interés de la presente tesis.

Dentro de los beneficios inherentes a la expresión de transgenes insertados en el genoma de cloroplastos se pueden enfatizar los altos niveles de expresión, que en algunos casos son superiores al 70% de la proteína soluble total en plantas (Oey *et al.*, 2009), la ausencia del silenciamiento de genes y de la variación de los efectos de posición (Maliga, 2003), la habilidad para expresar diversos genes a partir de un único promotor (De Cosa *et al.*, 2001), la herencia genética uniparental de los plástidos, la prevención de la transmisión de DNA exógeno mediante el polen, la integración de genes mediante el proceso de recombinación homóloga y la eliminación de interacciones adversas en el citoplasma (Heifetz, 2000; McBride y Stalker, 2006).

Una célula vegetal típica puede contener aproximadamente 100 cloroplastos con cerca de 100 copias idénticas del genoma plastidial dentro de cada uno de estos, dando un posible total de hasta 10,000 genomas idénticos por célula (James *et al.*, 2005; Maliga, 2003;

Heifetz, 2000) lo que hace a la modificación genética de cloroplastos un sistema de expresión sumamente rentable y prometedor.

La modificación del genoma del cloroplasto, como último fin, tiene diversas ventajas y aplicaciones con respecto a la modificación nuclear y a la modificación de células no vegetales, pero para lograr esa modificación plastidial es necesario desarrollar antes tres áreas de investigación: 1) el diseño y construcción de un vector transformante específico que contenga las secuencias de ADN consideradas como necesarias para lograr la modificación del genoma del cloroplasto, así como para la posible expresión de la proteína de interés (promotor y terminador); 2) el desarrollo de un protocolo de cultivo de tejidos vegetales que permita la regeneración de las células que han sido modificadas genéticamente; en esta segunda área es posible obtener diversos resultados, desde células que pueden crecer en medios de cultivo líquidos, hasta plantas completas, quiméricas o no quiméricas, con cloroplastos cuyo genoma ha sido modificado y; 3) propiamente el establecimiento de la metodología de transformación genética por bombardeo de micropartículas para la especie vegetal en cuestión, en este caso alfalfa

Por lo anterior, los temas centrales a tratar en los antecedentes abarcan aspectos relacionados con el genoma del cloroplasto y el diseño y construcción de un vector transformante, aspectos relacionados con el cultivo de tejidos, así como aspectos relacionados con las técnicas de modificación genética de cloroplastos.

2. ANTECEDENTES.

Las células de algas y plantas terrestres contienen cloroplastos con genomas circulares autorreplicativos que pueden variar en tamaño desde 50 hasta 290 kb y una sola célula vegetal puede contener hasta 10,000 copias de un mismo genoma debido al número de cloroplastos contenidos en ella (Maliga, 2003). Estos cloroplastos tienen un sistema activo de recombinación homóloga, y como consecuencia de ello el genoma se encuentra en un continuo estado de intercambio inter e intramolecular, facilitando así la precisa integración dirigida de secuencias de DNA exógeno que luego se propagan a todas las copias del genoma de ese y de los demás cloroplastos de la célula (Heifetz, 2000). De esta forma la sobreexpresión de proteínas recombinantes dentro de células cuyo genoma plastidial ha sido modificado (células transplastómicas) ofrece entonces una alternativa atractiva en comparación con los sistemas convencionales en relación con los costos de producción inherentes a esta actividad al emplear a las plantas como biorreactores (James *et al.*, 2005).

2.1. Proteínas recombinantes (Heterólogas).

Las proteínas recombinantes o heterólogas son aquellas expresadas a partir de una molécula de ADN artificial diseñada y construida *in vitro* por la unión de secuencias de ADN de dos o más orígenes diferentes. Al introducir esta molécula artificial en una célula huésped se puede producir en ella una modificación genética transitoria o permanente que permite la expresión de la proteína recombinante.

Como se mencionó anteriormente, durante algún tiempo, la producción de proteínas recombinantes se limitó al uso de algunas bacterias, levaduras y células animales, y aun actualmente la mayoría de estas proteínas, incluyendo aquellas de uso terapéutico humano y animal, son producidas usando sistemas eucarióticos y procarióticos tradicionales. Estos sistemas tradicionales incluyen células animales (45%), particularmente células de Ovario de Hamster Chino (CHO), levaduras (15%), células de insecto (sistemas de baculovirus, aunque de forma poco extendida) o cultivos bacterianos (40%), principalmente de *Escherichia coli* (Huang y McDonald, 2009). Con el paso del tiempo las células vegetales y los plástidos contenidos en ellas, como los cloroplastos, amiloplastos y cromoplastos, han cobrado importancia debido a los beneficios que conlleva la inducción de la expresión genética en estas células y sus organelos. Hoy en día existen más de 300 reportes de proteínas con

aplicación terapéutica producidas en plantas (anticuerpos, fragmentos únicos de cadena variable (scFv), antígenos, vacunas, hormonas, factores de crecimiento y proteínas componentes de la sangre humana) (Huang y McDonald, 2009), por otra parte un gran número de genes heterólogos han sido expresados específicamente en cloroplastos de plantas superiores, incluyendo proteínas reporteras para monitorear la eficiencia de elementos regulatorios, proteínas con aplicaciones agronómicas, como resistencia a herbicidas, resistencia a patógenos, proteínas con aplicaciones terapéuticas, como vacunas y anticuerpos y otra gran variedad de enzimas heterólogas (Koop *et al.*, 2007).

El número de proteínas recombinantes usadas con aplicaciones terapéuticas se ha incrementado considerablemente en los últimos 20 años. Muchas de estas aplicaciones comprenden glicoproteínas complejas y anticuerpos con relativamente altas necesidades de producción. Estas necesidades han guiado al desarrollo de una amplia variedad de mejoras en la tecnología de expresión de proteínas, particularmente en sistemas de cultivo de células de mamífero y microbianos. Ha sido solo durante los pasados 25 años que las plantas se han usado para la producción de proteínas recombinantes específicas.

En 2002 había cerca de 155 proteínas terapéuticas aprobadas en Europa y Estados Unidos, y en la actualidad hay más de 200 péptidos y proteínas terapéuticas aprobadas en la lista de la FDA. Solo el mercado de las enzimas de uso industrial alcanzó un valor económico de 2 billones de dólares en el 2000, mientras que aquellas de aplicación terapéutica en 1996 llegaban a los 2.3 billones de dólares (Koop *et al.*, 2007). La realidad hoy es que en 2009 el mercado para los productos proteínicos biofarmacéuticos alcanzó los 50 billones de dólares estimándose para el 2010 en 100 billones de dólares (Huang y McDonald, 2009).

Se sabe que existen diversos modelos de expresión de proteínas recombinantes, tanto eucarióticos como procarióticos, y que cada uno de estos modelos tiene ventajas y desventajas dependiendo del tipo y estructura de la proteína a expresar, pero en general la selección de alguno de los modelos se basa en el costo de producción y en la capacidad de los modelos para sintetizar las proteínas y llevar a cabo eventos o modificaciones postraduccionales necesarias para el correcto plegamiento y función de la proteína.

Los cloroplastos no pueden llevar a cabo todo tipo de modificaciones post-traduccionales (Ma *et al.*, 2003), pero debido a la interrelación existente entre los diversos compartimientos celulares como el núcleo, la mitocondria y los mismos plástidos, se pueden obtener proteínas complejas de una manera aceptable.

2.2. Cloroplastos.

Los plástidos como los cloroplastos en plantas superiores son organelos semiautónomos que cuentan con su propia maquinaria de replicación, transcripción y traducción (Maliga, 2003), son capaces de llevar a cabo el proceso de la fotosíntesis, y de sintetizar compuestos como aminoácidos, carbohidratos complejos, ácidos grasos y pigmentos, además de proteínas, por lo que al modificar su genoma es posible sintetizar proteínas recombinantes aprovechando su maquinaria de replicación, transcripción y traducción (McBride y Stalker, 2006).

A pesar de lo anterior, la modificación de genomas plastidiales es rutina solo en la planta del tabaco y del alga *Chlamydomonas reinhardtii*. La modificación de genomas plastidiales en otras especies, si bien ha sido desmostrado para algunas como lechuga (Lelivelt *et al.*, 2005), soya (Moravec *et al.*, 2007), papa y jitomate (Jiang *et al.*, 2007), entre otros, el establecimiento de protocolos de transformación así como la obtención de niveles de expresión similares a los obtenidos con la planta del tabaco aun se encuentra en discusión y desarrollo.

Sabemos que en las plantas se encuentran mitocondrias y que estos organelos también tienen su propio genoma, pero en contraste con estos la organización del genoma y capacidad codificante en plástidos exhibe relativamente pequeñas variaciones interespecíficas en regiones codificantes (James, 2005), esto se debe a que los genomas de los cloroplastos a lo largo de las diferentes especies de plantas son altamente conservados.

El genoma del cloroplasto, altamente conservado en diversas especies contiene cerca de 120 a 130 genes densamente empacados en dos regiones invertidas repetidas o en copias de dos regiones únicas (Lilly *et al.*, 2001 en James *et al.*, 2005). Estos genes caen dentro de dos categorías: (i) genes relacionados con el proceso de la fotosíntesis y (ii) genes del sistema genético que comprenden la síntesis de rRNAs, tRNAs, proteínas ribosomales y subunidades de la RNA polimerasa. Sin embargo, la gran mayoría de las proteínas plastidiales se encuentran codificadas en el núcleo (Flügge, 2001)

Los plástidos también exhiben un particular arreglo y expresión de los genes, presentando características únicas que son una mezcla de funciones procarióticas y eucarióticas. Por ejemplo, los genes plastidiales se organizan en operones y son co-expresados para producir mRNAs policistronicos. Aún más, la regulación en la expresión de

los genes ocurre a varios niveles, incluyendo la transcripción, el procesamiento y estabilidad del RNA, así como la traducción y procesos postraduccionales (James *et al.*, 2005).

El número de copias de genes codificadas en dos regiones invertidas repetidas de las plantas superiores alcanza cerca de las 20,000 copias, resultando en altos niveles de expresión de los transgenes. La expresión de algunas proteínas exógenas ha llegado a ser del 70% de la proteína soluble total (Oey *et al.*, 2009).

2.3. Producción de compuestos de interés terapéutico en plantas.

Desde principios de los años 90 se han producido compuestos de interés terapéutico como diferentes antígenos vacunales en plantas transgénicas y se ha comprobado que son capaces de desarrollar una respuesta inmune frente a importantes patógenos humanos o animales. Algunas de ellas están en fase clínica de estudio y, en concreto, la vacuna frente al virus Norwalk en 2002 se encontraba pendiente de aprobación para uso comercial en EEUU (Farran *et al.*, 2002). La producción de vacunas en plantas tiene las siguientes ventajas frente a los sistemas tradicionales de administración de virus muertos o atenuados: mayor seguridad biológica, ya que las plantas no se contaminan con patógenos humanos o animales; la planta podría administrarse de forma sencilla por vía oral en forma de unidosis encapsulada, evitando el empleo de agujas y jeringas; no se requiere el mantenimiento de una cadena de frío para la conservación de la vacuna; sistema económico de producción y fácilmente escalable con las técnicas agrícolas convencionales; posibilidad de producir vacunas multicomponentes (Farran *et al.*, 2002).

2.4. Expresión de proteínas en Células Vegetales.

Después de que la hormona de crecimiento fuera producida por vez primera en células de tabaco en 1986, muchas otras proteínas, incluso de origen humano, han sido obtenidas de células vegetales (Barta *et al.*, 1986; Staub *et al.*, 2000).

En 1989 la IgG1 (éster fosfonato) fue el primer anticuerpo expresado en células de tabaco, demostrando de esta manera que las plantas podían ensamblar proteínas complejas (Ma *et al.*, 2003).

La autenticidad estructural de las proteínas recombinantes expresadas en plantas se confirmó en 1992, cuando las plantas fueron usadas por primera vez en la producción de una vacuna experimental: el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBV) (Hugh *et al.*, 1992). Posteriormente se comprobaría que la vacuna producida en células de tabaco era capaz de conferir respuesta inmunológica después de ser inyectada en ratones (Ma *et al.*, 2003).

Más recientemente las células vegetales han sido utilizadas para producir enzimas a nivel industrial, proteínas técnicas con aplicaciones en investigación, proteínas de la leche empleadas como suplementos nutricionales y nuevos polímeros proteínicos con aplicaciones tanto médicas como industriales (Ma *et al.*, 2003).

Algunos antígenos virales que han sido expresados exitosamente en cloroplastos de plantas superiores se anotan a continuación:

Tabla 1. Antígenos virales y bacterianos expresados exitosamente en cloroplastos.

Antígeno	Enfermedad relacionada al patógeno	Especie en la que se expresó	Referencia
A27L	Infección por virus Orthopox	Tabaco	Rigano <i>et al.</i> , 2009
HPV 16 L1	Cancer cervical papilomavirus	Tabaco	Fernández <i>et al.</i> , 2008
2L21:CTB	Infección parvovirus canino	Tabaco	Molina <i>et al.</i> , 2004
Pr55 ^{gag}	Infección por VIH	Tabaco	Scotti <i>et al.</i> , 2009
P24	Infección por VIH	Tabaco	McCabe <i>et al.</i> , 2008
P24 P24:Nef	Infección por VIH	Tabaco	Zhou <i>et al.</i> , 2008
VP6	Infección por rotavirus	Tabaco	Birch-Machin <i>et al.</i> , 2004
LTB-ST	Inf. <i>E coli</i> Ent.	Tabaco	Rosales <i>et al.</i> , 2009
CTB	Colera	Tabaco	Daniell <i>et al.</i> , 2001
CTB-AMA	Colera-Malaria	Tabaco	Davoodi-Semiromi <i>et al.</i> , 2010
F1-V	Plaga	Tabaco	Arlen <i>et al.</i> , 2007,2008
TetC	Tetanos	Tabaco	Tregoning <i>et al.</i> , 2003, 2005
OspA	Lyme	Tabaco	Glenz <i>et al.</i> , 2006; Hening <i>et al.</i> , 2007
ESAT6	Tuberculosis LTB	Tabaco	Rigano <i>et al.</i> , 2004

2.5. Aspectos Genéticos de la Expresión de Proteínas en Plantas.

Uno de los objetivos de la expresión de proteínas en plantas es la producción con altos rendimientos. Para alcanzar altos niveles de expresión, el diseño de los vectores debe optimizar todos los estados de la expresión del gen, desde la transcripción hasta la estabilidad de la proteína. Los vectores de expresión son estructuras quiméricas en las que el transgen se encuentra flanqueado por varios elementos regulatorios que son reconocidos por las plantas. Para altos niveles de transcripción, los dos elementos más importantes son el promotor y el sitio de poliadenilación, los cuales, en modificación nuclear a menudo se derivan de los transcritos 19S y 35S del virus de mosaico de coliflor (CaMV) (Ma *et al.*, 2003).

El CaMV 35S es el promotor más popular en la modificación de plantas dicotiledonias. Es un promotor constitutivo muy fuerte, sin embargo, tiene una baja actividad en plantas monocotiledonias. La presencia de un intrón en la región no transcrita 5' del vector ha demostrado potenciar la actividad de la transcripción en plantas monocotiledonias (Ma *et al.*, 2003).

Los promotores que permiten la expresión de los transgenes bajo condiciones ambientales particulares de desarrollo y de tejidos tienen un amplio potencial de aplicación, por ejemplo, incrementos de estabilidad de las proteínas y la eliminación de la acumulación de proteínas en órganos vegetativos. Promotores inducibles, que responden a estímulos internos y externos físicos y químicos, pueden ser utilizados para restringir o potenciar la expresión de un transgene (Ma *et al.*, 2003).

En modificación nuclear, factores que tienen influencia sobre la expresión genética en células vegetales pueden ser no controlados mediante el diseño del vector, lo cual puede guiar a la expresión variable de los transgenes y, en algunos casos, hasta su inactivación. Estos factores incluyen la posición de integración del transgen en la célula modificada, la estructura de los locus transgénicos, el número de copias del gen y la presencia de copias rearrregladas o truncas de genes. Diversas estrategias han sido adoptadas en un intento por minimizar la variación de la expresión transgénica, incluyendo recientemente el uso de genes que suprimen el silenciamiento de genes. Estudios preliminares, han indicado que la cotransformación de plantas con transgenes primarios y un supresor viral del silenciamiento de genes, incrementa notablemente los niveles de expresión. La habilidad de insertar transgenes de copia única dentro de localizaciones precisas dentro del núcleo de la célula

vegetal puede eliminar los efectos de posicionamiento y los problemas asociados a la estructura del locus (Ma *et al.*, 2003).

El tabaco se ha constituido a lo largo de la corta historia de la modificación genética en plantas, en el sistema modelo de cultivo y es la planta más utilizada para llevar a cabo la producción de proteínas recombinantes en laboratorio, pero al contener alcaloides en su estructura bioquímica, no es aceptada con facilidad a pesar de que las proteínas expresadas pueden purificarse. Por lo anterior es necesario buscar otros sistemas de expresión que, al igual que tabaco, tengan altos rendimientos y una relativa facilidad para realizar modificaciones en su genoma, pero sin contener los alcaloides que contiene tabaco.

En el caso de plantas cuyo genoma plastidial ha sido modificado, estas reciben el nombre de plantas transplantómicas y se modifican mediante biobalística. La ingeniería genética de los cloroplastos ofrece un gran número de beneficios, incluyendo un alto nivel de expresión de los transgenes, la posibilidad de incorporar diversos genes en un solo evento de modificación, mantenimiento de los transgenes vía herencia materna, inexistente silenciamiento de genes, efectos de posición y pleiotrópicos y también se evita la incorporación de DNA indeseado.

2.6. Métodos utilizados para la transformación genética de cloroplastos.

La tecnología básica de la transformación genética de cloroplastos fue desarrollada originalmente para *Chlamydomonas reinhardtii* (James *et al.*, 2005), y muchas de las técnicas empleadas, como la transferencia de ADN vía bombardeo de partículas han sido aplicadas directamente a las plantas. Sin embargo, hay diferencias biológicas entre los plástidos contenidos en un alga unicelular y una célula vegetal, las cuales incluyen el tamaño de los genomas y genes presentes, el número de copias del genoma presentes por célula y el número de nucléidos por plástido, la morfología de las células y el tipo de tejido.

En cloroplastos dos métodos básicos se han empleado para la modificación de su genoma, la biobalística (Svab y Maliga, 1993) y el tratamiento de protoplastos con polietilenglicol (PEG) (Lelivelt, 2005). En biobalística se asume que el DNA transformante entra al genoma mediante el impacto mecánico de proyectiles de oro o tungsteno cubiertos con este DNA transformante, mientras que el mecanismo que sigue la transformación de los cloroplastos mediante el tratamiento de protoplastos con polietilenglicol (PEG) es aun desconocido (Koop *et al.*, 2007).

2.7. Vectores para la transformación genética de cloroplastos.

Los plásmidos son moléculas de DNA extracromosómico que tienen todos los elementos para replicarse en una célula u organelo, pero no se replican de manera autónoma. La mayoría están constituidos por un DNA bicatenario circular cerrado de tamaño muy variable (1 a >200 Kb), que se puede aislar de una bacteria en forma superenrollada. Se encuentran en una gran variedad de especies bacterianas, pero suelen tener un rango de huésped estrecho. Los plásmidos contienen con frecuencia genes que codifican enzimas útiles para el sistema de expresión huésped como genes de resistencia a antibióticos, de degradación de compuestos orgánicos, de toxinas, y de producción de enzimas de restricción y modificación, entre otros.

El diseño del plásmido depende del propósito y del experimento específico, y la manera de expresar los genes puede ser transitoria o permanente. La expresión transitoria indica que el vector se ha incorporado a la célula pero no en su genoma, mientras que la expresión permanente sugiere la incorporación de un fragmento o todo el vector en el genoma de la célula, o en su caso del cloroplasto. Para que un fragmento de DNA, que contendrá los genes que se desean introducir y expresar, se inserte en el genoma del cloroplasto, se necesita que exista homología entre las regiones que flanquean a estos genes y una región del genoma del cloroplasto.

En cloroplastos, el tamaño de estas secuencias homólogas debe tener una longitud de aproximadamente 1 kb (en cada flanco de los genes a introducir) ya que secuencias más pequeñas pueden reducir la eficiencia en la recombinación (Koop *et al.*, 2007). Los cassettes de expresión en los vectores de transformación de cloroplastos requieren elementos regulatorios, como promotores, regiones 5' no traducidas o 5' UTRs por sus siglas en inglés, sitios de unión al ribosoma o RBS por sus siglas en inglés y regiones 3' no traducidas o 3'UTRs, que son compatibles con la maquinaria de expresión del genoma plastidial. Un sistema de expresión heterólogo puede también ser utilizado, y comprende el empleo de una RNA polimerasa heteróloga (normalmente expresada desde el núcleo). Diversas modificaciones consisten en una caja río abajo para hacer más eficiente la traducción, la incorporación de etiquetas que permiten una fácil purificación y la estabilidad de las proteínas y sitios de corte de las proteínas, si se requiere de modificaciones posteriores como producto terminado.

2.8. Elementos de control para la expresión en cloroplastos.

Diversos factores se deben considerar en el diseño y construcción de vectores para modificación genética y en su mayoría se fundamentan en los mecanismos de transcripción y traducción de los genes.

2.8.1. Transcripción y regulación transcripcional en cloroplastos.

Para los eventos de transcripción el cloroplasto posee dos polimerasas diferentes: a) la RNA polimerasa codificada por el núcleo (NEP por su acrónimo en inglés; *nuclear encoded polymerase*) y; b) la RNA polimerasa codificada por el plástido (PEP por su acrónimo en inglés; *plastid encoded polymerase*). La naturaleza procariota del cloroplasto le permite sintetizar RNA monocistrónico o policistrónico a partir de promotores fuertes que dirigen la expresión de uno o varios genes sin necesidad de tener más que un solo promotor. Es importante para la expresión de proteínas recombinantes en cloroplastos la optimización de los cassettes de expresión, consistente en la utilización de las secuencias regulatorias apropiadas tanto en el extremo 5' como en el 3' de estos cassettes y los promotores derivados de genes endógenos de cloroplastos, con o sin sus regiones nativas no transcritas 5' y 3', han probado su utilidad para la expresión constitutiva de genes heterólogos en cloroplastos de plantas superiores (Heifetz, 2000). Dentro del grupo de promotores más ampliamente utilizados se encuentran los correspondientes a los genes de *psbA*, *16S rRNA (rrn)*, *rbcL*, *trnV* y *rps16* (Daniell *et al.*, 1998; Koop *et al.*, 1996; Svab y Maliga, 1993; Carrer *et al.*, 1993; Serino y Maliga, 1997; Maliga *et al.*, 1993; Staub *et al.* 1993, 1994 y 1995). En el presente trabajo se emplea el gen de resistencia a espectinomicina *aadA* como gen de selección, y éste contiene el promotor *Prmn* del gen *rrn16* (Staub y Maliga, 1994).

Diferentes genes pueden contener promotores reconocidos por PEP, por NEP o por ambas RNA polimerasas, y aunque no se ha detectado hasta el momento una notoria diferencia entre la eficiencia en la transcripción, se sabe que PEP juega un papel mayoritario en hojas y cloroplastos maduros (Cahoon *et al.*, 2004; Zoschke *et al.*, 2007), presentando a PEP como un objetivo de importancia en la regulación de las señales de transcripción, incluido el control de la óxido-reducción en cloroplastos (Bock, 2007).

Un gran número de diferentes elementos regulatorios han sido probados en la expresión de genes heterólogos en cloroplastos de plantas superiores (tabla 2), pero solo unos cuantos son usados continuamente en vectores de expresión para cloroplastos, por ejemplo, el promotor plastidial constitutivo fuerte del rRNA 16S, que también es usado en combinación con la región no transcrita T7G10-5'-UTR viral (Staub *et al.*, 2000; Kuroda y Maliga, 2001), o alternativamente con el sitio de unión a ribosomas (rbs) sintético de 18 pares de bases de la región no transcrita *rbcL*-5'-UTR (Svab y Maliga, 1993).

Tabla 2. Elementos reguladores de la transcripción usados en cloroplastos de plantas superiores

Elementos reguladores de la transcripción	Referencia
Promotores	
16S rRNA	Svab y Maliga, 1993
<i>psbA</i>	Staub y Maliga, 1993
T7G10^{b,c}	McBride <i>et al.</i> , 1994
<i>clpP</i>	Sriraman <i>et al.</i> , 1998
<i>trcb</i>	Newell <i>et al.</i> , 2003
<i>rbcL</i>	Herz <i>et al.</i> , 2005
PHS^{b,d}	Buhot <i>et al.</i> , 2006
<i>atpI</i>	Wurbs <i>et al.</i> , 2007
Regiones 5' no transcritas	
<i>rbcL</i> (rbs)	Svab y Maliga, 1993
<i>psbA</i>	Staub y Maliga, 1993
T7G10_b	Staub <i>et al.</i> , 2000
<i>atpB</i>	Kuroda y Maliga, 2002
<i>clpP</i>	Kuroda y Maliga, 2002
<i>rpl22</i>	Herz <i>et al.</i> , 2005
<i>psbC</i>	Herz <i>et al.</i> , 2005
<i>psaB</i>	Herz <i>et al.</i> , 2005
IRES_{cp148b}	Herz <i>et al.</i> , 2005
<i>atpI</i>	Wurbs <i>et al.</i> , 2007
Regiones 3' no transcritas	
<i>psbA</i>	Staub y Maliga, 1993
<i>Rps16</i>	Zoubenko <i>et al.</i> , 1994
<i>rbcL</i>	Eibl <i>et al.</i> , 1999
<i>Rpl32</i>	Eibl <i>et al.</i> , 1999
<i>rrnB</i>	Newell <i>et al.</i> , 2003
<i>Ta_b</i>	Buhot <i>et al.</i> , 2006

a Elementos de control de la expresión usados en varias combinaciones (No hay ejemplos presentes en esta tabla).

b Elementos reguladores de origen diferente al cloroplasto: *trc* (*E. coli*), PHS (*E. coli groE*, promotor por choque térmico), T7G10 (promotor del gen 10 del fago T7), IRES_{cp148} (sitio interno de unión al ribosoma de la proteína de la cápside de tobamovirus, *Ta* (*E. coli*, atenuador de treonina).

c Require de T7-RNA polimerasa.

d Require de un factor de transcripción quimérico.

Los elementos de control regulados por luz del gen *psbA* (promotor y regiones 5'UTR y 3'UTR) también son usados frecuentemente (Staub y Maliga, 1993; Fernández-San Millan, 2003) y han demostrado tener influencia en altos niveles de expresión. Por otra parte, muy altos niveles de expresión se han obtenido con el sistema del fago T7 (promotor y 5'-UTR), el cual se relaciona en gran medida con la NEP que es codificada en núcleo y después importada al cloroplasto (McBride *et al.*, 1994), pero también con vectores de extensión que se encuentran bajo el control de promotores endógenos fuertes (Staub y Maliga, 1995; Herz *et al.*, 2005).

2.9. Regeneración de tejidos Vegetales.

La aplicación de las diferentes técnicas de modificación genética requiere a su vez de técnicas que permitan regenerar los tejidos vegetales que han sido modificados, de esta se pueden obtener desde líneas celulares que pueden crecer en suspensión dentro de reactores biológicos diseñados para tal efecto hasta plantas completas quiméricas o no quiméricas en las que se expresan el gen o genes que se han insertado al modificar su genoma.

En el caso de la biobalística, antes de aplicar esta técnica a cualquier tejido, es necesario realizar experimentos de regeneración que permitan determinar las condiciones bajo las cuales los tejidos sometidos a la técnica son capaces de regenerar la planta completa.

Se sabe que en las especies vegetales las células de algunos órganos mantienen su capacidad para dividirse cuando son separadas de la planta y cultivadas *in vitro*. Si se acepta que estas células son totipotentes, entonces sería posible dirigir a dichas células hacia diferentes rutas morfogénicas mediante su desarrollo en medios sintéticos con condiciones adecuadas de cultivo. Esta es una de las premisas que sustentan los estudios de diferenciación y desarrollo aprovechando las ventajas del cultivo de tejidos vegetales.

Al realizar investigaciones en este tema se aportan los conocimientos necesarios para llevar a cabo el crecimiento en medios de cultivo artificiales de células vegetales, tejidos y órganos aislados de una planta madre. Los conocimientos incluyen técnicas y métodos usados en fisiología vegetal y con fines prácticos diversos. En el caso, del presente trabajo, es necesario el establecimiento de las condiciones de regeneración de tejidos que serán

empleadas para obtener líneas transplastómicas generadas a partir de la modificación genética del genoma plastidial de células de alfalfa mediante la técnica de biobalística.

2.9.1. Reguladores de crecimiento vegetal.

Los reguladores de crecimiento son los principales elementos a considerar en el establecimiento de un protocolo para la regeneración de tejidos.

Went y Thiman (Hurtado, 1997) definieron a las hormonas de crecimiento como “sustancias que siendo producidas en una parte de un organismo son transferidas a otra y en ésta influyen un proceso fisiológico específico”. De esta forma los reguladores de crecimiento estimulan, inhiben o modifican de algún modo cualquier proceso fisiológico en las plantas. Se sabe que la mayor parte de la actividad fisiológica de las plantas, si no en su totalidad, está mediada por los reguladores de crecimiento (Devlin, 1980) y actualmente se reconocen cinco tipos básicos de sistemas químicos de reguladores de crecimiento vegetal (Leopold y Kriedemann, 1975):

- a) Promotores del crecimiento: auxinas, citocininas y giberelinas.
- b) Inhibidores del crecimiento: ácido abscísico.
- c) Efectores del desarrollo, maduración y envejecimiento de todas las plantas: etileno.

También existen otras hormonas como los brasinosteroides que juegan un papel esencial en el crecimiento y desarrollo, participando en procesos de expansión, división y diferenciación celular en los tejidos jóvenes de las plantas en crecimiento (Seeta, 2002), o las estringolactonas, que aunque no se catalogan como hormonas tienen relevancia en la germinación de semillas y en la relación simbiótica entre las raíces de algunas plantas y hongos micorrizicos (Xiaonan, 2010).

De las cinco clases regulatorias de crecimiento vegetal (fitohormonas), las auxinas y las giberelinas estimulan principalmente la elongación celular, mientras que las citocininas estimulan la división celular.

Cada sistema es diferente a los demás en sus características químicas y en la capacidad de inducir respuestas de crecimiento, pero también en su capacidad de influir en muchos aspectos del crecimiento, de la diferenciación y en muy diversos fenómenos del desarrollo de las plantas, promoviéndolos o inhibiéndolos (Leopold y Kriedemann, 1975).

En esta tesis solo se abordarán los reguladores que corresponden a los promotores de crecimiento vegetal (auxinas y citocininas) debido a que son mayoritariamente usados en trabajos de regeneración de tejidos vegetales.

2.9.1.1. Auxinas.

Las auxinas están universalmente presentes en las plantas superiores (Wareing y Phillips, 1973) y de forma natural las concentraciones más altas de auxinas se encuentran en los ápices de crecimiento (ápices de coleótilos, yemas y ápices de hojas), sin embargo, también se encuentran auxinas ampliamente distribuidas por toda la planta que sin duda provienen de regiones meristemáticas (Devlin, 1980). Se distribuyen de diversas maneras entre las células de las plantas, pero se ha encontrado que la falta de oxígeno afecta su transporte y que éste se incrementa con la luz, siendo sensible también a la temperatura (Torrey, 1976).

Como promotores del crecimiento, las auxinas participan ampliamente en la organización de los procesos vegetales, incluyendo la regulación de las proporciones del crecimiento diferencial y la regulación de fenómenos de diferenciación, los cuales son estimulados o inhibidos según la concentración auxínica presente en la célula o estructura vegetal. Los principales efectos de las auxinas son el alargamiento y la división celular, la formación de brotes, raíces, tejido calloso, la respiración, dominancia apical, embriogénesis, entre otros.

Se ha comprobado que las auxinas actúan de modo diverso en el crecimiento por alargamiento celular, como es incrementando el contenido osmótico de la célula y la permeabilidad del agua, reduciendo la presión de la pared y aumentando la síntesis de ARN, proteínas específicas (enzimas) y aún de la misma pared celular, lo que provoca un aumento en la plasticidad de la pared celular, que trae como consecuencia su extensión y con ello un crecimiento por alargamiento (Devlin, 1980). En algunos casos las auxinas en explantes provocan la rápida división de células del parénquima, lo que promueve una hinchazón del tejido que se conoce como callo. En cultivo de tejidos *in vitro* es necesario inducir la formación de callo, teniendo en cuenta que la producción de callo está íntimamente ligada a la concentración y tipo de auxina empleada (Devlin, 1980). Existen auxinas, como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), que son usadas en altas concentraciones para la iniciación

de este tejido (callo), debido a que suprimen la morfogénesis y dan por resultado la rápida proliferación de células de tipo caloso necesarias para el cultivo de tejidos *in vitro*.

En ausencia de citocininas las auxinas provocan el alargamiento celular en los tejidos cultivados, pero en presencia de estas se obtiene una división celular mediada por citocininas. Sin embargo, un exceso de auxinas puede suprimir esta división y el crecimiento celular (Bidwell, 1979).

2.9.1.2. Citocininas.

Este nombre reciben las sustancias que pueden estimular principalmente la división celular y la citocinesis. Casi todas las citocininas conocidas, tanto naturales como sintéticas, son derivados de la adenina. Estos promotores pueden afectar a las células parenquimatosas revirtiéndolas a un estado organizado (meristemático), por otra parte, se incrementa notoriamente la masa celular, formando callos más rápidamente (Hurtado, 1997) si se conjuga el uso de auxinas con citocininas, pero no solo eso, la combinación controlada de ambas puede determinar la ruta que seguirá la diferenciación celular.

Como sucede con los demás reguladores de crecimiento, las citocininas tienen un intervalo amplio de efectos regulatorios. Estas promueven la división celular y el efecto tiene lugar con concentraciones tan bajas como $5 \times 10^{-11} \text{M}$; generalmente inhiben el crecimiento de las raíces, pudiendo estimular en muy bajas concentraciones ($5 \times 10^{-8} \text{M}$) la iniciación del crecimiento de raíces laterales, además inhiben la elongación del tallo, pero estimulan el alargamiento de las hojas. Actúan en el retraso de la senescencia, en la dominancia apical y tienen un papel fundamental en la organogénesis, ya que pueden ser inducidas yemas en tejidos *in vitro* de callos, hojas, raíces, cotiledones o piezas de tallo (Hurtado 1997).

Para que tenga lugar la división celular debe suceder una cadena de hechos (síntesis de ADN, mitosis y citocinesis), en los cuales la presencia de las citocininas es necesaria para la mitosis. Pero si la citocinina se encuentra presente en elevadas concentraciones puede volverse limitante, por lo menos en uno de los tres pasos necesarios para la división.

2.10. Regeneración de tejidos de alfalfa.

La transformación genética de plantas ha sido uno de los principales avances en biotecnología y sus contribuciones a la producción de plantas mejoradas, cultivos mejorados

y, en consecuencia, a la disponibilidad de alimentos en todo el mundo ha sido ampliamente reconocida. Sin embargo, en ciertas plantas la regeneración ha sido difícil de lograr, como es el caso de alfalfa. Sin embargo las características forrajeras de esta planta la hacen un objetivo de interés para modificación genética y regeneración.

La transformación de alfalfa se ha visto obstaculizada por dos grandes limitaciones: las restricciones impuestas por el método de transformación y la pobre regeneración de células y tejidos de cultivos de muchas variedades de alfalfa. La primera limitación se produce porque la alfalfa se transforma en la actualidad principalmente mediante el uso de *Agrobacterium tumefaciens*. *Agrobacterium* exhibe especificidad por el hospedador y solo ciertas cepas de *Agrobacterium* infectarán algunos genotipos de alfalfa. Como resultado, la capacidad de transformar la alfalfa es bastante limitada. La segunda inhibición principal de la transformación de alfalfa es su pobre frecuencia de regeneración. Solo unas pocas variedades exhiben regeneración, incluso modesta, y las variedades de élite que brindan un desarrollo superior en el campo son notoriamente pobres regeneradores. La combinación de estos dos problemas ha creado un obstáculo considerable para lograr la transformación de la planta (Busing *et al.*, 1994).

Se ha determinado que hay nueve fuentes principales de germoplasma de alfalfa: *M. falcata*, Ladak, *M. varia*, Turkestán, flamenco, chilena, peruana, India y África. El cultivo de tejidos del explante de origen, como los cotiledones maduros e hipocotilos, demuestra que la frecuencia de regeneración de diversos genotipos en la mayoría de los cultivos es de solo un 10 por ciento (Seitz y Bingham, 1988). Los esfuerzos de regeneración han incluido intentos de propagación asexual manteniendo genotipos individuales que poseen el rasgo de regeneración. Pero este tipo de regeneración no es práctico si intervienen muchos genotipos. Además, los investigadores creen que la embriogénesis somática en la alfalfa es heredable y es controlada por relativamente pocos genes. Esfuerzos por mejorar la regeneración, por tanto, se han dirigido hacia el aislamiento del control genético de la embriogénesis y a los programas de cría de la planta (Hernández y Christie, 1989). Sin embargo, por otra parte Villegas en 1991 logró regenerar efectivamente embriones a partir de peciolos de alfalfa (*Medicago sativa* L.) empleando 2,4-D y cinetina como reguladores de crecimiento, pero estos peciolos no habían sido previamente sometidos a un protocolo de modificación genética.

3. JUSTIFICACIÓN.

Al expresar genes exógenos en cloroplastos es posible evitar altos costos de producción inherentes a las operaciones de fermentación, purificación y almacenamiento de ciertas proteínas terapéuticas. La planta de tabaco (*Nicotiana tabacum*) es el modelo de expresión más utilizado y en ella se han logrado niveles de expresión superiores al 70% de la proteína soluble total, sin embargo esta planta contiene un elevado porcentaje de alcaloides y toxinas que han impedido en cierta forma que la mayoría de las proteínas terapéuticas expresadas en ella no lleguen al mercado.

En virtud de lo anterior resulta de particular importancia el desarrollo de metodologías que conlleven a poder realizar la modificación genética de cloroplastos de otras especies, de forma rutinaria. En el presente trabajo se propone la construcción de vectores para realizar la modificación genética de cloroplastos de alfalfa que pudieran servir para la producción de proteínas heterólogas en esta planta, así como estudios para la regeneración de la planta por cultivo *in vitro*.

4. OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

Construir un vector específico para modificación genética de cloroplastos de alfalfa y realizar estudios para el establecimiento de un protocolo de regeneración *in vitro* de la planta.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Diseñar y construir un vector para transformar genéticamente cloroplastos de alfalfa que dirijan la integración de los transgenes en la región *psbA – trnH*.
2. Insertar el cassette de expresión del gen *aadA* en el polilinker del vector de transformación para ser utilizado como marcador de selección.
3. Evaluar la respuesta de diferentes tejidos de alfalfa *in vitro* para la regeneración de la planta completa.

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1. MATERIALES.

5.1.1. Reactivos.

Los reactivos utilizados fueron: agarosa grado Biología Molecular, triptona para medio de cultivo, extracto de levadura, cloruro de sodio (NaCl), mezcla basal de sales Murashige and Skoog, ácido 2,4-diclorofeniloxiacético (2,4-D), 6-bencilaminopurina (BAP), sacarosa, nitrato de potasio (KNO₃), Sulfato de Magnesio (MgSO₄), fosfato ácido de potasio (KH₂PO₄), Nitrato de calcio (CaNO₃) y Agar-Agar grado bacteriológico, mismos que fueron provistos por: Becton-Dickinson (EUA), J. T. Baker (EUA), DIBICO (México), Hycel de México (México), SIGMA (EUA), Alta Pureza Maquiladora (México), Vivantis (Malasia), High Purity Standars (EUA). Enzimas de restricción, marcadores de peso molecular, DNA polimerasas, T4 DNA ligasa, T4 DNA polimerasa y S1 nucleasa fueron adquiridas de Fermentas, Novagen, Promega y Roche.

5.1.2. Medios de cultivo para bacterias y tejidos vegetales.

Medio LB (Luria-Bertani). Triptona (1%w/v), extracto de levadura (0.5%w/v), NaCl (1%w/v). El pH se ajustó a 7.0 con NaOH 5 M. El medio se esterilizó en autoclave por 20 min a 121°C y 15 psi.

Medio 2xYT. Triptona (1.6%w/v), extracto de levadura (1%w/v), NaCl (0.5% w/v). El pH se ajustó a 7.0 con NaOH 5 M. El medio se esterilizó en autoclave por 20 min a 121°C y 15 psi.

Medio MS (Murashige and Skoog). Mezcla basal de sales (0.43%w/v), sacarosa (3%w/v), agar (0.7%w/v). El pH se ajustó a 5.9 con HCl 0.5 N. El medio se esterilizó en autoclave por 20 min a 121°C y 15 psi.

Medio Knop. Sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 200 mg/L), nitrato de potasio (KNO_3 200 mg/L), fosfato ácido de potasio (KH_2PO_4 200 mg/L), cloruro de calcio (CaCl_2 374 mg/L)

Medio MSB5. Mezcla basal de sales (0.43%w/v), sacarosa (3%w/v), agar (0.7%w/v), solución de vitaminas Gamborg B5 (0.1%v/v). El pH se ajustó a 5.9 con HCl 0.5 N. El medio se esterilizó en autoclave por 20 min a 121°C y 15 psi.

Medios MS con auxinas y citocininas. Medio MSB5 con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y/o benzilaminopurina (BAP) a las concentraciones que aparecen en la tabla 3.

Tabla 3. Medios MS complementados con sacarosa (10g/L), vitamina B5, Agar (7g/L), 2,4-D y BAP a diferentes concentraciones.

Medios de cultivo MS	Concentraciones de auxinas (2,4-D) y citocininas (BAP)	
	2,4-D (mg/L)	BAP (mg/L)
A	0.0	0.0
B	0.5	0.0
C	1.0	0.0
D	1.5	0.0
E	0.0	0.1
F	0.0	0.2
G	0.0	0.4
H	0.5	0.1
I	0.5	0.2
J	0.5	0.4
K	1.0	0.1
L	1.0	0.2
M	1.0	0.4
N	1.5	0.1
O	1.5	0.2
P	1.5	0.4

5.1.3. Cepas bacterianas.

Las cepas bacterianas se crecieron en medio LB o 2xYT en placas de Petri con 20 mL de medio sólido. Para su mantenimiento por periodos prolongados se mantuvieron en congelación a -70°C.

- *Escherichia coli* DH5 α . Genotipo: F- endAI hsdRJ7 (r-, mit) supE44 thi-J ArecAlgyrA96 relAI deoR A(lacZYA-argF)U169 480dlacZAM15 (Grant *et al.*, 1990).

5.1.4. Plásmidos.

pBlueScript KS II

Este es un vector comercial de 3.0 kb. Está integrado por un fragmento del gen *lacZ*, el cual tiene encriptado un sitio de clonación múltiple (MCS) y su expresión es controlada por el promotor *P_{lac}*. El fragmento del gen *lacZ* codifica para la β -galactosidasa. El plásmido contiene promotores T3 y T7 que proceden del fago T3 y T7 respectivamente y que interrumpen el gen *lacZ*, situándose en los flancos del MCS. Contiene también el origen de replicación de los plásmidos de la serie pUC. Contiene además un gen de resistencia a Ampicilina que permite seleccionar las bacterias que han sido modificadas.

pLCV2-GFP/aadA

El plásmido pLCV2-GFP/aadA se construyó en parte por nuestro grupo de investigación para la modificación genética de cloroplastos de lechuga. Este plásmido contiene 2253 pb del DNA plastidial que corresponde a los genes *trnI-trnA* de lechuga insertadas dentro del esqueleto del plásmido comercial pCR2.1 (Invitrogen). Este plásmido contiene además de un casete para la expresión de GFP, un casete de expresión para *aadA* en el cual la expresión es controlada con el promotor *P_{rnn}* y el terminador *T_{psbA}*. Este último casete puede ser escindido utilizando la enzima *Ascl*.

5.1.5. Iniciadores.

Seis iniciadores fueron empleados durante el desarrollo de este trabajo experimental y fueron adquiridos de MWG|Operon (EUA) (tabla 4). Los iniciadores FMG1, FMG2 y FMG3 fueron diseñados para el desarrollo de este trabajo.

Tabla 4. *Iniciadores para amplificación y secuenciación de plásmidos.*

Iniciadores	Secuencia
T7 F	5' – TAATACGACTCACTATAGGG - 3'
FMG1	5' - TAGGCGCGCCGGAACAATATTATTTCTGGTGCC - 3'
FMG2	5' - CTAGCGCGCCATTTATTAGCTTTATTAACAAC - 3'
FMG3	5' – GTATCAGCACTATGGCTTTC – 3'
M13 F	5' – GTTTTCCCAGTCACGAC – 3'
M13 R	5' – CAGGAAACAGCTATGAC – 3'

5.2. MÉTODOS.

5.2.1. Extracción de ADN de células vegetales.

La extracción de ADN de células vegetales se realizó con el Kit ChargeSwitch® gDNA Plant de Invitrogen de acuerdo con las indicaciones de uso del fabricante. Antes de iniciar la extracción de ADN se enfrió el buffer N5 en hielo, posteriormente se colocaron 100 mg de hojas de alfalfa en un mortero con pistilo y se adicionaron 100 mL de nitrógeno líquido y se dejó evaporar. Posteriormente se pulverizó el tejido hasta formar un talco seco que se colocó en un tubo de 1.5 mL. A temperatura ambiente se adicionó 1 mL del buffer de lisis Charge Switch (L18) y 2 µL de RNAsa A y se homogeneizó la mezcla. Se adicionaron 100 µL de SDS al 10% por cada mililitro del lisado de la planta y se incubó la muestra por 5 min, posteriormente se adicionaron 400 µl del buffer de precipitación (N5) y se mezcló por inversión para después centrifugar a máxima velocidad por 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfirió a un tubo de 1.5 mL estéril. Para continuar con la extracción se resuspendieron las perlas magnéticas del Kit (ChargeSwitch magnetic beads) en su buffer de

almacenamiento, después se agregaron 100 μL del detergente (D1) y 40 μL de perlas magnéticas a aproximadamente 1.2 mL de lisado que se mezclaron por pipeteo sin formar burbujas. La mezcla se incubó a temperatura ambiente por 1 min. El tubo con la mezcla se colocó en el MagnaRack™ del kit hasta que se formó un pellet. Este pellet contiene a las perlas magnéticas con el ADN adherido sobre su superficie. El sobrenadante se descartó con una pipeta y el tubo con el pellet se quitó del MagnaRack™, se adicionó 1 mL del buffer de lavado (W12) y se mezcló la nueva solución sin formar burbujas. La solución se colocó nuevamente en el MagnaRack™ y por duplicado se lavó con el buffer de lavado (W12). El tubo con el pellet se quitó del MagnaRack™ y se agregaron 150 μL del buffer de elución (E6), posteriormente se incubó por 1 min a temperatura ambiente. Se colocó nuevamente el tubo en el MagnaRack™ y se extrajo el sobrenadante que contenía el ADN.

5.2.2. Amplificación de la secuencia homóloga por la técnica de PCR.

Se emplearon las enzimas Taq DNA polimerasa (Fermentas) y KOD Hot Start DNA polimerasa (NOVAGEN) para amplificar la región *psbA – trnH* del cloroplasto de la planta de alfalfa. En ambos casos se siguieron las recomendaciones sugeridas por el fabricante. En el caso de Taq DNA polimerasa se colocaron en tubo para PCR 10 μL del buffer para PCR 10X, 2 μL de dNTPs 2 mM, 3 μL de MgCl_2 10 mM, 5 μL de cada primer 10 μM , de 1 a 20 μL de DNA molde, de 0.2 a 0.5 μL de Taq DNA polimerasa (5 U/ μL) y agua desionizada estéril para 100 μL . La reacción se llevó a cabo en un termociclador MULTIGENE™ MINI TC-020-24 (Labnet) por 30 a 35 ciclos de PCR. La temperatura de desnaturalización fue de 94°C por 45 s, la de alineación de iniciadores de 55°C por 30 s y la de amplificación de las cadenas de 72°C por 1min 30s. En el caso de KOD Hot Start DNA polimerasa, se colocaron en un tubo para PCR 5 μL del buffer para la KOD 10X, 3 μL de MgSO_4 25 mM, 5 μL de dNTPs 2 mM, 1.5 μL de cada iniciador 10 mM, 1-5 μL de DNA molde, 1 μL de KOD Hot Start DNA polimerasa (1 U/ μL) y agua desionizada estéril para 50 μL . La reacción se llevó a cabo en un termociclador MULTIGENE™ MINI TC-020-24 (Labnet) por 30 a 35 ciclos de PCR. La temperatura de desnaturalización fue de 94°C por 45 s, la de alineación de iniciadores de 55°C por 30 g y la de amplificación de las cadenas de 72°C por 1 min 10 s.

5.2.3. Preparación de células químicamente competentes.

Se sembró una colonia de *E. coli* en tubo de ensayo con 5 mL de medio de cultivo líquido 2xYT y se mantuvo en agitación constante a 200 rpm durante 16 h y a 37°C. Posteriormente un matraz con 50 mL de medio de cultivo líquido 2xYT fue inoculado con 1 mL del cultivo mencionado y se mantuvo en agitación constante durante 4-5 h a 230 rpm y 37°C (OD 600 nm= 0.4-0.6), al término de este tiempo el matraz se incubó en hielo durante 20 minutos y las células se cosecharon por centrifugación a 7,000 rpm por 6-10 min. El sobrenadante se desechó y las células se resuspendieron en cloruro de calcio 0.1 M estéril para ser cosechadas nuevamente mediante una centrifugación a 7,000 rpm por 6 min. El sobrenadante se descartó y las células se volvieron a resuspender por segunda ocasión, esta vez en 15 mL de CaCl₂ 0.1 M para centrifugarse por última vez a 7,000rpm por 6 min. El paquete celular obtenido se resuspendió una última ocasión en 4.5 mL de CaCl₂ y se hicieron alícuotas de 100 µL con glicerol al 15%. Las células se sometieron a modificación con pBsKSII para verificar su competencia química (Sambrook *et al.*, 2001).

5.2.4. Transformación de *E. coli* DH5α por choque térmico.

Alícuotas de 100 µL de células mantenidas en congelación se mezclaron con 1 a 3 µL de DNA plasmídico y se incubaron en hielo por 5 min. Transcurrido este tiempo se inocularon por extensión con varilla en cajas Petri preincubadas a 37°C con los antibióticos necesarios. Las cajas se incubaron a 37°C hasta que el crecimiento de colonias fue el idóneo para su uso (Pope, 1996).

5.2.5. Extracción de ADN bacteriano a pequeña escala.

La extracción de ADN de células bacterianas se hizo de 2 maneras distintas. La primera se realizó con el QIAprep® Spin Miniprep Kit de QIAGEN, bajo las indicaciones del fabricante.

Para la extracción con el QIAprep® Spin Miniprep Kit de QIAGEN se inocularon células de *E. coli* en un tubo con 5mL de medio LB y el antibiótico necesario para después incubarlo por 14-16 h a 37°C y agitación constante de 200 rpm. Pasado este tiempo se

colectaron las células por centrifugación a 18000g por 30 s. Se descartó el sobrenadante y el pellet formado se resuspendió en 250 μ L de buffer P1, después se agregaron 250 μ L de buffer P2, se mezcló la solución y se incubó por 5 min a temperatura ambiente, finalmente también se adicionaron 350 μ L de buffer N3 y se volvió a mezclar por inversión hasta tener una solución homogénea. La solución se centrifugó por 10 min a 18000g y se colectó el sobrenadante para ser depositado en una columna QIAprep. Se incubó a temperatura ambiente por 1 min y se centrifugó nuevamente por 30 s a 18000g. La columna QIAprep se lavó con 0.5 mL de buffer PB y 0.75 mL de buffer PE, centrifugando por 30 segundos a 18000g entre cada lavado y descartando los filtrados. Se centrifugó por 1 min adicional después del último lavado para eliminar cualquier residuo de etanol. Para eluir el DNA se colocó la columna QIAprep en un tubo de 1.5 mL estéril y se adicionaron de 20 a 50 μ L de buffer de elución o agua MilliQ estéril en la columna, dejando incubar por 1 min antes de centrifugar por 1 min a 18000g. El filtrado contiene el DNA plasmídico bacteriano.

La segunda manera se realizó aplicando el protocolo de extracción descrito por Ausubel y col. en 2003. Se inocularon células *E. coli* en un tubo con 5 mL de medio 2xYT y los antibióticos necesarios, mismo que se mantuvo en incubación a 37°C y agitación constante por 14 a 16 h, después del tiempo de incubación las células se cosecharon por centrifugación a 18,000g a partir de 2 a 4 mL del caldo de cultivo en tubos de 1.5 mL, el sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron en 100 μ L de Solución de Lisis Alcalina I fría, posteriormente se adicionaron 200 μ L de Solución de Lisis Alcalina II, se mezclan por inversión del tubo 5 veces y se incubó por 5 min a temperatura ambiente, finalmente se agregaron 150 μ L de la Solución de Lisis Alcalina III y nuevamente se mezcló invirtiendo el tubo varias veces hasta homogenizar. El lisado celular se centrifugó a 18,000g por 5 minutos a 4°C en una microcentrífuga y el sobrenadante se recolectó en un tubo de 1.5 mL nuevo. Los ácidos nucleicos se precipitaron adicionando al sobrenadante 2 volúmenes de etanol a temperatura ambiente y mezclando por inversión. La precipitación de los ácidos nucleicos se realizó centrifugando a 18,000g por 10 min. Se removió el sobrenadante por decantación y se adicionó 1 mL de etanol al 70% en agua. El tubo se invirtió varias veces para después centrifugar a 18,000g por 2 min. El sobrenadante fue descartado y se dejó secar el tubo por 10 min en posición invertida. Finalmente los ácidos nucleicos se resuspendieron en 50 μ L de EB o TE.

5.2.6. Extracción de ADN bacteriano a mediana escala.

Para la extracción con el HiSpeed® Plasmid Midi Kit se inocularon células *E. coli* en un matraz con 50 mL de medio 2xYT con los antibióticos necesarios. Las células se colectaron por centrifugación a 6000g por 15 min, se descartó el medio gastado y se resuspendió el pellet en 6 ml de buffer P1, posteriormente se agregaron 6 mL de buffer P2 mezclando por inversión y finalmente se agregaron 6 mL de buffer P3 previamente enfriado mezclando por inversión. El lisado se colocó en una jeringa QIAfilter y se incubó por 10 min a temperatura ambiente al tiempo que se equilibró una columna HiSpeed Midi con 4 mL de buffer QBT. El pistón del embolo fue colocado y el lisado se filtró en la columna HiSpeed Midi, dejando que el líquido filtrara por gravedad. La columna se lavó con 20 mL de buffer QC y el DNA se eluyó con 5 mL de buffer QF hacia un tubo de 15 mL estéril. El ADN se precipitó con 3.5 mL de isopropanol mezclando e incubando a temperatura ambiente por 5 min. La solución se filtró con un QIAprecipitator de QIAGEN y se obtuvo el ADN plasmídico con 0.5 mL de buffer de elución o agua MilliQ estéril.

5.2.7. Secuencia utilizada para la el diseño *in silico* del vector de transformación.

Se empleó el genoma del cloroplasto de *Medicago truncatula* (NC 003119) para seleccionar una secuencia homóloga (*psbA – trnH*) que sirviera como sitio de inserción de genes exógenos en cuatro variedades de alfalfa (*M. sativa L.*, *M. sativa* variedad *Cuf*, *M. sativa* variedad *Moapa* y *M. truncatula*). En la secuencia homóloga se insertó un sitio de clonación múltiple que sirvió para incorporar el gen de resistencia a espectinomicina *aadA*.

5.2.8. Construcción del vector transformante.

Se empleó el genoma del cloroplasto de *Medicago truncatula* (NC 003119) para seleccionar una secuencia homóloga que sirviera como sitio de inserción de genes exógenos en cuatro variedades de alfalfa (*M. sativa L.*, *M. sativa* variedad *Cuf*, *M. sativa* variedad *Moapa* y *M. truncatula*). En la secuencia homóloga se insertó un sitio de clonación múltiple que sirvió para incorporar el gen de resistencia a espectinomicina *aadA*.

5.2.9. Digestión de ADN con enzimas de restricción.

Las enzimas de restricción empleadas fueron con *Eco32I* (*EcoRV*), *SmaI*, *BssHII* (*PauI*), *NdeI*, *BcuI* (*SpeI*), *BamHI*, *SacI*, *KpnI*, *XhoI*, *PacI* y *SgsI* (*AscI*), mismas que se usaron bajo las condiciones de reacción sugeridas por los fabricantes (Fermentas y Biolabs). Los volúmenes de reacción variaron de los 20 a los 50 μL pero siempre manteniendo la relación de concentraciones sugerida por los fabricantes. La cantidad de enzima empleada varió dependiendo del volumen de reacción, pero en su mayoría fue de 0.5 a 3 μl de enzima (1-5 U/ μL).

5.2.10. Ligación de fragmentos de ADN.

La ligación de insertos en el interior de los vectores empleados se realizó con la enzima T4 DNA Ligasa de Fermentas. Los volúmenes de trabajo fueron de 20 μL y se siguieron las condiciones de reacción sugeridas por el fabricante. El buffer de reacción 10X, apropiado para esta enzima, contenía (66 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM MgCl_2 , 5 mM DTT, 1 mM ATP). La relación molar entre el inserto y el vector varió de 1:1 a 4:1 M. Los tubos de reacción fueron incubados de 14 a 16 h. a 4°C.

5.2.11. Análisis cualitativo de bandas de ADN a partir de geles de agarosa.

Los fragmentos y plámidos de ADN obtenidos al realizar reacciones de amplificación por PCR, reacciones de restricción y reacciones de ligación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa y se documentaron en un fotodocumentador Gel Logic 440 marca Kodak. Para el caso de fragmentos de ADN menores a 500pb la concentración de agarosa fue de 1 a 1.5% (w/v), mientras que para cadenas de ADN mayores se empleó una concentración de 0.7% (w/v). Los geles se corrieron en una solución TBE a 90 V de forma horizontal. El tamaño de los fragmentos se estimó por comparación con un estándar de peso molecular de 100 a 10000pb o de 100 a 20000pb.

5.2.12. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.

Los fragmentos de ADN que requirieron ser y purificados de fragmentos de distinto tamaño se sometieron a electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión marca Nalgene a concentraciones de 0.7 a 1.0% (w/v) y se purificaron con el kit illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification de GE Healthcare, siguiendo las indicaciones sugeridas por el fabricante. Básicamente se cortó con un bisturí estéril la banda del gel que correspondió al fragmento de ADN de interés, misma que se pesó y se disolvió con el buffer de captura Type 3 a 60°C por 15 a 20 min. La solución se adicionó a una columna GFX Microspin y se incubó por 1 min a temperatura ambiente para después centrifugarse a 16000g por 30 s. Este paso se repitió hasta agotar la solución. El filtrado se descartó y la columna fue lavada con 500 µL del buffer Type 1. La columna se centrifugó nuevamente a 16000g por 30 s. Finalmente el ADN se eluyó en 20 a 40 µL del buffer de elución o agua MilliQ estéril centrifugando a 16000g por 1min.

5.2.13. Secuenciación de plásmidos.

Las secuencias amplificadas a partir de las cuatro variedades de trabajo al igual que los plásmidos de la serie FM, pFM244b y pFM244b-*aadA* se enviaron a secuenciar al Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) y al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) El análisis de las secuencias se realizó utilizando el software Codon Code Aligner V 3.7.1.

5.3. PROTOCOLO DE REGENERACIÓN DE TEJIDOS DE ALFALFA.

5.3.1. Material Biológico.

Se utilizaron las variedades de alfalfa *Medicago sativa* L., *M. sativa* v. *Cuf-101*, *M. sativa* v. *Moapa* y *Medicago truncatula*. Las semillas fueron obtenidas de semilleros ubicados en la ciudad de México.

5.3.2. Siembra, incubación y germinación de semillas.

Las semillas de alfalfa se sembraron tanto en tierra comercial libre de patógenos como en los medios MS1/4 y Knop (apéndice 1).

En el caso de las semillas sembradas en tierra libre de patógenos, estas se colocaron separadamente en un almácigo con 16 espacios (10x10x10 cm) cuatro semillas por espacio a una profundidad de 1 cm y se cubrieron con tierra sin ejercer presión, posteriormente se adicionó agua diariamente durante los primeros 5 días con un atomizador en una proporción de 30 mL por espacio y después esporádicamente. Las plantas obtenidas se dejaron crecer por 30 días antes de emplear sus tejidos en un protocolo de regeneración, como se describe más abajo.

La siembra en medios MS1/4 y Knop de semillas desinfectadas (sometidas al protocolo descrito en 5.3.3) se realizó en campana de flujo laminar para las cuatro variedades de trabajo en cajas Petri con 20 mL de los medios mencionados. Se sembraron de 25 a 30 semillas por caja y se incubaron a 27°C durante cuatro días, pasado este tiempo las plantulas se transfirieron a cajas de policarbonato de 10 cm de profundidad (Magenta Corp, Chicago) con 40 mL de medio MS completo adicionado con vitamina B5. Las plantas obtenidas se dejaron crecer de 15 a 20 días antes de emplear sus tejidos en los protocolos de regeneración.

5.3.3. Desinfección de semillas.

Se colocaron semillas de alfalfa en agua con extrán al 2% (o detergente) durante 30-40 minutos y se mantuvieron en agitación (manual o con un agitador magnético) por 40 min. Se enjuagaron tres veces con agua estéril para eliminar el detergente y a partir de este paso se trabajó en la campana de flujo laminar. Se utilizó una espátula estéril para retener las semillas, éstas se sumergieron en una solución de etanol al 70% por 30 segundos y nuevamente se enjuagaron tres veces con agua estéril para eliminar el etanol. Posteriormente se transfirieron a un matraz estéril y se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 1% de cloro libre durante 10 min. Las semillas se enjuagaron cinco veces con agua estéril para eliminar el hipoclorito de sodio.

5.3.4. Protocolo para desinfección de tejidos vegetales.

Se prepararon tres grupos de las siguientes soluciones en campana de flujo laminar empleando agua destilada estéril:

- 100 ml etanol al 70%
- 100 ml hipoclorito de sodio al 1% de cloro libre
- 1 L de agua destilada estéril

Se lavaron los explantes obtenidos de plantas germinadas en tierra por agitación en agua destilada estéril con extrán al 2% durante 20 minutos. Luego de lavar los explantes se cortaron pequeños segmentos de los mismos, de aproximadamente 5 mm. En el caso de hojas estos segmentos deben provenir del borde. Una vez cortados todos los segmentos, estos se lavaron con la solución de etanol al 70% por 30 segundos con agitación constante, se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se sometieron a una solución con hipoclorito de sodio al 1% de cloro libre, lavándolos nuevamente con agua destilada estéril por cuatro veces con un movimiento constante durante 5 minutos (cada lavado).

5.3.5. Siembra de explantes en medios de cultivo.

Para las cuatro variedades de trabajo se sembraron peciolas, tallos, hojas y meristemas en cajas Petri con 20 mL de medios de cultivo sólido MS adicionados con vitamina B5 y sacarosa (apéndice 1) a las concentraciones de 2,4-D y BAP que aparecen en la tabla 3. Los explantes se tomaron con pinzas estériles y se colocaron dentro de las cajas a una distancia de 2 cm entre sí, teniendo cuidado de no cubrirlos con medio sólido. Entre tres y cuatro explantes se sembraron por caja y una vez terminada la colocación de los mismos es dichas cajas, se sellaron con cintas de plástico flexible (Parafilm) para evitar su contaminación y la evaporación del agua del medio de cultivo.

Los tejidos sometidos a diferentes condiciones se monitorearon hasta por 60 días para evaluar el efecto de los distintos medios. A los 30 días de incubación, callos de todos los tipos de explantes se resembraron en medio con solo 2,4-D, 2,4-D+BAP, y 2,4-D+cinetina para determinar el crecimiento de embriones a partir de callos. Los resultados del crecimiento de los tejidos sembrados se analizaron en función del tipo de tejido y de la

formulación del medio utilizado. La experimentación se realizó por duplicado para todas las variedades excepto para *M. truncatula* y en algunos casos se realizaron trasplantes para mantener activos los callos.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

6.1. Construcción del vector pFM244b.

Actualmente no existen trabajos previos sobre modificación genética en cloroplastos de alfalfa, por lo que el diseño y construcción del vector transformante específico para esta planta (pFM244b) partió de cero, planteando como estrategia general para su creación la inserción de la región homóloga *psbA – trnH* dentro del sitio de clonación múltiple (MCS) del plásmido pBluescriptKSII, y a su vez dentro de esta región la incorporación de un nuevo sitio de clonación múltiple en el que se insertó un gen de interés (figura 1). Este planteamiento permite insertar genes diversos en la región homóloga con más facilidad y se explica a lo largo de los resultados.

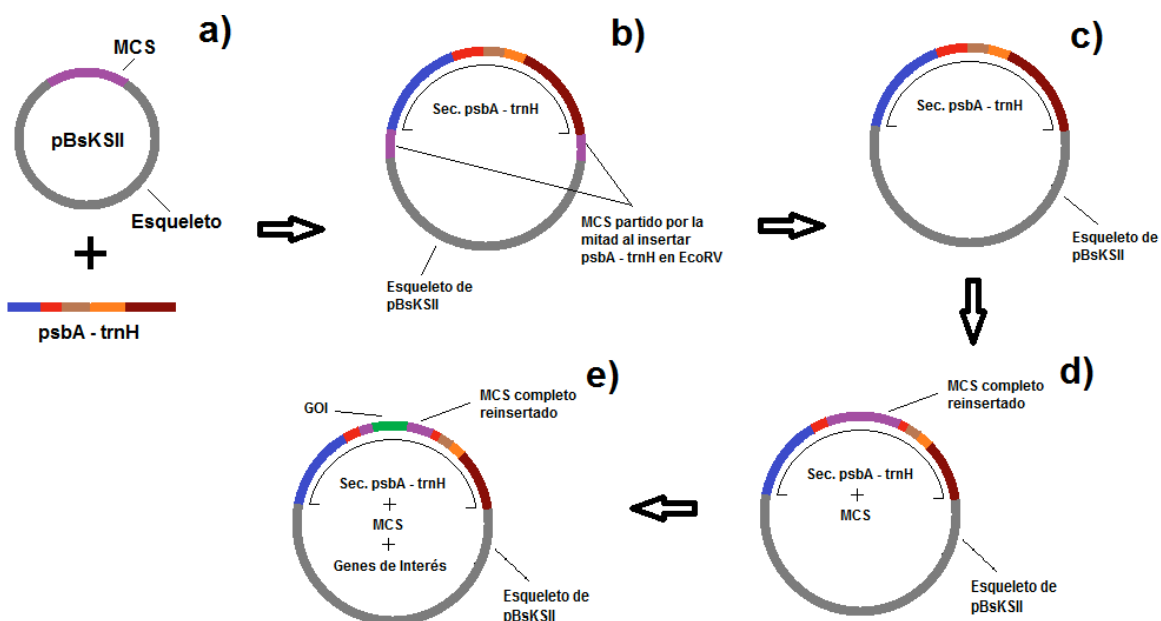


Figura 1. Estrategia de construcción para la generación del vector de transformación pFM244b.

a) Plásmido pBsKSII y secuencia homóloga *psbA – trnH* (su estructura se retoma más adelante), b) La secuencia homóloga *psbA – trnH* se inserta en el sitio EcoRV de pBsKSII dividiendo el MCS en dos, c) El MCS de pBsKSII se retira del vector, d) Un nuevo MCS completo de pBsKSII se reinserta en el vector, pero ahora en el interior de la secuencia homóloga, e) Los genes de interés (GOI por sus siglas en inglés) se insertan en el MCS del nuevo vector.

6.1.1. Selección de la Región Homóloga del genoma plastidial de Alfalfa.

Empleando la base de datos del National Center for Biotechnology Information se realizó una evaluación a distintas regiones del genoma plastidial de alfalfa (*M. truncatula* NC_003119) tomando como base secuencias homólogas utilizadas en trabajos previos de modificación genética de cloroplastos (tabla 5).

Tabla 5. Secuencias homólogas empleadas para insertar genes exógenos en plástidos de plantas superiores. Solo algunas de las referencias se citan y no todos los trabajos relacionados se muestran en la tabla.

Sitio de inserción (Secuencia Homóloga)	Proteína expresada	Referencia
<i>trnV - 16S</i>	B-glucoronidasa	Staub y Maliga 1993
<i>trnN - trnR</i>	B-glucoronidasa	Herz <i>et al.</i> , 2005
<i>rps12 – trnV</i>	eYFP	Buhot <i>et al.</i> , 2006
	B-glucoronidasa	Kuroda y Maliga 2002
	GFP (en papa)	Sidorov <i>et al.</i> , 1999
	Fusión AAD-GFP	Khan y Maliga 1999
<i>rbcl – accD</i>	Neomicin fosfotransferasa	McBride <i>et al.</i> , 1994
	HPPD	Dufourmantel <i>et al.</i> , 2007
	GFP (en lechuga)	Kanamoto <i>et al.</i> , 2006
	GFP	Newell <i>et al.</i> , 2003
<i>psbA - trnH</i>	EPSPS	Daniell <i>et al.</i> , 1998
	Neomicin fosfotransferasa	Carrer <i>et al.</i> , 1993
<i>psbA - trnH</i>	B-glucoronidasa	Herz <i>et al.</i> , 2005

Las secuencias se insertaron en plástidos de tabaco, a menos que se indique de otra forma.

En la mayoría de las plantas superiores el genoma plastidial contiene dos copias de un conjunto de genes que se localizan en dos regiones de 10 a 25 kb con secuencias repetitivas idénticas pero con orientación invertida que se conocen como IRA e IRB, en el caso de *M. truncatula* solo se tiene una copia, y en virtud de que el sitio de inserción carece de propiedades especiales y puede derivar de cualquier parte del genoma plastidial (Maliga, 2003) se decidió usar una región de 2276 pb ubicada entre el gen que codifica la proteína D1

del fotosistema II del cloroplasto (*psbA*), el gen que codifica el RNA de transferencia de la Histidina (*trnH*) y parte del gen que codifica la subunidad 5 de la NADH deshidrogenasa (*ndhF*) obedeciendo a la necesidad de tener una región de entre 1,000 a 2,000 pares de bases como secuencia homóloga (Cardi *et al.*, 2010); esta región se denominó *psbA - trnH*. De la secuencia de 2276 pares de bases, 844 corresponden al gen *psbA*, 400 a la región intergénica entre *psbA* y *trnH*, 75 corresponden al gen *trnH*, 195 pertenecen a la región intergénica entre *trnH* y *ndhF* y 762 corresponden a parte del gen *ndhF* subunidad 5 (figura 2).

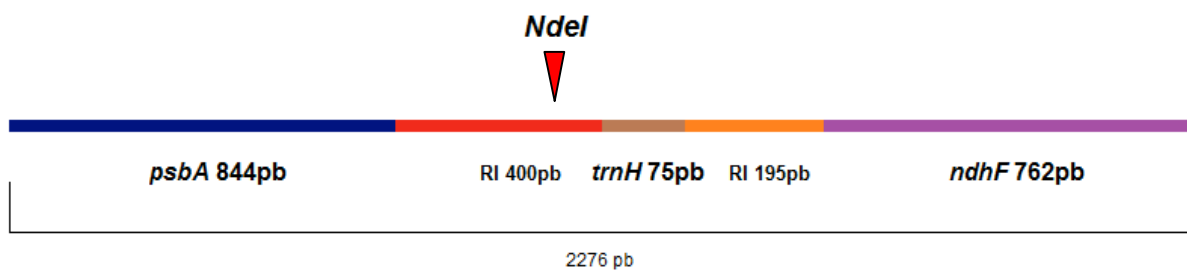


Figura 2. Secuencia *psbA - trnH* con sitio de restricción único dentro en la región intergénica de *psbA* y *trnH*.

La región *psbA - trnH* también fue analizada con el programa NEBcutter V2.0 de NEW ENGLAND BioLabs con el fin de identificar sitios de restricción únicos en los que fuera posible insertar el Sitio de Clonación Múltiple (MCS) del plásmido pBsKSII para construir un vector polifuncional transformante. Como resultado de la búsqueda se encontró el sitio de restricción *NdeI* dentro de la región intergénica entre *psbA* y *trnH* (figura 2). Otros sitios de restricción también fueron encontrados ubicados en las secuencias correspondientes a los genes *psbA*, *trnH* y *ndhF* pero únicamente los que se encuentran en las regiones intergénicas pueden ser empleados debido a que si se modifica la secuencia de algún gen es posible afectar el metabolismo del cloroplasto.

Después de ubicar el sitio *NdeI* se extrajo el ADN plastidial de las cuatro variedades de alfalfa (figura 3a) y se amplificó el fragmento *psbA - trnH* (figura 3b) de las mismas cuatro variedades de trabajo basados en la numeración del genoma de *Medicago truncatula* (NC_003119).

La técnica de amplificación de las secuencias se realizó con KOD DNA Polimerasa y con Taq DNA Polimerasa como se describe en la sección de materiales y métodos. Los resultados de amplificación con Taq DNA Polimerasa fueron negativos probablemente debido a la longitud del fragmento a amplificar. Con la KOD DNA polimerasa se logró amplificar un fragmento de 2276 pb correspondientes a la región *psbA - trnH* (figura 3b).

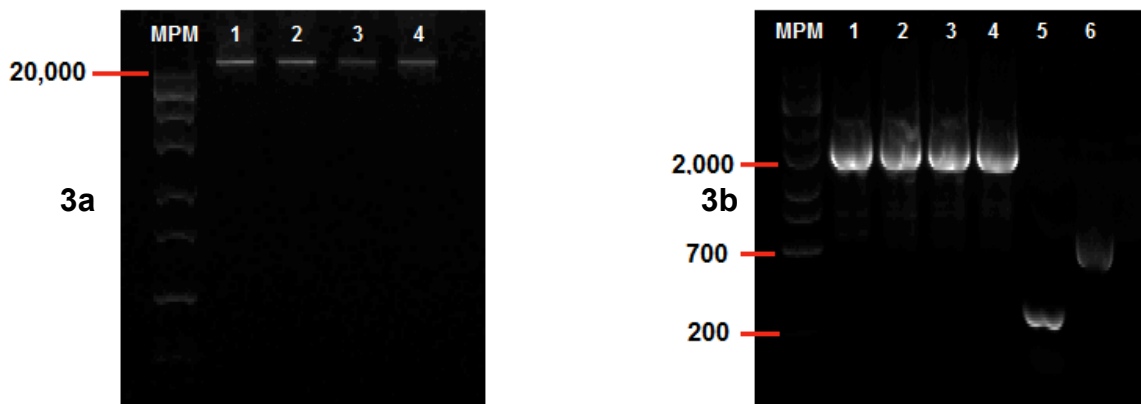


Figura 3. ADN plastidial extraído de cuatro variedades de trabajo de alfalfa y amplificación del fragmento *psbA – trnH* por PCR:

a) 1. *M. truncatula* / 2. *M. sativa* var. *Cuf* / 3. *M. sativa* var. *Moapa* / 4. *M. sativa* L. b) Amplificación de *psbA – trnH* realizada con *Kod DNA Polimerasa* a las cuatro variedades de trabajo 1. *M. truncatula* / 2. *M. sativa* var. *Cuf* / 3. *M. sativa* var. *Moapa* / 4. *M. sativa* L. / 5 y 6 son amplificaciones realizadas a *pBsKSII* como testigos positivos con los iniciadores 201-202 y 601-602.

Para la amplificación de las secuencias homólogas mediante la técnica de PCR se diseñaron los iniciadores FMG1 (5'-TAG**GCGCGC**CGGAAACAATATTATTTCTGGTGCC-3' sentido) y FMG2 (5'-CTAG**GCGCGC**CATTTATTAGCTTTATTAACAAC-3' antisentido) con sitios de restricción encriptados *Paul* – **GCGCGC** –, por lo que después de la amplificación la región *psbA – trnH* quedó flanqueada por los sitios de restricción *Paul*, estos mismos sitios de restricción también se encuentran flanqueando el sitio de clonación múltiple del plásmido *pBsKSII* y se empleó en diversas ocasiones durante la construcción del plásmido *pFM244b*.

6.1.2. Construcción de plásmidos de la serie FM.

Cuatro plásmidos se catalogan dentro de esta serie y su estructura comprende a la secuencia *psbA – trnH* flanqueada por sitios de restricción *Paul*, incorporada dentro del sitio de clonación múltiple de *pBsKSII*, el cual también se encuentra flanqueado por sitios de restricción *Paul* (figura 4). El plásmido FM2 contiene la secuencia *psbA – trnH* obtenida de *M. truncatula*, el plásmido FM3 contiene la secuencia obtenida de *M. sativa* y los plásmidos

FM5 y FM6 contienen la secuencia homóloga de *M. sativa* variedades moapa y cuf-101, respectivamente.

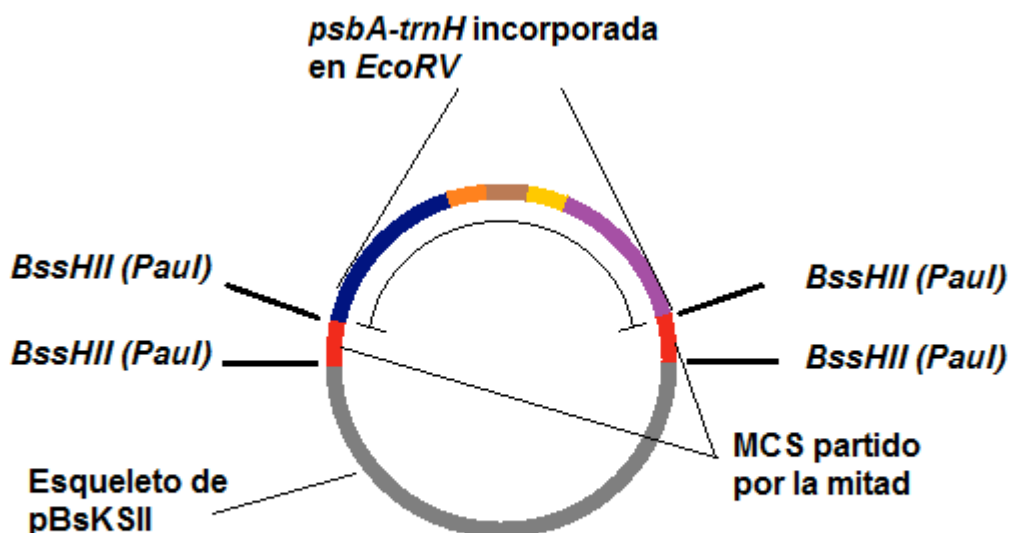


Figura 4. Estructura general de los plásmidos de la serie FM.

La región homóloga *psbA – trnH* se incorporó en el interior del sitio de clonación múltiple de *pBsKSII*. El plásmido *pBsKSII* se linealizó con *EcoRV* y se utilizó para insertar el fragmento *psbA – trnH*.

Para la construcción de estos vectores se amplificó la región *psbA – trnH* de cada una de las cuatro variedades de trabajo de alfalfa antes mencionadas y se insertó por separado en los sitios de restricción *EcoRV* y *SmaI* del MCS contenido en el plásmido *pBsKSII* [figuras 5 a) y b)]. Como se mencionó en la metodología, el plásmido *pBsKSII* contiene un gen de resistencia a ampicilina y un fragmento del gen *lacZ* que codifica la B-galactosidasa y en su extremo 5' terminal un sitio de clonación múltiple (MCS) rico en sitios de restricción únicos, por lo que la selección de clonas modificadas se realizó con X-Gal e IPTG en placas con ampicilina. Intentar la inserción de la secuencia homóloga en *EcoRV* y *SmaI* tuvo dos fines, en primer lugar brindar más opciones en caso de que en alguna de las variedades de alfalfa existieran sitio de restricción *EcoRV* o *SmaI* dentro de la secuencia homóloga imposibilitando su inserción en *pBsKSII*, y en segundo verificar, presuntivamente, que en ambos sitios (los cuales al ser cortados con enzimas de restricción producen extremos romos) es posible incorporar la secuencia homóloga. Sin embargo, como se verá más adelante, para fines de construcción del vector polifuncional resulta irrelevante en cuál de los dos sitios de restricción

se integre la secuencia *psbA – trnH*, por lo anterior se decidió seguir trabajando únicamente con los plásmidos en los que la secuencia se encontraba en *EcoRV* debido a que para todas las variedades de trabajo se logró insertar la secuencia homóloga en este sitio de restricción de pBsKSII (figuras 5b y 6).

b)

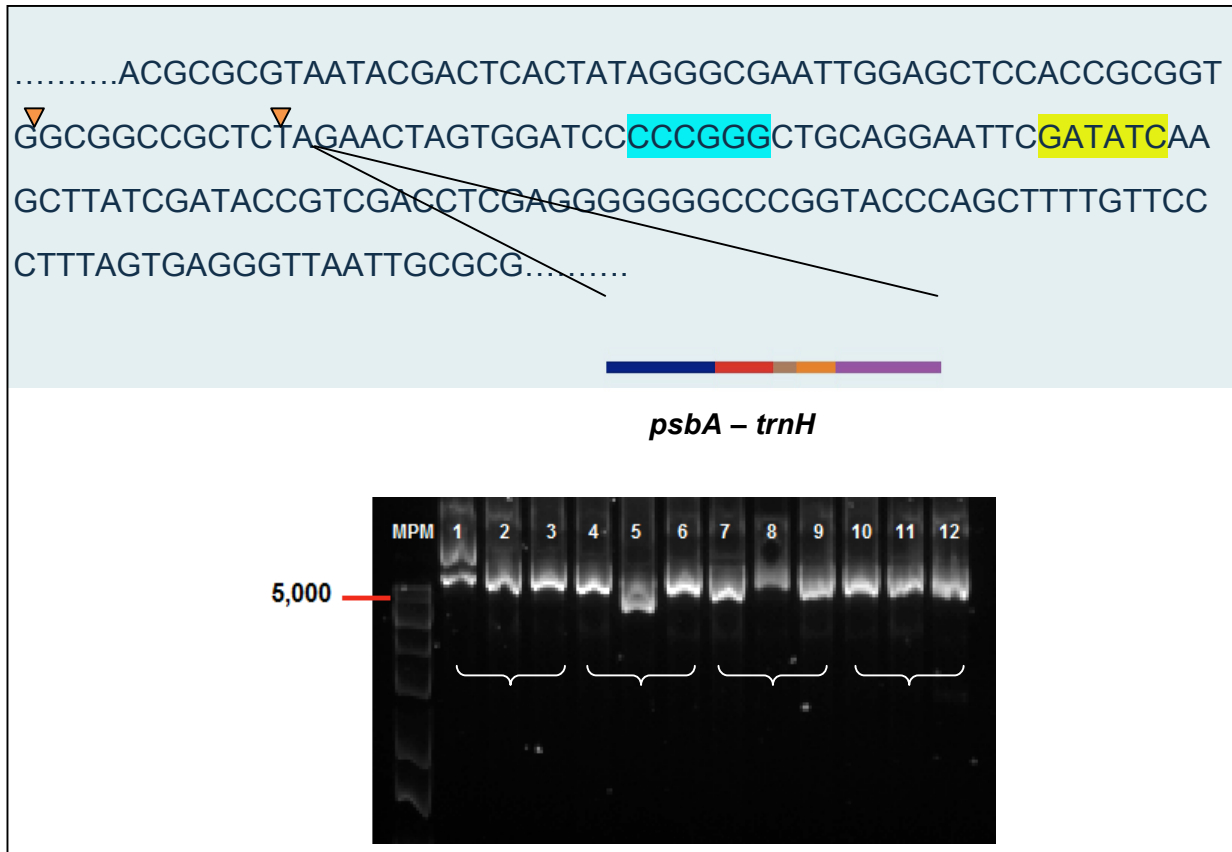


Figura 5. Incorporación de la secuencia homóloga *psbA – trnH* en el plásmido pBsKSII.

a) Sitio de clonación múltiple (MCS) de pBsKSII. La región *psbA – trnH* se insertó en los sitios de restricción *EcoRV* y *SmaI*. b) Plásmidos obtenidos después de ligar la secuencia *psbA – trnH* en el sitio *EcoRV* de pBsKSII. Se aprecian 3 extracciones de plásmido para cada variedad de trabajo de alfalfa.

A pesar de haber obtenido plásmidos con pesos similares a los esperados (figura 5b), de manera preliminar se comprobó la presencia de las secuencias homólogas mediante restricciones realizadas con la enzima *Paul* (figura 6). El peso de los plásmidos es cercana a 5.3 kb, de los cuales 2750 corresponden al esqueleto del plásmido pBsKSII, cerca de 200 pb corresponden al sitio de clonación múltiple y 2276 pertenecen a la región *psbA – trnH*, por lo

que las bandas que se aprecian en la figura 6 son consistentes con los tamaños esperados de entre 2.5 kb y 3 kb de longitud.

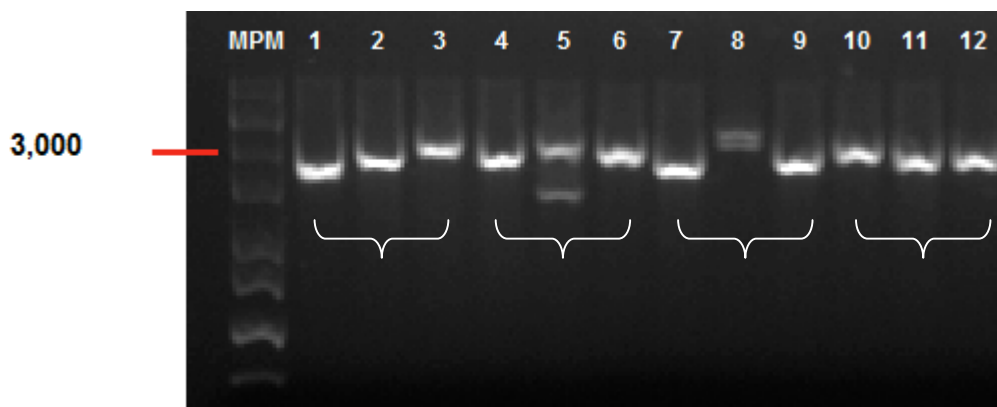


Figura 6. Restricciones realizadas con *Paul* a los plásmidos de la serie FM.

Los plásmidos correspondientes a las restricciones de los carriles 1, 2, 4, 5, 7 y 9 se enviaron a secuenciar para su posterior análisis.

Seis clonas de 12 fueron seleccionadas para enviarse a secuenciar con los iniciadores FMG1 y T7 y se nombraron como FM1 y FM2 para *M. truncatula*, FM3 y FM4 para *M. sativa* L., FM5 para *M. sativa* var. Moapa y FM6 para *M. sativa* var. Cuf. El resultado de la secuenciación permitió evidenciar la presencia de la secuencia *psbA – trnH* únicamente en los plásmidos FM2, FM3, FM5 y FM6 y su posterior análisis demostró que entre las variedades de trabajo la secuencia *psbA – trnH* es altamente conservada (apéndice 2), esto es consistente con las observaciones reportadas por otros autores como Aldrich *et al.*, (1988), quien estudió la región entre *psbA* y *trnH* de diversas especies de plantas superiores, y usando a *Marchantia polymorpha* como marcador ancestral “estándar” encontró que alfalfa contiene una inserción de 210 pb en cuya estructura existen porciones de ADN que se encuentran en otras leguminosas (*Pisum sativum* y *Glycine max*) con solo ciertas variaciones atribuidas a eventos de delección en estas últimas, sugiriendo que alfalfa es una especie ancestral con respecto a otras especies de leguminosas. Las variaciones en esta región intergénica del cloroplasto podrían usarse para definir relaciones evolutivas entre leguminosas, pero no solo eso, el vector de transformación construido en el presente trabajo utilizando la región *psbA – trnH* del genoma del cloroplasto de alfalfa podría usarse como región universal para modificar otras especies de leguminosas o, en su defecto, los mismos iniciadores que fueron usados para amplificar esta región en alfalfa (FMG1 y FMG2) podrían emplearse para amplificar *psbA – trnH* en otras leguminosas además de alfalfa.

Los plástidos son sistemas genéticos asexuales y al igual que en muchas especies, excluidas de la recombinación sexual, presentan menores mutaciones por eliminación de bases que el genoma nuclear a lo largo del tiempo (Wolfe *et al.*, 1987 en Bock, 2007). Estudios recientes han aportado evidencia experimental que atribuye al alto grado de poliploidia del cloroplasto, aunado a una fuerte actividad correctiva de mutaciones por conversión de genes, lo que permite mantener las velocidades de mutación en plástidos muy baja (Bock, 2007).

Por lo anterior se empleó únicamente a FM2 de *M. truncatula* como plásmido base para la construcción del plásmido pFM244b, mismo que podría servir para modificar el genoma de todas las variedades de alfalfa y de otras leguminosas.

6.1.3. Construcción del plásmido pFM244.

El plásmido FM2 fue sometido a una restricción con la enzima *Paul* para extraer las dos regiones del sitio de clonación múltiple que quedaron flanqueando la secuencia homóloga una vez que fue insertada en pBsKSII. Como se mencionó en la sección 6.1.2, estas regiones estaban delimitadas por sitios de restricción *Paul* y se aprovechó esta cualidad para extraerlas del plásmido FM2. Si consideramos que un nuevo sitio de clonación tiene que ser insertado en el interior de la secuencia homóloga para desarrollar el vector polifuncional pFM244b, entonces es necesario retirar las regiones del primer sitio de clonación múltiple para evitar la presencia de sitios de restricción duplicados que interfieran en la construcción del vector. Esto se logró purificando de un gel de agarosa los fragmentos de ADN correspondientes al esqueleto de pBsKSII y de *psbA – trnH* después de haber sido cortados con *Paul*, sometiéndolos posteriormente a una reacción de re-ligación que generó un plásmido sin las regiones correspondientes al sitio de clonación múltiple. El plásmido obtenido se nombró FM244. De acuerdo con el análisis realizado al genoma del cloroplasto de *M. truncatula* al someter este nuevo plásmido a una reacción de restricción con las enzimas *Paul* y *NdeI* se generarían fragmentos que corresponden al esqueleto de pBsKSII (2750 pb aproximadamente) y a la secuencia homóloga cortada por la mitad con *NdeI* (1100 pb aproximadas), por otra parte, si las regiones correspondientes al sitio de clonación múltiple aun se encuentran en el plásmido entonces también existirán cadenas de ADN de menos de 100 pares de bases que se pueden evidenciar sometiendo los plásmidos restringidos a una electroforesis en gel de agarosa (figura 7), pero solo aquel plásmido que

no contenga dichas cadenas menores a 100pb puede ser empleado para seguir la construcción del plásmido pFM244b.

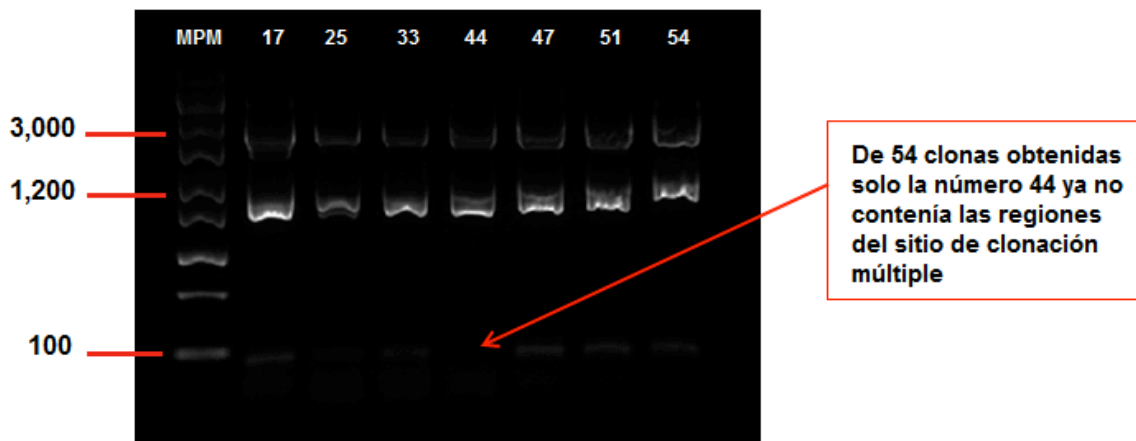


Figura 7. Restricción realizada con *Paul* y *NdeI* a plásmidos que contienen las regiones del sitio de clonación múltiple de *pBsKSII* (17, 25, 33, 47, 51 y 54) y al plásmido FM244 (44) que ya no las contiene. Las bandas cercanas a 3 kb corresponden al esqueleto de *pBsKSII*, mientras que las cercanas a 1.2 kb corresponden a *psbA - trnH*, las bandas menores a 100 pb indican la presencia del sitio de clonación múltiple.

La estructura general del plásmido FM244 (figura 8) contiene al esqueleto de *pBsKSII* y la secuencia homóloga *psbA - trnH* sin las regiones correspondientes al sitio de clonación múltiple y debido a que el gen de resistencia a ampicilina no ha sido alterado aun es posible realizar la selección de clonas en medio sólido adicionado con este antibiótico.

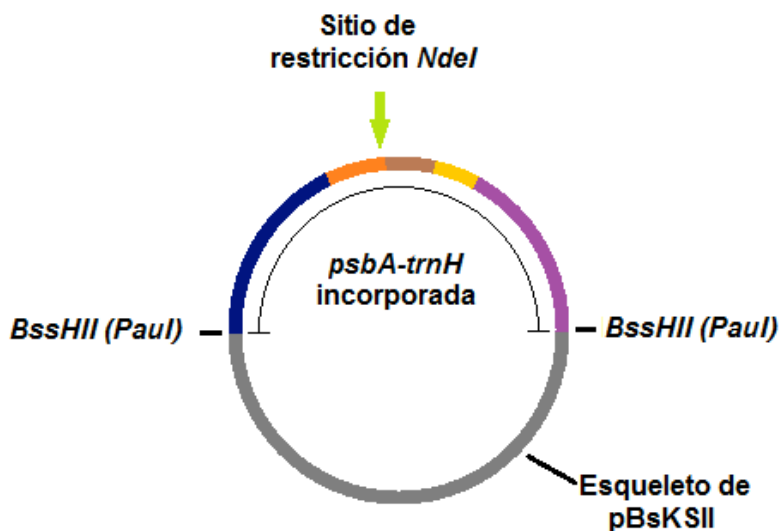


Figura 8. Estructura general del plásmido FM244. Las regiones correspondientes al sitio de clonación múltiple ya han sido eliminadas y solo se encuentran presentes las secuencias que comprende al esqueleto de *pBsKSII* y a *psbA - trnH*, mismas que fueron unidas

con una re-ligación de los extremos cohesivos *Paul*. La secuencia homóloga contiene un sitio de restricción único *NdeI* en la región intergénica ubicada entre los genes *psbA* y *trnH*.

6.1.4. Construcción del plásmido pFM244b.

El plásmido FM244 obtenido en 6.1.3 contiene un sitio de restricción *NdeI* ubicado en la región intergénica entre *psbA* y *trnH*, su característica de ser único y de ubicarse precisamente en una región intergénica lo convierten en el punto de inserción del nuevo sitio de clonación múltiple. Este sitio de clonación múltiple se extrajo del plásmido pBsKSII mediante una restricción con la enzima *Paul*. Mediante una electroforesis en gel de agarosa fue posible extraer y purificar el sitio de clonación múltiple (figura 9) que posteriormente se insertó en el plásmido FM244 dentro del sitio de restricción *NdeI*.

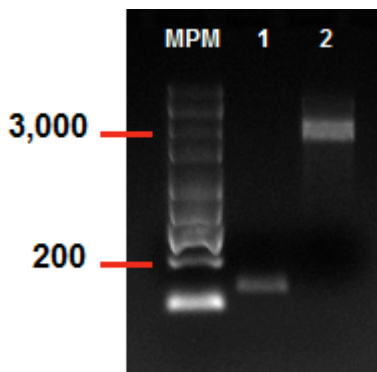


Figura 9. Restricción realizada a pBsKSII para extraer el sitio de clonación múltiple.

En el carril 1 se observa el MCS, mientras que en el 2 se aprecia la banda que corresponde al esqueleto de pBsKSII.

Los sitios de restricción *NdeI* de FM244 y *Paul* del MCS no son compatibles, de tal forma que antes de realizar la ligación de estas cadenas de ADN, sus extremos cohesivos se trataron con dos diferentes enzimas, por separado, con el fin de formar extremos romos que pudieran unirse mediante una ligación con la enzima T4 DNA Ligasa. Las cadenas de ADN se sometieron, por una parte a la acción de la enzima S1 Nucleasa que corta los nucleótidos de las cadenas simples en los extremos cohesivos 5' y 3', y en otra reacción a la actividad de la enzima T4 DNA polimerasa que complementa la cadena sencilla en el extremo 5' y escinde en el extremo 3'.

De forma cotidiana la ligación de cadenas de ADN de tamaños superiores a 300 pares de bases dentro de plásmidos requiere que la relación molar del inserto respecto del

plásmido sea 1:1, pero para el caso del sitio de clonación múltiple de pBsKSII la relación a la que se obtuvieron mejores resultados fue 4:1. La ligación obtenida se usó para modificar genéticamente células *E. coli* DH5- α a partir de las cuales se extrajo el plásmido FM244b.

La ligación entre el sitio de clonación múltiple y FM244 dio como resultado el plásmido FM244b cuya estructura se observa en la figura 10.

Veintitrés sitios de restricción diferentes componen el sitio de clonación múltiple de pBsKSII pero solo diecinueve son únicos en FM244b (tabla 6) y en cada uno de ellos o combinación de ellos es posible incorporar nuevas secuencias o genes de interés.

La versatilidad de la estructura de este plásmido puede incluso aprovecharse para desarrollar un vector de extensión en el que la introducción de un grupo o conjunto de genes tenga la capacidad de regular su propia expresión a partir de los sustratos con los que interactúan las proteínas que codifican estos mismos genes.

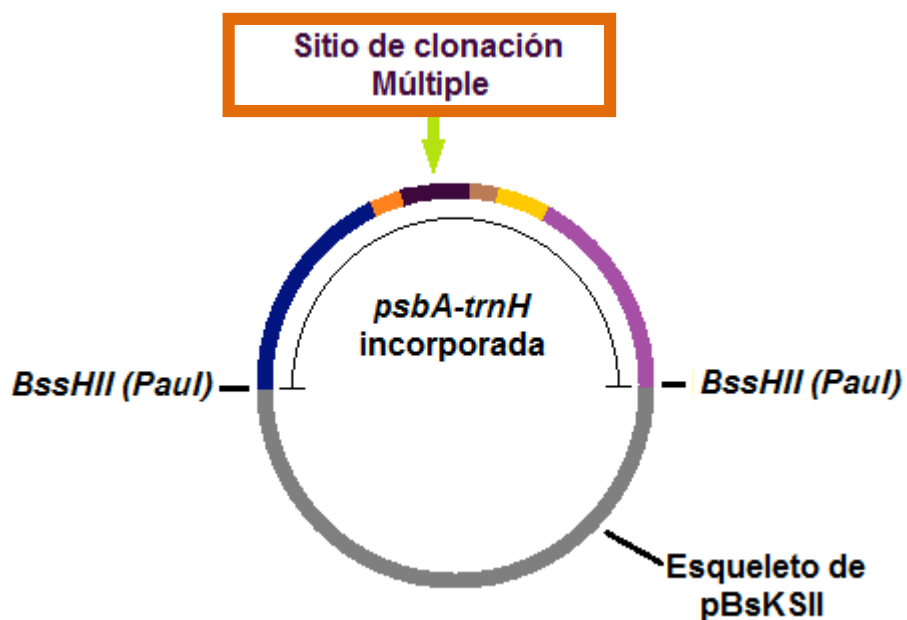


Figura 10. Estructura general del plásmido FM244b.

El nuevo plásmido contiene al esqueleto de pBsKSII, a la secuencia homóloga y un nuevo sitio de clonación múltiple ubicado en la región intergénica entre *psbA* y *trnH*, con lo que el plásmido FM244b dispone de 23 sitios de restricción que pueden ser empleados solos o por separado para incorporar nuevas secuencias y genes diversos.

Tabla 6. Sitios de restricción que se encuentran en el sitio de clonación múltiple de pBsKSII.

Enzima	Secuencia	No. de cortes en FM244b	Enzima	Secuencia	No. de cortes en FM244b
<i>SacI</i>	GAGCT*C	1 corte	<i>EcoRV</i>	GAT*ATC	1 corte
<i>BtgI</i>	C*CRYGG	1 corte	<i>HindIII</i>	A*AGCTT	3 cortes
<i>SacII</i>	CCGCG*G	1 corte	<i>Clal</i>	AT*CGAT	1 corte
<i>NotI</i>	GC*GGCCGC	1 corte	<i>Sall</i>	G*TCGAC	1 corte
<i>EagI</i>	C*GGCCG	1 corte	<i>Accl</i>	GT*MKAC	1 corte
<i>XbaI</i>	T*CTAGA	3 cortes	<i>HincII</i>	GTY*RAC	1 corte
<i>SpeI</i>	A*CTAGT	1 corte	<i>XhoI</i>	C*TCGAG	1 corte
<i>BamHI</i>	G*GATCC	1 corte	<i>PspOMI</i>	G*GGCCC	1 corte
<i>XmaI</i>	C*CCGGG	1 corte	<i>Apal</i>	GGGCC*C	1 corte
<i>SmaI</i>	CCC*GGG	1 corte	<i>Acc65I</i>	G*GTACC	1 corte
<i>PstI</i>	CTGCA*G	2 cortes	<i>KpnI</i>	GGTAC*C	1 corte
<i>EcoRI</i>	G*AATTC	3 cortes			

6.1.5. Construcción del plásmido pFM244b-aadA.

El plásmido FM244b puede ser utilizado para incorporar en su sitio de clonación múltiple cualquier gen de interés. En este trabajo se empleó el gen *aadA* que confiere resistencia a los antibióticos espectinomina y/o estreptomina (Svab *et al.*, 1990, 1993), mismo que está bajo el control del promotor constitutivo del operón 16 S rRNA (*Prrn*), el cual es un promotor fuerte con un sitio de unión a ribosomas sintético diseñado a partir del gen *rbcl*, y del terminador *TpsbA* (Staub y Maliga, 1994) del gen *psbA* (proteína D1 del fotosistema II del cloroplasto). Tanto el promotor como el terminador tienen su origen en el genoma plastidial de tabaco.

El gen *aadA* se insertó en el sitio *EcoRV* de pFM244b (figura 11), con lo que se obtuvo el plásmido denominado pFM244b-aadA, y su secuenciación se encuentra en el apéndice 2. Previamente se extrajo este gen del plásmido pLCV2-GFP-aadA23I obtenido anteriormente por el grupo de trabajo, mediante una restricción con la enzima *Ascl*.

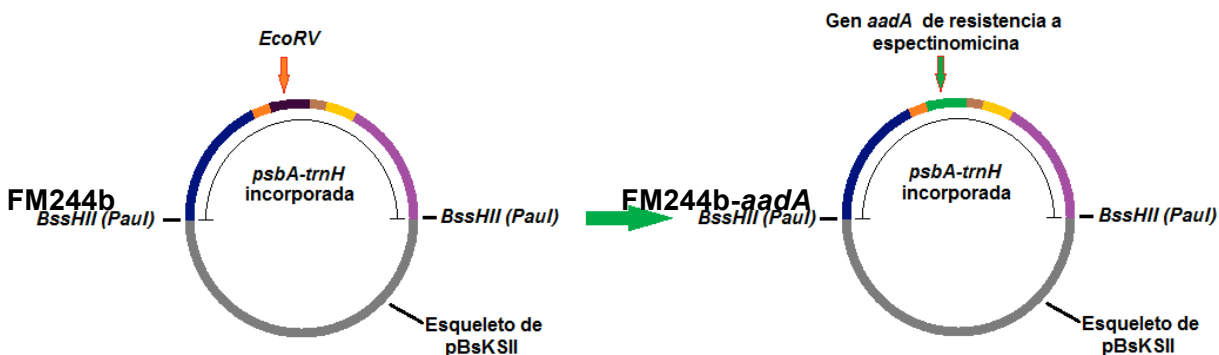


Figura 11. Plásmido *pFM244b-aadA* obtenido al insertar el gen de resistencia a espectinomicina en *pFM244b*. El gen *aadA* que confiere la resistencia a espectinomicina se insertó en el sitio *EcoRV* ubicado en el sitio de clonación múltiple del plásmido *pFM244b*.

6.2. Protocolo de regeneración para tejidos vegetales de alfalfa.

La modificación genética de cloroplastos de alfalfa mediante la técnica de biobalística requiere de la elaboración de un protocolo para la regeneración de tejidos vegetales que permita la obtención de una planta transgénica no quimérica cuyo genoma plastidial pueda transmitirse a su progenie. Un componente exitoso para la transferencia de genes (transformación genética) es la habilidad para regenerar plantas de aquellas células que han sido transformadas, siendo el más efectivo y seguro el método de regeneración por embriogénesis somática (Ellis *et al.*, 1993).

Las células que son objeto de modificación genética se seleccionan inicialmente con genes de marcaje que les confieren resistencia a algún antibiótico como espectinomicina, estreptomicina y kanamicina (Maliga, 2003). Al aplicar la técnica de biobalística el ADN exógeno es introducido en las células por medio de partículas microscópicas en las que se acopla, estas partículas son aceleradas a altas velocidades para atravesar la pared y la membrana celular, ocasionando un estrés mecánico que puede incluso provocar la muerte de las células, por consiguiente la eficiencia en la modificación genética de las células es muy baja y se hace necesario utilizar un sistema de selección *in vitro* que permita la pronta recuperación del tejido así como la selección de las células transformadas. En base a lo

anterior, y considerando que el ácido 2,4-diclorofenoxiacético y la benzil-aminopurina son, respectivamente, la auxina y citocinina más utilizadas en trabajos de regeneración de tejidos vegetales (Calva, 2005), se emplearon un total de 15 formulaciones diferentes de estas hormonas en medio MS (sección 5.3) para inducir callos con los que se podrían obtener embriones somáticos. También se realizaron pruebas de regeneración con 2,4-D y cinetina para inducir la formación de embriones somáticos.

Trabajos previos (Villegas, 1991) indican que el crecimiento de peciolo de alfalfa *M. sativa* L. en medios selectivos adicionados con hormonas vegetales promueven en algunos casos la formación de callos y en otros la formación de embriones o hasta la necrosis del tejido en función de las concentraciones de auxinas como ácido indól acético AIA, ácido naftalén acético ANA, ácido indól butírico IBA y ácido 2,4-diclorofenoxiacético, y de citocininas como benzil-aminopurina BAP, isopentenil-adenina 2-IPA, zeatina y cinetina. Pero la aplicación de la técnica de biobalística requiere de la regeneración de tejidos de mayor extensión superficial, por lo que los peciolo no pueden usarse óptimamente en esta técnica de modificación y un nuevo estudio de regeneración se inició en el presente proyecto, ahora empleando no solo peciolo, sino también tallos, hojas y meristemas de plantas de alfalfa de las variedades *M. sativa* L., *M. sativa* variedad Cuf-101, *M. sativa* variedad Moapa y *M. truncatula* (figura 12).

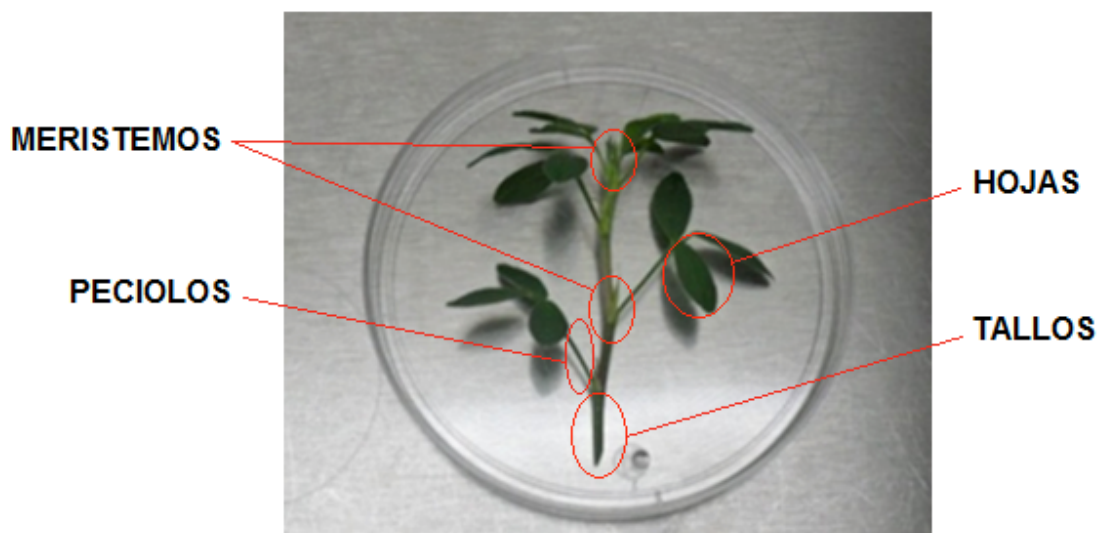


Figura 12. Explantes de alfalfa empleados para el establecimiento del protocolo de regeneración de tejidos. Meristemas, hojas, peciolo y tallos de las variedades *M. sativa* L., *M. sativa* variedad Moapa, *M. sativa* variedad Cuf-101 y *M. truncatula* fueron empleados para la elaboración del protocolo de regeneración.

Los explantes de trabajo (peciolos, tallos, hojas y meristemos) fueron obtenidos tanto de alfalfa crecida en tierra como de alfalfa sembrada en medios de cultivo en condiciones axénicas. Aquellos explantes obtenidos de alfalfa crecida en tierra fueron sometidos al protocolo de desinfección de tejidos descrito en la sección 5.3.4 y demostraron tener una eficiencia de regeneración menor que los explantes obtenidos de plantas crecidas en condiciones axénicas, por lo que se decidió seguir trabajando en el desarrollo del protocolo de regeneración únicamente con los explantes obtenidos de plantas crecidas en medios de cultivo estériles.

Antes de ser sembradas en medios estériles, las semillas de alfalfa se sometieron al “protocolo de desinfección de semillas” descrito en 5.3.3, una vez desinfectadas se sembraron y germinaron durante cinco días en cajas Petri con medio de cultivo MS1/4 o Knop (apéndice 1) y posteriormente se trasplantaron a medio MS adicionado con vitamina B5 (apéndice 1). Lo anterior demostró tener mejor efecto en el crecimiento de la planta que el simplemente germinar la semilla y crecer la planta en los mismos medios MS1/4 o Knop.

Las semillas de alfalfa de las cuatro variedades de trabajo también se sembraron en medio sólido MS1/4 con espectinomicina (500 mg/L), lo que propició su muerte demostrando que la alfalfa no es resistente a este antibiótico y que el gen *aadA* que confiere resistencia al mismo puede emplearse como gen de selección al modificar el genoma plastidial de la planta (figura 13).

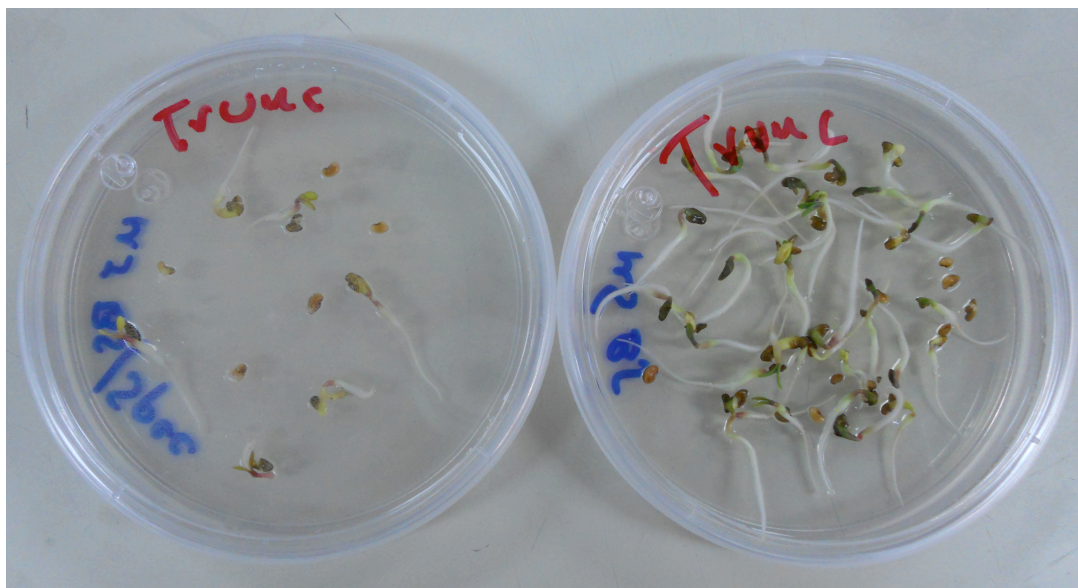


Figura 13. Semillas de alfalfa variedad (*M. truncatula*) sembradas en medio MS con y sin antibiótico. A la izquierda las semillas sembradas con espectinomicina y a la derecha sin espectinomicina.

6.2.1. Regeneración celular de explantes de alfalfa.

Los peciolo y los tallos fueron los explantes que de manera más homogénea indujeron callos de tamaño mediano en los medios MS complementados con auxina (2,4-D) y citocinina (BAP). Para las cuatro variedades de trabajo (tablas 7 y 8, apéndice 3) tardaron entre cuatro y seis días en empezar a formarlos. Por su parte, las hojas cultivadas en medios complementados con ambas hormonas presentaron una respuesta mixta (figura 14), es decir los cultivos manifestaron formación de callos, y crecimiento diferenciado del tejido, así como muerte del tejido (necrosis), este último principalmente cuando la concentración de 2,4-D fue de 1.5 mg/L, pero en ningún caso se registró el crecimiento de brotes.

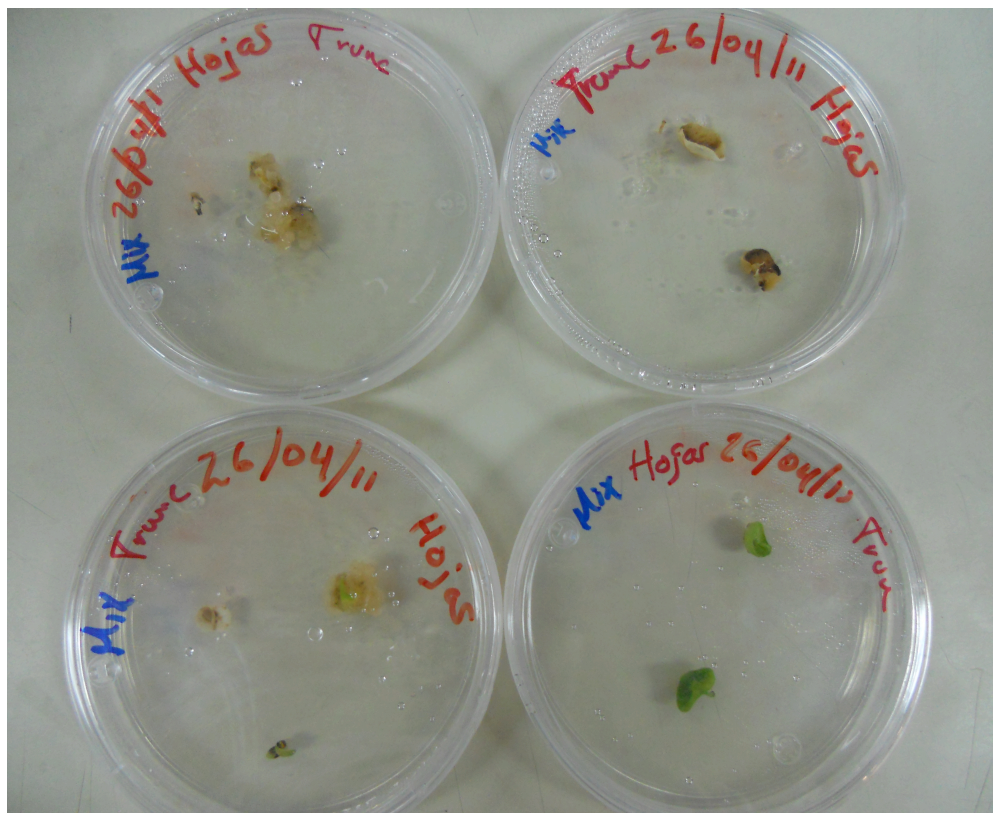


Figura 14. Desarrollo mixto del tejido a partir de hojas de alfalfa (*M. truncatula*).

En algunos casos se presenta la formación de callos, mientras que en otros la hoja muere o continúa su crecimiento sin desdiferenciar su estructura.

La variedad *M. truncatula* mostró el menor crecimiento de callos a partir de hojas, así como la mayor proporción de tejidos mixtos (tabla 9, apéndice 3). Los meristemas de las

cuatro variedades de alfalfa presentaron el mayor crecimiento de brotes directos (figura 15) y también el mayor crecimiento de callos. Una constante en la obtención de callos en todos los tipos de explantes utilizados es la presencia de 2,4-D y BAP en el medio.



Figura 15. Brotes directos obtenidos de meristemos de alfalfa *M. sativa* variedad Cuf-101. La aparición de los brotes se registró después de 30 días de cultivo en medio MS complementado con 1mg/L de 2,4-D y 0.2mg/L de BAP

Los medios en los que se registraron las mejores condiciones para el crecimiento de callos contienen 2,4-D a concentraciones de 0.5 y 1.0 mg/L y BAP a 0.2 y 0.4 mg/L (tablas 7, 8, 9 y 10, apéndice 3), induciendo a callos en el menor tiempo, sin embargo después de 15 días en todos los medios complementados con ambas hormonas se registró crecimiento de callos, incluso en hojas a pesar de que la respuesta fue mixta (figura 16). A partir de meristemos, en dos explantes crecimiento de raíces en la variedad *Medicago sativa* L. Los explantes crecidos en los medios que únicamente contienen 2,4-D en las 3 concentraciones de trabajo también indujeron el crecimiento de callos (figura 17), aunque de menor tamaño que los medios que además contenían BAP.

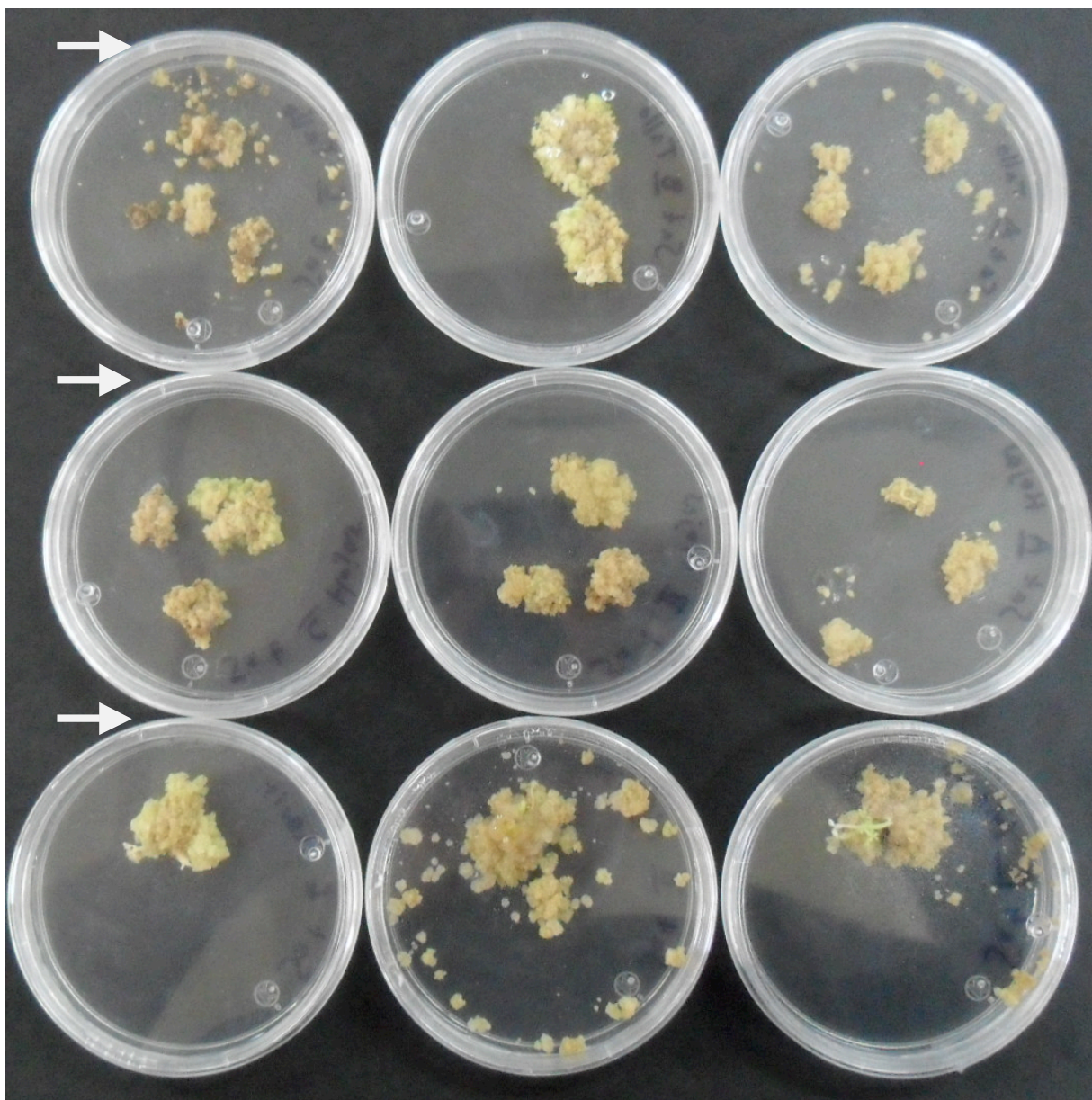


Figura 16. Callos obtenidos de a) tallos, b) hojas y c) meristemos de *M. sativa* L. después de 30 días de cultivo. El medio MS fue complementado con 2,4-D y BAP a concentraciones de 1.0 mg/L y 0.2 mg/L, respectivamente.

En peciolo y tallos se observó que no hace falta la incorporación de BAP si lo que se busca es inducir callos a partir de estos explantes. Por el contrario los mismos explantes cultivados en medios complementados únicamente con BAP no inducen callos y se promueve la necrosis del tejido en las tres concentraciones usadas en este trabajo (figura 17). Sin embargo, en hojas y meristemos de las cuatro variedades de alfalfa usadas en la regeneración del tejido la respuesta es mixta cuando los medios de cultivo se encuentran adicionados solo con la auxina o con la citocinina, formando callos en el caso de ambos tipos

de explante, brotes directos solo en meristemos, crecimiento diferenciado del tejido tanto en hojas como meristemos y necrosis en ambos tipos de explantes (tablas 9 y 10, apéndice 3).

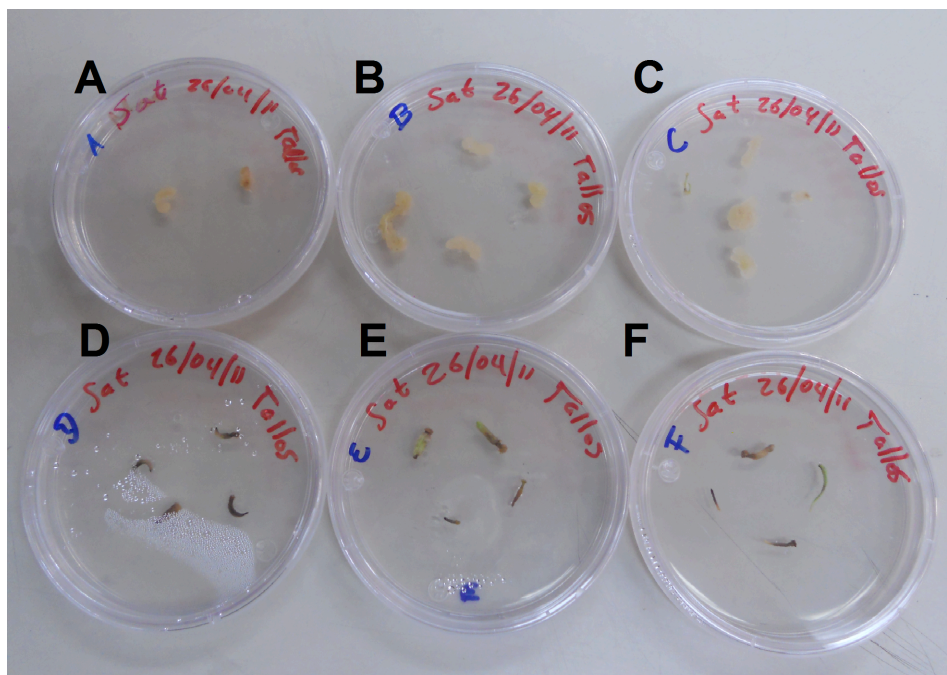


Figura 17. Tallos sembrados en medios complementados 2,4-D y BAP, por separado.

(A, B y C) contienen únicamente 2,4-D y (D, E y F. contienen únicamente BAP. Solo los primeros formaron callos, mientras que los complementados con BAP indujeron la necrosis del tejido.

El tejido calloso que se forma entre los 15 y 35 días en los medios complementados con ambas hormonas y con 2,4-D no presenta conexión vascular ni diferenciación alguna y las células que lo conforman carecen de cloroplastos en la mayoría de los casos. Después de los 45 y hasta los 60 días de cultivo gran cantidad de células comienzan a diferenciar plastidios en cloroplastos y esto puede deberse a la disminución en la concentración de la auxina o a la disminución de la humedad que induce un estrés metabólico en las células (figura 18).



Figura 18. Tejido calloso de tallos después de 45 días de incubación.

A diferencia de las hojas y tejidos de Tabaco, planta modelo por excelencia para realizar modificaciones genéticas, los peciolos, tallos, hojas y meristemos de alfalfa son muy pequeños al crecer en condiciones de esterilidad dentro de cajas Magenta y la aplicación de la técnica de biobalística para modificar el genoma puede resultar poco funcional. Sin embargo, el crecimiento de callos que mostraron los tejidos de alfalfa fue semiconfluente en medio sólido, siendo más homogéneo en peciolos y tallos pero no tan grande como en el caso de meristemos (figura 19). Este crecimiento puede ser una alternativa al empleo de explantes en la técnica de biobalística, utilizando callos como objetivo de la transformación y regeneración del tejido directamente en caja, haciendo únicamente necesaria la inducción de brotes o embriones después de aplicar la técnica de modificación.



Figura 19. Crecimiento semiconfluente de callos a partir de meristemos de *M. sativa L.*

También se cultivaron explantes en medio con 2,4-D (1.0 mg/L) y cinetina (0.2 mg/L) de acuerdo al protocolo reportado por Villegas (1991) para inducir la formación de embriones. Hojas y meristemos de *M. sativa*, al igual que callos previamente obtenidos de meristemos de esta misma planta presentaron embriogénesis somática, es decir formación de embriones (figura 20).

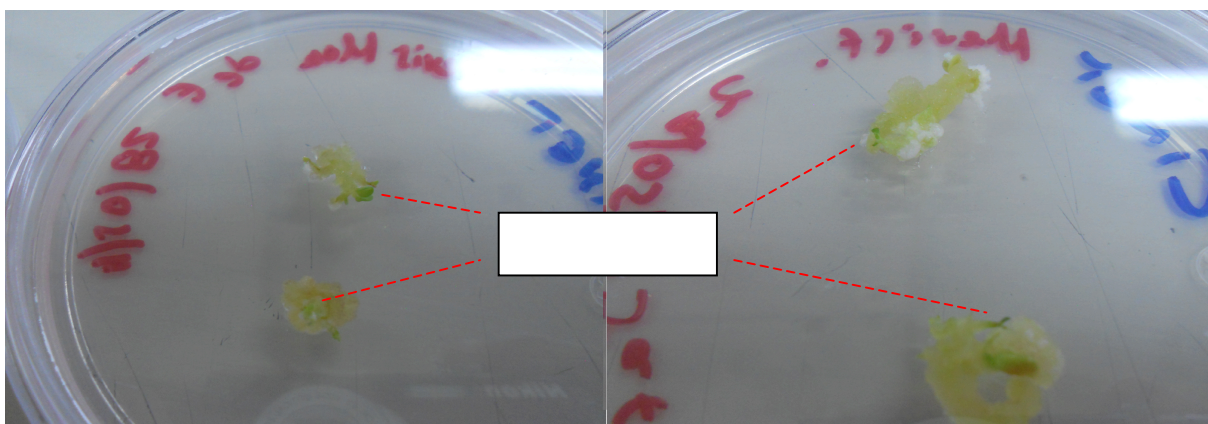


Figura 20. Embriones somáticos obtenidos de meristemos de la planta *M. sativa*.

Callos embriogénicos de otras especies vegetales con una alta capacidad de regeneración, como los que se obtuvieron con alfalfa (figura 19), han sido bombardeados con micropartículas de oro o tungsteno recubiertas con ADN de mezclas de plásmidos que pueden contener genes marcadores (Cabrera, 2004; Jiménez *et al.*, 2009), evidenciando la factibilidad de regenerar plantas transgénicas a partir del bombardeo de callos.

En el caso de alfalfa la capacidad de regeneración queda de manifiesto con el crecimiento de callos desde el cuarto día de cultivo en medio MS complementado con 2,4-D y BAP (tablas 7, 8, 9 y 10).

Por otra parte, en diversas concentraciones de trabajo de 2,4-D y BAP, aunque se presenta formación de callos, también se presenta necrosis en algunas partes del tejido. Este comportamiento puede deberse a que los tejidos de alfalfa fueron de diferente tamaño y edad, y también a las diferentes concentraciones de hormonas. El éxito en la inducción y establecimiento de cultivos de callos y, en consecuencia la subsiguiente regeneración de tejidos y plantas, son función de la calidad y tipo de explante usado, que a su vez depende de la planta madre o del tejido del que se inició el cultivo (Villegas, 1991; Hoque, 2004; Calva y Pérez, 2005), por lo que podemos inferir que las variaciones tan notorias en el crecimiento de callos en se debe a la edad y tamaño de los mismos.

Al final, la concentración de auxina y citocinina que ofrecieron los mejores resultados en la formación de callos son cercanas a 1 mg/L y 0.2 mg/L respectivamente. Por otra parte, debido a que se realizaron pocas repeticiones en las pruebas de regeneración con 2,4-D y cinetina los resultados aun se encuentran en discusión, sin embargo prometen una exitosa aplicación en la modificación genética de cloroplastos de alfalfa.

De entre las cuatro variedades de alfalfa que se emplearon en este protocolo de regeneración, *M. sativa* L. y sus variedades Moapa y Cuf-101 tuvieron respuestas similares en cuanto a la formación de callos, por lo que cualquiera de estas podría emplearse eficientemente en la modificación genética de cloroplastos y en la regeneración de una planta completa.

Algunos de los callos que se obtuvieron se siguieron cultivando durante un periodo de seis meses, provienen de callos obtenidos previamente a partir de peciolos, tallos, hojas y meristemas, y su subsistencia viable comprueba que es posible el mantenimiento por largos periodos de una línea celular de tejidos *in vitro* de alfalfa.

En el año de 1983 se inició el desarrollo de protocolos para la transformación genética nuclear de plantas de interés agronómico (Herrera Estrella *et al.*, 1983). A partir de esa fecha la introducción y expresión de genes foráneos en un genoma ha sido una herramienta de investigación en la biología vegetal y una herramienta práctica en el mejoramiento genético de cultivos vegetales (Cabrera, 2004), pero actualmente en México el mejoramiento de cultivos y la modificación nuclear de los genomas no son la única opción de la investigación en esta área. Los genomas de organelos como el cloroplasto y los cultivos vegetales actualmente hacen a estos últimos el medio de obtención de productos diversos entre los que se encuentran proteínas con potencial aplicación terapéutica.

Dentro del campo de la modificación genética de plantas existen dos variantes, la primera se centra en la modificación del genoma nuclear y generalmente ofrece bajos niveles de expresión de los transgenes (<1% de la proteína soluble total (Daniell *et al.*, 2009)), la segunda se enfoca en la modificación del genoma plastidial y ofrece los mayores niveles de expresión (>70% de la proteína soluble total (Oey *et al.*, 2009)), pero la mayoría de los trabajos sobre modificación genética plasidial se han llevado a cabo en la planta de tabaco. Las proteínas de aplicación terapéutica requieren de elevados niveles de pureza y las altas concentraciones del alcaloide nicotina que se encuentran en la planta de tabaco la hacen poco viable para su obtención. Alfalfa por otra parte, es una planta que no contiene agentes tóxicos que afecten a seres humanos o animales, por lo que el diseño y construcción del

plásmido pFM244b así como el establecimiento del protocolo de regeneración de tejidos para esta planta representan la posibilidad de obtener un modelo de producción de biofármacos totalmente inocuo que además aboliría los altos costos de producción relacionados con los procesos convencionales de fermentación, purificación y almacenamiento en frío que actualmente se emplean en la industria. Para plantas inocuas, algunos autores sugieren incluso el empleo de proteínas terapéuticas y vacunas directamente de la planta modificada sin una purificación previa reduciendo aún más los costos, aunque aquellas para consumo humano deben ser purificadas necesariamente.

Diversos plásmidos comerciales se caracterizan por tener un sitio de clonación múltiple en su estructura (por ej. pBsKSII), pero pocos plásmidos tienen la característica de tener dentro de una secuencia homóloga un sitio de clonación múltiple. El plásmido pFM244b tiene un sitio de clonación múltiple con 19 sitios de restricción únicos que lo hacen polifuncional, al mismo tiempo la región *psbA – trnH* en la que se encuentra el sitio de clonación múltiple es altamente conservada en las cuatro variedades de trabajo de Alfalfa y otras leguminosas, por lo que existe la posibilidad de que el plásmido pFM244b pueda utilizarse para realizar la modificación del genoma plastidial de varias leguminosas y no solo de Alfalfa.

La versatilidad del plásmido también hace factible ampliar su uso como vector de extensión para lograr que un grupo o conjunto de genes con elementos regulatorios específicos sean capaces de regular su expresión a través de los sustratos con los que interactúan las proteínas que ellos mismos codifican.

Por otra parte, aunque el objetivo de este trabajo se ha enfocado en la posible producción de proteínas con aplicaciones terapéuticas, es totalmente factible el empleo del plásmido pFM244b para sintetizar otros productos de interés, como bioplásticos (pHBs), enzimas, pigmentos, vitaminas y carotenoides.

No es factible la formación de callos y de embriones o brotes en todas las especies vegetales, incluso entre variedades de una misma especie, pero en el caso de alfalfa hasta el momento ha resultado posible su regeneración, quedando pendiente la obtención de una planta completa genéticamente modificada.

7. CONCLUSIONES.

- Se diseñó y construyó un vector específico para la modificación genética de cloroplastos de alfalfa que además podría ser empleado como vector de extensión.
- Se insertó el cassette de expresión del gen de resistencia a espectinomicina *aadA* en el vector construido.
- Se desarrollo un protocolo de regeneración de tejidos para la planta de alfalfa.
- Se analizó la respuesta de diferentes tejidos de alfalfa cultivados en medios de cultivo con diferentes concentraciones de auxinas y citocininas.

8. PERSPECTIVAS.

Con la construcción del vector descrito en el presente trabajo y las condiciones propuestas para la regeneración de la planta se pueden iniciar los trabajos para llevar a cabo la modificación genética de cloroplastos de alfalfa por biobalística. La funcionalidad del vector podría evaluarse de manera rápida y eficiente si se inserta un cassette de expresión para la proteína verde fluorescente y se monitorea su acumulación por microscopía confocal. Esto permitiría únicamente demostrar que el vector es funcional en el cloroplasto de alfalfa. Para comprobar que el gen de resistencia, junto con otros genes de interés, se están insertando en el cloroplasto, sería necesario regenerar la planta completa y sobre esta realizar una caracterización molecular.

Finalmente, resulta de importancia hacer notar que el proceso de modificación y regeneración propuesto por nuestro grupo de investigación para alfalfa es totalmente novedoso y patentable.

9. BIBLIOGRAFÍA.

1. Aldrich J, Cherney BW, Merlin E, Christopherson L. "The Role of Insertions-Deletions in the Evolution of the Intergenic Region between Psb-a and Trn-H in the Chloroplast Genome", *Current Genetics*. (1988). 14, 137-46.
2. Arlen PA, Falconer R, Cherukumilli S, Cole A, Cole AM, Oishi KK, Daniell H. "Field production and functional evaluation of chloroplast-derived interferon-alpha2b". *Plant Biotechnol. J.* (2007) 5, 511-525.
3. Arlen PA, Singleton M, Adamovicz JJ, Ding Y, Davoodi-Semiromi A, Daniell H, "Effective plague vaccination via oral delivery of plant cells expressing F1-V antigens in chloroplasts". *Infect. Immun.* (2008) 76, 3640-3650.
4. Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K., "Current protocols in molecular biology" *JW&S, Inc.* (2003).
5. Barta A, Sommergruber K, Thompson D, Hartmuth K, Matzke MA, Matzke AJM "The expression of a nopaline synthase human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue" *Plant Mol. Biol.* 6, 347-357 (1986).
6. Bidwell R.S.S., "Fisiología vegetal", Ed. AGT, México, 1ª Ed. (1979).
7. Birch-Machin I, Newell CA, Hibberd JM, Gray JC "Accumulation of rotavirus VP6 protein in chloroplasts of transplastomic tobacco is limited by protein stability". *Plant Biotechnol. J.* (2004), 2, 261-270.
8. Bock R., "Cell and Molecular Biology of plastids". *Springer*. 19. 2007.
9. Buhot L., Horvath E., Medgyesy P., Lerbs-Mache S., "Hybrid transcription system for controlled plastid transgene expression". *Plant J.* (2006) 46:700-707.
10. Buising CM, Tomos D, Schmidt J, "Methods of regeneration of *Medicago sativa* and expressing foreign DNA in same" US patent 5324646, 1994.
11. Cabrera P. J. L., Solicitud de Patente: MX JL 02000044 A / "Transformación genética en el género *Agave* y producción de plantas transgénicas resistentes a herbicidas". Centro de Investigación y Estudios Avanzados / Unidad Irapuato. (2004).
12. Cahoon A.B., Harris F.M., Stern D.B., "Analysis of developing maize plastids reveals two mRNA stability classes correlating with RNA polymerase type". *EMBO Rep.* (2004) 5:801-806.

13. Calva C. G, Pérez V. J., “Cultivo de Células y Tejidos Vegetales: Fuente de Alimentos para el Futuro” *Revista Digital Universitaria*. Volumen 6. (2005). Número 11, ISSN: 1067-6079.
14. Cardi T., Lenzi P., Maliga P., “Chloroplast as expression platforms for plant-produced vaccines” *Expert rev. Vaccines* 9(8), (2010) 893-911.
15. Daniell H., Datta R., Varma S., Gray S., Lee S.B., “Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome”. *Nat. Biotechnol.* 16 (1998) 345-348.
16. Daniell H, Lee SB, Panchal T, Wiebe P, “Expression of the native cholera toxin B gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco”, *J. Mol. Biol.* (2001), 311, 1001-1009.
17. Daniell H., Singh N.D., Mason H., Streatfield S.J., “Plant made vaccine antigens and biopharmaceuticals”. *Cell Press*. (2009). 1360-1385.
18. Davoodi-Semiromi A, Schreiber M, Nalapalli S, Verma D, Singh ND, Banks RK, Chakrabarti D, Daniell H, “Chloroplast-derived vaccine antigens confer dual immunity against cholera and malaria by oral or injectable delivery”, *Plant Biotechnol. J.*, (2010), 8, 223-242.
19. De Cosa B., Moar W., Lee S.B., Miller M., Daniell H., “Overexpression of the *Bt cry2Aa2* operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals”. *Nat. Biotechnol.* (2001). 19:71-74.
20. Devlin R.M., “Fisiología vegetal” Ed. Omega, Barcelona, España. (1980).
21. Dufourmantel N., Dubald M., Matringe M., Canard H., Garcon F., Job C., Kay E., Wisniewski J.P., Ferullo J.M., Pelissier B., Sailland A., Tissot G., “Generation and characterization of soybean and marker-free tobacco plastid transformants overexpressing a bacterial 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase which provides strong herbicide”. *Plant Biotechnol. J.* (2007). 5:118-133.
22. D.Z. Skinner, “Non random chloroplast DNA hypervariability in *Medicago sativa*”, *Theor Appl Genet.* (2000). 101:1242–1249. Springer-Verlag.
23. Eibl C., Zou Z., Beck A., Kim M., Mullet J., Koop H.U., “In vivo analysis of plastid *psbA*, *rbcL* and *rpl32* UTR elements by chloroplast transformation: tobacco plastid gene expression is controlled by modulation of transcript levels and translation efficiency”. *Plant J.* (1999). 19:333-345.

24. Farran I., Sanchez-Serrano J.J., Medina J.F., Prieto J., Mingo-Castel A.M., "Targeted expression of human serum albumin to potato tubers" *Transgenic Research*. (2002).11:337-346.
25. Fernández-San Millán A, Ortigosa SM, Hervás-Stubbs S, Corral-Martínez P, Seguí-Simarro J, Gaétan J, Coursaget P, Veramendi J, "Human papillomavirus L1 protein expressed in tobacco chloroplasts self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic", *Plant Biotechnol. J.* (2008), 6, 427-441.
26. Fernández-San Millán A., Mingo-Castel A., Miller M., Daniell H. "A chloroplast transgenic approach to hyper-express and purify human serum albumin, a protein highly susceptible to proteolytic degradation". *Plant Biotechnol. J.* (2003). 1:71-79.
27. Flügge, Ulf-Ingo, "Plant chloroplast and other plastids", *Encyclopedia of Life Sciences* (2001), P.p. 1-7
28. Glenz K, Bouchon B, Sthele T, Walich R, Simon MM, Warzecha H, "Production of a recombinant bacterial lipoprotein in higher plant chloroplasts", *Nat. Biotechnol.* (2006), 24, 76-77.
29. Grant S.G.N., Jessee J., Bloom F.R., Hanahan D., "Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1990). Vol. 87, pp. 4645-4649.
30. Heifetz Peter B., "Genetic engineering of the chloroplast", *Biochimie Elsevier* (2000), 655-666.
31. Hening A, Bonfig K, Roitsch T, Warzecha H, "Expression of the recombinant bacterial outer surface protein A in tobacco chloroplasts leads to thylakoid localization and loss of photosynthesis". *FEBS J.* (2007), 274, 5749-5758.
32. Hernández-Fernández MM, Christie BR, "Inheritance of somatic embryogenesis in alfalfa (*Medicago sativa* L.)" *Genome*, (1989), 32(2) 318-321.
33. Herz S., Füssl M., Steiger S., Koop H.U., "Development of novel types of plastid transformation vectors and evaluation of factors controlling expression". *Transgenic Res* (2005) 14:969-982.
34. Hoque E. y Mansfield J.W., "Effect of genotype and explant age on callus induction and subsequent plant regeneration from root-derived callus of Indica rice genotypes", *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* (2004).78: 217-223.
35. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes>

36. Huang T. y McDonald K., "Bioreactor engineering for recombinant protein production in plant cell suspension cultures", *Biochemical Engineering Journal*. (2009), P.p. 168-184
37. Hugh S. Manson, Dominic Man-Kit Lam y Charles J. Arntzen. "Expresion of Hepatitis B surface antigen in transgenic plants". *Immunology*. (1992). 89: 11745-11749.
38. Hurtado D., Merino M.E., "Cultivo de tejidos vegetales", Ed. Trillas, México. 1997.
39. James G. J. y Daniell H., "Cloroplast genetic engineering: recent advances and future perspectives", *Critical Reviews in Plant Sciences*. (2005), P.p. 83-107.
40. Jiang XL, He ZM, Peng ZQ, Qi Y, Chen Q, Yu ZY, "Cholera toxin B protein in transgenic tomato fruit induces systemic immune response in mice". *Transgenic Res*. (2007).16: 169-175.
41. Jiménez V. M. J., Olivera F. M. T. J., Guerrero A. O., Gómez M. A., L. Elizabeth. "Transformación genética de callos embriogénicos de maíz (*Zea mays* L) con el gen de la glicoproteína G del virus de la Rabia". XXII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. (2009).
42. Kanamoto H., Yamashita A., Asao H., Okumura S., Takase H., Hattori M., Yokota A., Tomizawa K., "Efficient and stable transformation of *Lactuca sativa* L. cv. Cisco (lettuce) plastids". *Transgenic Res*. (2006). 15:205-217.
43. Khan M.S., Maliga P. "Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plants". *Nat. Biotechnol*. (1999). 17:910-915
44. Koop H., Herz S, Golds T. y Nickelsen J., "The genetic transformation of plastids", *Cell and Molecular Biology of Plastids Vol.19*. (2007). Edit. Springer Berlin / Heidelberg, P.p. 457-510
45. Koop H.U., Steinmuller K., Wagner H., Rossler C., Eibl C., Sacher L., "Integration of foreign sequences into the tobacco plastome via polyethylene glycol- mediated protoplast transformation" *Planta* 199 (1996) 193-201.
46. Kuroda H., Maliga P., "Complementarity of the 16S rRNA penultimate stem with sequences downstream of the AUG destabilizes the plastid mRNAs". *Nucleic Acids Res*. (2001) 29:970-975.
47. Kuroda H., Maliga P., "Overexpression of the *clpP* 5'-untranslated region in a chimeric context causes a mutant phenotype, suggesting competition for a *clpP*-specific RNA maturation factor in tobacco chloroplasts". *Plant Physiol* (2002) 129:1600-1606.

48. Lelivelt Cilia L C, Matthew S McCabe, Christine A Newell, C Bastiaan Desnoo, Kees M P van Dun, Ian Birch-Machin, John C Gray, Kingston H G Mills and Jacqueline M Nugent. "Stable plastid transformation in lettuce (*Lactuca sativa* L.)". (2005) *Pl Mol Biol* 58(6):763-74
49. Leopold A.C., Kriedemann P.E., "Plant Growth and development" Ed. McGraw-Hill, New York. 1975.
50. Ma J., Drake P. y Christou P., "The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants", *Nature Genetic Reviews*. (2003), P.p. 794-805.
51. Maliga P., "Plastid transformation in higher plants", *Reviews in Advance*. (2003). P.p. 289–304.
52. Maliga P., Carrer H., Kanevski I., Staub J., Svab Z., "Plastid engineering in land plants: a conservative genome is open to change" *Philos, Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 342 (1993) 203-208.
53. McBride K.E., Stalker D.M., "Expresión Mejorada en un Plástido de Planta", *Oficina Española de Patentes y Marcas*, ES 2 252 740 T3, (2006).
54. McBride K.E., Schaaf D.J., Daley M., Stalker D.M., "Controlled expression of plastid transgenes in plants based on a nuclear DNA-encoded and plastid-targeted T7 RNA polymerase". *Proc Natl Acad Sci USA* (1994). 91:7301-7305
55. McCabe MS, Klaas M, Gonzalez-Rabade N, Poage M, Badillo-Corona JA, Zhou F, Karcher D, Bock R, Gray JC, Dix PJ, "Plastid transformation of high biomass tobacco variety Maryland Mammoth for production of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) p24 antigen", *Plant Biotechnol. J.*, (2008), 6, 914-929.
56. Molina A, Hervás S, Daniell H, Mingo-Castel A, "High-yield expression of a viral peptide animal vaccine in transgenic tobacco chloroplasts". *Plant Biotechnol. J.* (2004), 2, 141-143.
57. Moravec, T, Schmidt MA, Herman EM, Woodford T, "Production of *Escherichia coli* heat labile toxin (LT) B subunit in soybean seeds and analysis of its immunogenicity as an oral vaccine" *Vaccine* (2007). 25. 1647-1757.
58. Newell C.A., Birch-Machin I., Hibberd J.M., Gray J.C., "Expression of green fluorescent protein from bacterial and plastid promoters in tobacco chloroplasts". *Transgenic Res.* (2003). 12:631-634.

59. Oey M., Lohse M., Kreikemeyer B. and Bock R., "Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic", *The plant Journal*. (2009). 57: 436 – 445
60. Pope B., Kent H.M., "High efficiency 5 min transformation of *Escherichia coli*". *Nucleic Acids Res.* (1996). 1; 24(3): 536-537.
61. Rigano, MM, Alvarez ML, Pinkhasov J, Jin Y, Sala F, Arntzen CJ, Walmsley AM, "Production of a fusion protein consisting of the enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-labile toxin B subunit and a tuberculosis antigen in *Arabidopsis thaliana*". *Plant Cell Rep.* (2004), 22, 502-508.
62. Rigano MM, Manna C, Pedrazzini E, Capobianchi M, Castilletti C, Di Caro A, Ippolito G, Beggio P, De Giuli Morghen C, Monti L, Vitale A, Cardi T, "Transgenic chloroplast are efficient sites for high-yield production of the vaccinia virus envelope protein A27L in plant cells". *Plant Biotechnol. J.* (2009), 7, 577-591.
63. Rosales-Mendoza S, Alpuche AG, Soria RE, Moreno L, Martínez L, Herrera A, Korban SS, "Expression of an *Escherichia coli* antigen fusion protein comprising the heat labile toxin B subunit and the heat labile toxin, and its assembly as a functional oligomer in transplastomic tobacco plants". *Plant J.* (2009), 57, 45-54.
64. S. Seeta Ram Rao, B. Vidya Vardhini, E. Sujatha y S. Anuradha, "Brassinosteroids – A new class of phytohormones" *Current Science*, 2002, Vol. 82, No. 10, 1239-1245.
65. Sambrook J., Russell D.W., "Molecular cloning: a laboratory manual". 3a Ed. *CSHL Press.* (2001)
66. Serino G., Maliga P., "A negative selection scheme based on the expression of cytosine deaminase in plastids" *Plant J.* 12 (1997) 697-701.
67. Scotti N, Alagna F, Ferraiolo E, Formisano G, Sannino L, Buonaguro L, De Stradis A, Vitale A, Monti L Grillo S, "High level expression of the HIV-1 Pr55^{gag} polyprotein in transgenic tobacco chloroplasts". *Planta* (2009), 229, 1109-1122.
68. Seitz MH, Bingham ET, "Interactions of highly regenerative genotypes of alfalfa (*Medicago sativa*) and tissue culture protocols" *In vitro Cellular & Developmental Biology*, (1988), Vol. 24, 10, 1047-1052.
69. Sidorov V.A., Kasten D., Pang S.Z., Hajdukiewicz P.T., Staub J.M., Nehra N.S., "Technical advance: Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker". *Plant J.* (1999). 19:209-216

70. Sriraman P., Silhavy D., Maliga P., "The phage-type *PclpP-53* plastid promoter comprises sequences downstream of the transcription initiation site". *Nucleic Acids Res.* (1998). 26:4874-4879.
71. Staub J. M. y Maliga P., "Translation of *psbA* mRNA is regulated by light via the 5' untranslated region of tobacco plastids". *The Plant Journal: for cell and molecular biology.* (1994). 6(4): 547-543.
72. Staub J. M. y Maliga P., "Accumulation of D1 polypeptide in tobacco chloroplast is regulated via the untranslated region of *psbA* mRNA" *EMBO J.* 12 (1993) 601-606.
73. Staub J. M. y Maliga P., "Expression of a chimeric *uidA* indicates that polycistronic mRNAs are efficiently translated in tobacco plastids" *Plant J.* 7 (1995) 845-848.
74. Staub, J.M., Garcia B., Graves J., "High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts" *Nature Biotechnol.* 18, 333-338 (2000).
75. Svab Z., Hajdukiewics P. y Maliga P., "Stable transformation of plastids in higher plants". *Proceedings of the Natural Academy of Science in the United States of America.* (1990). 87: 8526-8530.
76. Svab Z. y Maliga P., "High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene". *Proceedings of the Natural Academy of Science in the United States of America.* 90: 913-917. (1993).
77. Torrey J.G., "Root hormones and plant growth", *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 27: 439-459 (1976).
78. Tregoning JS, Nixon P, Svab Z, Clare S, Bowe F, Fairweather N, Ytterberg J, van Wijk KJ, Dougan G, Maliga P, "Expression of tetanus toxin fragment C in tobacco chloroplast" *Nucleic Acids Res.* (2003), 31, 1174-1179.
79. Tregoning JS, Clare S, Bowe F, Edwards L, Fairweather N, Qazi O, Nixon P, Maliga P, Dougan G, Hussell T, "Protection against tetanus toxin using a plant-based vaccine". *Eur. J. Immunol.* (2005) 35, 1320-1326.
80. Villegas G. T. "Tesis de Doctorado: Embriogénesis Somática en *Medicago sativa L.* y la Fisiología de su Desarrollo". (1991).
81. Wareing R.F., Phillips I.D.J., "The control of growth and differentiation in plants", *Pergamon Press.*, L.T.D., Gran Bretaña, 1973.

82. Wurbs D., Ruf S., Bock R., "Contained metabolic engineering in tomatoes by expression of carotenoid biosynthesis genes from the plastid genome". *Plant J.* (2007). 49:276–288.
83. Xiaonan X., Kaori Y., Koichi Y., "The Strigolactone Story", *Annual Review of Phytopathology*, 2010, Vol. 48: 93-117
84. Zoschke R., Liere K., Börner T. "From seedling to mature plant: *Arabidopsis* plastidial genome copy number, RNA accumulation and transcription are differentially regulated during leaf development". *Plant J.* (2007) 50:710-722.
85. Zoubenko O.V., Allison L.A., Svab Z., Maliga P., "Efficient targeting of foreign genes into the tobacco plastid genome". *Nucleic Acids Res.* (1994). 25:3819-3824.
86. Zhou F, Badillo JA, Karcher D, González N, Piepenburg K, Inka A, Maloney A, Kavanagh T, Gray J, Bock R, "High level expression of HIV antigens from the tobacco and tomato plastid genomes", *Plant Biotechnol.J.* (2008), 6, 897-913.

APENDICE 1

Formulación de medios de cultivo

Medio LB (Luria-Bertani)

Sustancia	Concentración final
Triptona	10,000 mg/L
Extracto de levadura	5,000 mg/L
NaCl	10,000 mg/L
Agua desionizada	Para 950 mL

Para medio de cultivo sólido, agregar 8,000 mg/L de Agar-Agar o agar bacteriológico.

Medio 2xYT

Sustancia	Concentración final
Triptona	16,000 mg/L
Extracto de levadura	10,000 mg/L
NaCl	5,000 mg/L
Agua desionizada	Para 950 mL

Para medio de cultivo sólido, agregar 8,000 mg/L de Agar-Agar o agar bacteriológico.

Medio de Knop

Sustancia	Concentración final
MgSO ₄ · 7H ₂ O	200 mg/L
KNO ₃	200 mg/L
KH ₂ PO ₄	200 mg/L
Ca(NO ₃) · 4H ₂ O *CaCl ₂	800 *374 mg/L
Agar	10000 mg/L
pH	5.5

Para medio de cultivo sólido, agregar 8,000 mg/L de Agar-Agar o agar bacteriológico.

APENDICE 1

Medio de Murashige & Skoog (MS) 1962

Macronutrientes	Concentración final mg/L	g (para un stock 10X en 1L)
NH ₄ NO ₃	1650	16.5
KNO ₃	1900	19
CaCl ₂	440	4.4
MgSO ₄	370	3.7
KH ₂ PO ₄	170	1.7
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	85	0.85

Micronutrientes	Concentración final mg/L	mg (para un stock 100X en 100mL)
KI	0.83	83
H ₃ BO ₃	6.2	620
MnSO ₄	22.3	2230
ZnSO ₄	8.6	860
NaMoO ₅ . 2H ₂ O	0.25	25
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.25	25
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0.25	25
Na ₂ EDTA . 2H ₂ O	37.2	3720
FeSO ₂ . 7H ₂ O	27.8	2780

Sacarosa	20000 mg/L
Agar-Agar ó Agar bacteriológico	10000 mg/L
pH	5.8

APENDICE 2

Secuenciaciones realizadas a los plásmidos FM2, FM3, FM5, FM6, pFM244b y pFM244b-aadA

La siguiente es la secuencia *psbA – trnH* del cloroplasto de *M. truncatula* (NC_003119) usada como región homóloga.

En letras azules se observa el sitio de restricción *NdeI* (CATATG) en el que se incorporó el sitio de clonación múltiple (MCS) de pBsKSII y en color los iniciadores diseñados para amplificar la región (FMG1 y FMG2) y para secuenciar la inserción del MCS y del gen *aadA* (FMG3).

 FMG1  FMG2  FMG3

GGAAACAATATTATTCTGGTGCCATTATTCTACTTCGGCGGCTATCGGTTTGCACCTTTACCCGATATGGGA
AGCTGCATCCGTTGATGAATGGTTATACAACGGCGGTCCTTATGAATAATTGTTCTACACTTCTACTTGGTG
TAGCTTGTTACATGGGTCGTGAGTGGGAAGTTAGTTTTCGTCTGGGTATGCGCCCTTGGATTGCTGTTGCATA
TTCAGCTCCTGTTGCAGCTGCTACTGCAGTTTTCTTGATCTACCCAATTGGTCAAGGAAGCTTTTCAGATGGTA
TGCCTCTAGGAATCTCCGGTACTTTCAACTTTATGATTGTATTTCAAGGCTGAGCATAATATTCTTATGCATCCAT
TTCACATGTTAGGTGTAGCTGGTGTATTCCGGCGGTTCCCTATTTAGTGCTATGCACGGTTCCTTGGTAACTTCT
AGTTTGATCAGGAAACCACAGAAAATGAATCTGCTAATGAAGGTTACAGATTCCGGTCAAGAGGAAGAAACCT
ATAATATTGTAGCTGCTCATGGTATTTTTGGCCGATTGATCTTCCAATATGCTAGTTTCAACAATTCTCGTTCTT
TACATTTCTTCTAGCTGCTTGGCCTGTAGTAGGTATCTGGTTTACCGCGTTAG**GTATCAGCACTATGGCTTTC**
AACTTAAATGGTTTCAACTTTAACCAATCCGTAGTTGATAGTCAAGGTCGTGTAATTAACACCTGGGCTGATAT
TATTAACCGTGCTAACCTTGGTATGGAAGTTATGCATGAACGTAATGCTCATAACTTCCCTCTAGACCTAGCTG
CGGTCGAGGCTCCATCTATAAATGGATAAGATTTTTGGTTTTCAAAAAGGATACGCGTTTTTGGAAAATAAAGGG
GTAAAGGAGTAATATCAACATTGTTGATATACTCCCCCTTTTACTTTTTGTTAGTAGCTTTTTCTGTATGCAAT
ACATATACAGAAATTAATCAATTATTTATTAAGTTCATTTAGCATTTTTCTTTATTTCAAAAAAAAAAATTTCAA
TTTTAATTTATACGTTTCTCTCATCAATCTTTTTGATCTTTTTGTAATA**CATATG**ACTTACAATGTAATAAAG
AAAAAAAAAGAAATGAATGGTTTCTTATTTTATAGTATTTTAGAAGACTCGTAAGAAGTCTAGAGAGAAAAAAT
AAATGATAAAGAAAAAGTATAAAAAGTTATGTAATTTAGACATAGTATAGGGCGGATGTAGCCAAGTGGATCAA
GGCAGTGGATTGTGAATCCACCATGCGCGGGTTCAATTCCCGTCATTCCGCCATGAATCTATTAATCTAGAG
AAAAAAGACAAAAATAATTTGAAATAGAATCTTTTAAAAACAAAAAGAGAAAAGAATTTATAATACTCCTGTTG
CAGCTGATACTGCTGTTTTCTTGATCTACCCGAAGCTTTAATTCTTAGCGGATAATCCCAATTTTGGTTGAATA
GTAGTACATTATTATCTCATTTTATTATATAAATATAGAATAACAAATAGTAAAAAGATTAATACAAAAAGAAA
ATATACGAAGAAATTCGTCACCCACATATTTGATAGCCTCTCTATAAAAAAACTGGAAATCCCAATTCC
ATTTGGAATTCATCAATACTTGTCTATCAAAAAATAATTGAATTTAGCTACCTTTCTTACACTCGCAATTA
GATACTTCAAAAAAGCATCTATATAACCACGATTATATGACCAATCATATATAACATTGATTATTTTATCAGCA
ATCATTTTTTAAAGAACACTTTTTTGAATAAATAAATAAGTTCAAATTTGTAAAGATGAAAAAACTGGTTTAT

AGAAAAAGACGCTATAAATATTCCGAAAAAGCTATACTCACCGAAAAAGTTGCATTTGTAAAAATTCATAC
CAATCCACAGAATTCTTTGAATTTTGATGTAAAAGGTCTATAGACGGAATTAACAATTTAGATAAAATATCCAAA
TCTATTGGTTCTTGGCTGAAAGAAATCCTATGGACCCGACGAAGAAAGTAAATAGTACTAATACAAGCATAGA
AAATAGCATAGTATTGTCTGATTCATGAGGATAAAAAACGGAATGTTTTAGTACCAAATAGGTACTATCAA
GAAAAAGACGTCTTATGCTTTTGACATTCGATTAATTCGATGGGAATATGTCCTTTCCGAAAAAAGAAGTC
CTTTCATTATTATTA **GTIGTTAATAAAGCTAATAAATG**

El sitio de clonación múltiple de pBsKSII es el siguiente. Remarcado se observa el iniciador T7 que puede emplearse para verificar la inserción del gen *aadA* en pFM244b.

ACGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTG
GATCCCCGGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCGAGGGGGGGCCCGGTACC
CAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCG

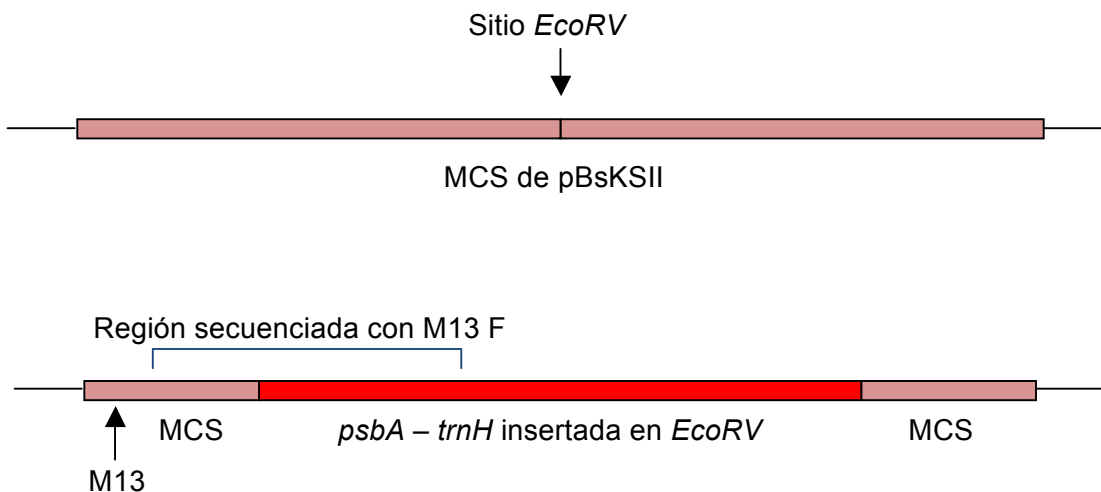
En pBsKSII, a los lados del MCS se encuentran sitios que corresponden a los iniciadores M13 F y M13 R, ambos fueron usados para evidenciar la presencia de *psbA – trnH* en pBsKSII a través de secuenciaciones, pero en este caso solo se reportan las secuenciaciones realizadas con M13 F para FM2, FM3, FM5 y FM6.

APENDICE 2

Plásmido FM2 secuenciado con M13 F (5' – GTTTTCCAGTCACGAC – 3')

Inicialmente se incorporó la región *psbA – trnH* en el MCS de pBsKSII. Remarcado en gris se observa el la sección del MCS que flanquea a *psbA – trnH*.

```
GCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGATTAGGCGCGCCGGAAACAATATTATTC
TGGTGCCATTATTCCACTTCTGCGGCTATCGGTTTGCACCTTTACCCGATATGGGAAGCTGCATCCGTTGAT
GAATGGNTATACAACGGTGGTCCTTATGAACTAATTGTTCTACACTTCTTACTTGGTGTAGCTTGTACATGGG
TCGTGAGTGGGAACCTTAGTTTTCGTCTGGGTATGCGCCCTGGATTGCTGTTGCATATTCAGCTCCTGTTGCA
GCTGCTACTGCAGTTTTCTTGATCTACCCAATTGGTCAAGGAAGCTTTTCAGATGGTATGCCTCTAGGAATCTC
TGGTACTTTCAACTTTATGATTGATTTTCAGGCTGAGCATAAATTTCTTATGCATCCATTTACATGTTAGGTGT
AGCTGGTGTATTCGGCGGTTCCCTATTTAGTGCTATGCACGGTTCCTTGGTAACTTCTAGTTTGATCAGGGAA
ACCACAGAAAATGAATCTGCTAATGAAGGTTACAGATTCCGTCAAGAGGAAGAAACCTATAATATTGTAGCGG
CTCATGGTTATTTTGGCCGATTGATCTTCCAATATGCTAGTTTCAACAATTCTCGTTCCTTACATTTCTTCCTAG
CTGCTTGGCCTGTAGTAGGTATCTGGTTTACCGCATTANGTATCAGCACTATGGCTTTCAACTTAAATGGNTT
CAATTTTAACCAATCAGTAGTTGATAGTCAAGGTCGTGTAATTAACACCTGGGCTGATATTATTAACCGTGCTA
ACCTTGGTATGGAAGTTATGCATGAACGTAATGNTCATAACTTCCCTCTAGACCTAGCTGCGGNCGAGGCTCC
```

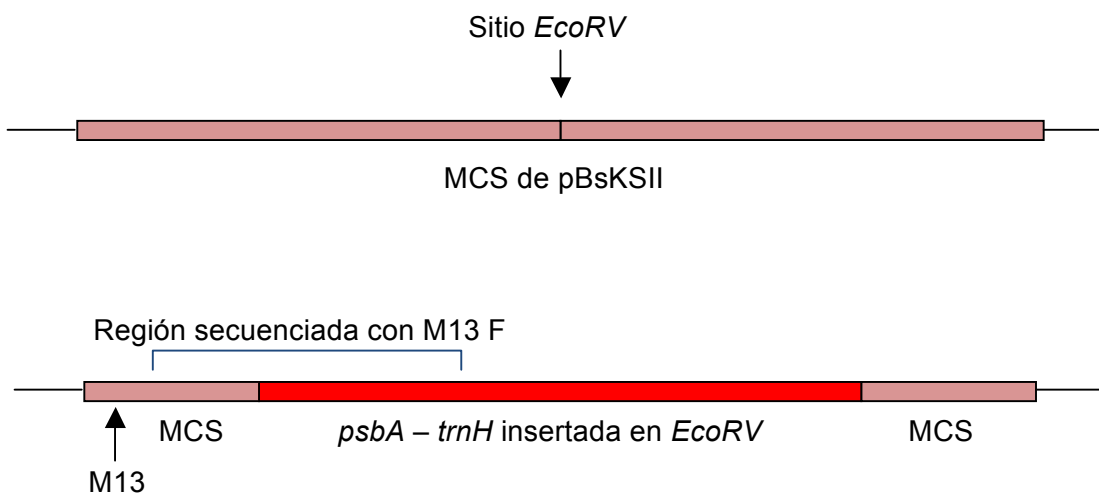


APENDICE 2

Plásmido FM3 secuenciado con M13 F (5' – GTTTTCCAGTCACGAC – 3')

Al igual que en FM2, se incorporó la región *psbA – trnH* en el MCS de pBsKSII. Remarcado en gris se observa el la sección del MCS que flanquea a *psbA – trnH*.

```
AACTAGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGATAGGGCGCGCCGAAACAATATTATTCTGGTGCCATTAT
TCCTACTTCTGCGGCTATCGGTTTGCACTTTACCCGATATGGGAAGCTGCATCCGTTGATGAATGGTTATAC
AACGGTGGTCCTTATGAACTAATTGTTCTACACTTCTACTTGGTGTAGCTTGTTACATGGGTCGTGAGTGGG
AACTTAGTTTTCGTCTGGGTATGCGCCCTTGATTGCTGTTGCATATTCAGCTCCTGTTGCAGCTGCTACTGC
AGTTTTCTTGATCTACCCAATTGGTCAAGGAAGCTTTTCAGATGGTATGCCTCTAGGAATCTCTGGTACTTTCA
ACTTTATGATTGTATTTTCAGGCTGAGCATAATATTCTTATGCATCCATTTACATGTTAGGTGTAGCTGGTGTAT
TCGGCGGTTCCCTATTTAGTGCTATGCACGGTTCCTTGGTAACTTCTAGTTTGATCAGGGAACACAGAAAA
TGAATCTGCTAATGAAGGTTACAGATTCGGTCAAGAGGAAGAAACCTATAATATTGTAGCGGCTCATGGTTATT
TTGGCCGATTGATCTTCCAATATGCTAGTTTCAACAATTCTCGTTCCTTACATTTCTTCTAGCTGCTTGGCCTG
TAGTAGGTATCTGGTTTACCGCATTANGTATCAGCACTATGGCTTTCAACTTAAATGGTTTCAATTTTAACCAA
TCAGTAGTTGATAGTCAAGGTCGTGTAATTAACACCTGGGCTGATATTATTAACCGTGCTAACCTTGGTATGGA
AGTTATGCATGAACGTAATGCTCATAACTCCCTCTAGACCTAGCTGCGGNCGANGCTCCATCTATAAATGGA
TAATATTTTGG
```

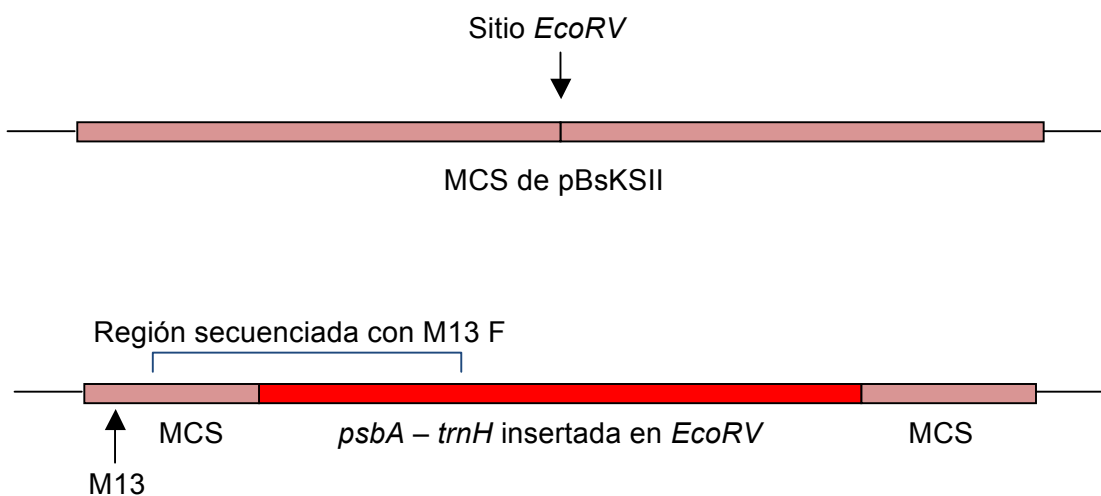


APENDICE 2

Plásmido FM5 secuenciado con M13 F (5' – GTTTTCCCAGTCACGAC – 3')

Se incorporó la región *psbA – trnH* en el MCS de pBsKSII. Remarcado en gris se observa el la sección del MCS que flanquea a *psbA – trnH*.

```
CGCTCTAGANCTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTCGATTAGGGCGCGCCGGAAACAATATTATTCTG
GTGCCATTATTCTACTTCTGCGGCTATCGGTTTGCACCTTTACCCGATATGGGAAGCTGCATCCGTTGATGA
ATGGTTATAACAACGGTGGTCCTTATGAACTAATTGTTCTACACTTCTTACTTGGNGTAGCTTGTTACATGGGTC
GTGAGTGGGAACCTTAGTTTTCGTCTGGGTATGCGCCCTTGGATTGCTGTTGCATATTCAGCTCCTGTTGCAGC
TGCTACTGCAGTTTTCTTGATCTACCCAATTGGTCAAGGAAGCTTTTCAGATGGTATGCCTCTAGGAATCTCTG
GTACTTTCAACTTTATGATTGTATTTCAAGGCTGAGCATAATATTCTTATGCATCCATTTACATGTTAGGTGTAG
CTGGTGATTTCGGCGGTTCCCTATTTAGTGCTATGCACGGTTCCTTGGTAACTTCTAGTTTGATCAGGGAAAC
CACAGAAAATGAATCTGCTAATGAAGGTTACAGATTCGGTCAAGAGGAAGAAACCTATAATATTGTANCGGCT
CATGGTTATTTTGGCCGATTGATCTTCCAATATGCTAGTTTCAACAATTCTCGTTCTTACATTTCTTCCTAGCT
GCTTGGCCTGTAGTAGGTATCTGGNTTACCGCATTANGTATCAGCACTATGGCTTTCAACTTAAATGGNTTCA
ATTTAACCAATCAGTAGTTGATAGTCAAGGTCGTGTAATTAACACCTGGGCTGATATTATTAACCGTGCTAAC
CTTGGTATGGAAGTTATGCATGAACGTAATGCTCATAACTTCCCTCTAGACCTAGCTGCGGNCGAGGCTCCAT
CTATAAATGGATAANATTTTGG
```

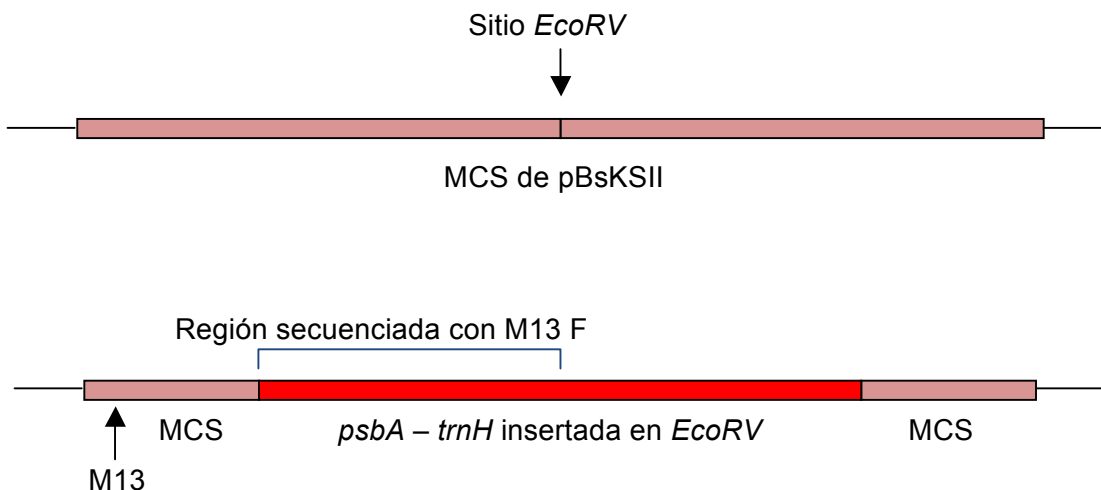


APENDICE 2

Plásmido FM6 secuenciado con M13 F (5' – GTTTTCCCAGTCACGAC – 3')

Al igual que en los anteriores plásmidos, la región *psbA – trnH* se incorporó en el MCS de pBsKSII. Remarcado en gris se observa el la sección del MCS que flanquea a *psbA – trnH*.

```
GTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGATACAATATTATTTCTGGTGCCATTATTCCTACTTCTGCGGCTATC
GGTTTGCACTTTTACCCGATATGGGAAGCTGCATCCGTTGATGAATGGTTATACAACGGTGGTCCTTATGAAC
TAATTGTTCTACACTTCTTACTTGGTGTAGCTTGTTACATGGGTCGTGAGTGGGAACCTANTTTTCGTCTGGGT
ATGCGCCCTTGGATTGCTGTTGCATATTCAGCTCCTGTTGCAGCTGCTACTGCAGTTTTCTTGATCTACCCAAT
TGGTCAAGGAAGCTTTTCAGATGGTATGCCTCTAGGAATCTCTGGTACTTTCAACTTTATGATTGATTTTCAGG
CTGAGCATAATATTCTTATGCATCCATTTACATGTTAGGTGTAGCTGGTGTATTTCGGCGGTTCCCTATTTAGT
GCTATGCACGGTTCCTTGGTAACTTCTAGTTTGATCAGGGAAACCACAGAAAATGAATCTGCTAATGAAGGTT
ACAGATTCGGTCAAGAGGAAGAAACCTATAATATTGTAGCGGCTCATGGTATTTTGGCCGATTGATCTTCCA
ATATGCTAGTTTTCAACAATTCTCGTTCCTTACATTTCTTCTAGCTGCTTGGCCTGTAGTAGGTATCTGGTTTAC
CGCATTAGGATCAGCACTATGGCTTTCAACTTAAATGGTTTCAATTTTAACCAATCAGTAGTTGATAGTCAAG
GTCGTGTAATTAACACCTGGGCTGATATTATTAACCGTGCTAACCTTGGTATGGAAGTTATGCATGAACGTAAT
GCTCATAACTTCCCTCTAGACCTAGCTGCGGTCGAGGCTCCATCTATAAATGGATAATATTTTGGTTTAAAAAA
ANNATACNAGTTTTTAAAAATAA
```

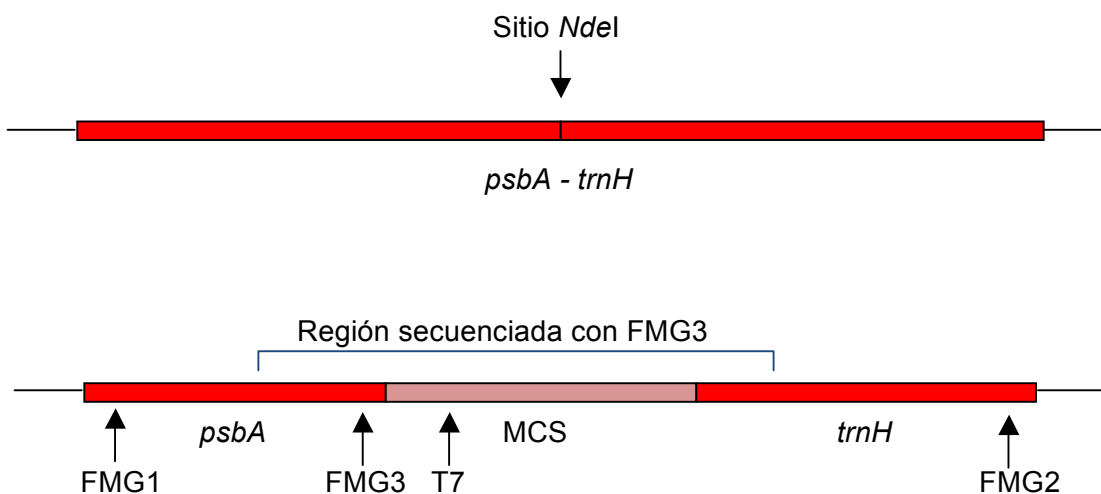


APENDICE 2

Plásmido pFM244b secuenciado con el iniciador FMG3 (5' – GTATCAGCACTATGGCTTTC – 3')

En este plásmido el MCS de pBsKSII que flanqueaba la secuencia homóloga ya ha sido eliminado y reinsertado en el sitio *NdeI* de *psbA – trnH*. En cursivas se anota el MCS.

ATAATGGTTTATTTTACCATCAGAGTCTACAGTCAAGGATCGTGTATTACACCTGTCCTGATATTATTAACCGT
 GCTAACCTTGGTATGGAAGTTATGCATGAACGTAATGCTCATAACTTCCCTCTAGACCTAGCTGCGGTCGAGG
 CTCCATCTATAAATGGATAATATTTTGGTTTAAAAAAGGATACGAGTTTTTGAAAATAAAGGGGTAAAGGAGT
 AATATCAACATTGTTGATATTACTCCCCCTTTACTTTTTGTTAGTAGTCTTTTTCTGTATAACAATACATATACAG
 AAATTCATCCATTATTTATTAAGTTATTAAGTTCATTTAGCATTTTTTCTTTATTTCAAAAAAATAAATTTGAAATT
 TTTAATTTATACGTTTCTCTCATCAATCTTTTTGATCTTTTTGTAATACATACGCGCGTAATACGACTCACTATAG
 GGCGAATTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAAGTAGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTGGA
 TATCAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCGAGGGGGGGCCCGGTACCCAGCTTTTGTCCCTTATAGTGAGGGT
 TAATTGCGCGATGACTTCACAATGTAATAAAGAAAAAAGAAATGAATGTTTTCTTATTTTCTAGG
 TATTTTAGAAGACTCGTAAGAACTTAGAAGAGAAAAATAAATGATAAAGAAAAGTCTAAAAGTTATGTAATTTA
 GACATAGTATAGGGCGGATGTAGCCAGTGGATCAAGGCAGGGAATTGTGAATCCCCATGGCCGGGTTCAATT
 CCCGTCATCCCCATGAATCTTTAAATCTAGATAAAAAAGACAAATATTTGATAGATCTTTAAACAAAAGGAA
 AAGAAAAAGAATTATATATCTCTGGTGCGCTGAACTGTGTTTCTTGATC

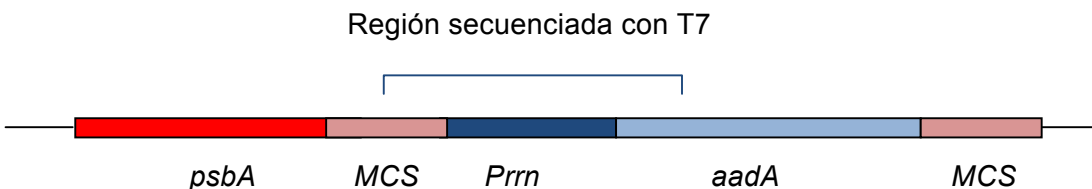
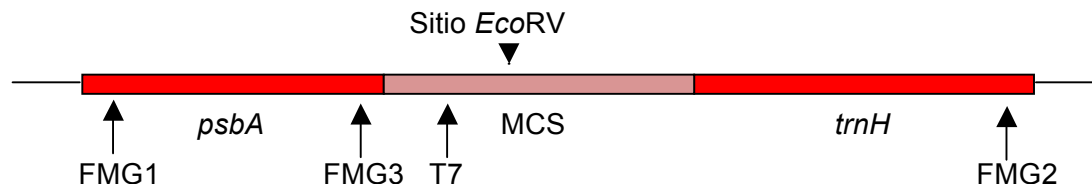


APENDICE 2

Plásmido pFM244b-aadA secuenciado con el iniciador T7 (5' – GTATCAGCACTATGGCTTTC – 3')

En negritas se observa la región correspondiente al promotor *Prn* del gen *aadA* (Svab y Maliga, 1993) insertado en el plásmido pFM244b, mientras que en cursivas una porción de *aadA*.

CGCGCCGAGCCCGGAAGTAGCTGCTGCTTGTGAAGTATGGAAAGAGATCGTATTTAATTTTGCAGCAGTGG
 ACGTTTTGGATAAGTAAAAACAGTAGACATTAGCAGATAAATTAGCAGGAAATAAAGAAGGATAAGGAGAAAG
 AACTCAAGTAATTATCCTTCGTTCTCTTAATTGAATTGCAATTAAGTTCGGCCCAATCTTTACTAAAAGGATTG
 AGCCGAATACAACAAAGATTCTATTGCATATATTTTACTAAGTATATACTTACCTAGATATACAAGATTTGAAA
 TACAAAATCTAGAAAATAAATCAAAAATCTAAGACTCAAATCTTTCTATTGTTGTCTTGGATCCCGAATTGGGAT
 CCGTACCCAAAGCTCCCCCGCGTCAATGAGAATGGATAAGAGGCTCGTGGGATTGACGTGAGGGG
GCAGGGATGGCTATATTTCTGGGAGCGAACTCCGGGCGAATACGAAGCGCTTGGATACAGTTGTAGGGAG
GGATTTATGGCAGAAGCGGTGATCGCCGAAGTATCGACTCAACTATCAGAGGTAGTTGGCGTCATCGAGCGC
 CATCTCGAACCGACGTTGCTGGCCGTACATTTGTACGGCTCCGCAGTGGATGGCGGCCTGAAGCCACACAG
 TGATATTGATTTGCTGGTTACGGTGACCGTAAGGCTTGATGAAACAACCGCGGCGAGCTTTGATCAACGACCTT
 TTGGAAACTTCGGCTTCCCCTGGAGAGAGCGAGATTCTCCGCGCTGTAGAAGTCACCATTGTTGTGCACGAC
 GACATCATTCCGTGGCGTTATCCAGCTAAGCGCGAACTGCAATTTGGAGAATGGCAGCGCAATGACATTCTT
 GCAGGT



APENDICE 3

Tablas de regeneración de tejidos de Alfalfa

Las diferentes concentraciones de auxina y citocinina se establecieron con base en el estudio de regeneración a partir de peciolo de Alfalfa de *M. sativa* L. realizado por Villegas en 1991.

Inducción de callo en peciolo

Tabla 7. Inducción de callo después de 30 días a partir de peciolo de las cuatro variedades de trabajo de Alfalfa.

Medio de cultivo		Porcentaje de formación de callo (%)				Crecimiento del callo			
[2,4-D] mg/L	[BAP] mg/L	<i>M. sativa</i>	Moapa	Cuf	<i>M. trunc.</i>	<i>M. sativa</i>	Moapa	Cuf	<i>M. trunc.</i>
0.0	0.0	0	0	0	0	F	F	F	F
0.5	0.0	-	100	100	100	-	A	A	A
1.0	0.0	100	100	100	100	A	A	A	A
1.5	0.0	100	100	100	100	A	A	A	A
0.0	0.1	0	0	0	-	F	F	F	-
0.0	0.2	0	0	0	0	F	F	F	F
0.0	0.4	0	0	0	0	F	F	F	F
0.5	0.1	100	100	100	100	B	B	B	A
0.5	0.2	100	100	100	100	B	B	B	A
0.5	0.4	100	100	100	100	B	B	B	A
1.0	0.1	100	100	100	100	B	B	B	B
1.0	0.2	100	100	100	100	B	B	B	B
1.0	0.4	100	100	100	-	B	B	B	-
1.5	0.1	100	100	100	-	A	A	A	-
1.5	0.2	100	100	100	100	A	A	A	A
1.5	0.4	100	100	100	100	A	A	A	A

*Se sembraron 4 explantes de *M. truncatula* y 8 explantes de cada variedad restante de Alfalfa para cada variación en las concentraciones de auxinas y citosinas en el medio MS.

A. Callo pequeño/ **B.** Callo mediano/ **C.** Callo grande/ **D.** Embriogénesis somática indirecta / **E.** Embriogénesis somática directa / **F.** Tejido necrosado.

APENDICE 3

Inducción de callo en tallos

Tabla 8. Inducción de callo después de 30 días a partir de tallos de las cuatro variedades de trabajo de Alfalfa.

Medio de cultivo		Eficiencia en la formación de callo (%)				Crecimiento del callo			
[2,4-D] mg/L	[BAP] mg/L	<i>M. sativa</i>	Moapa	Cuf	<i>M. trunc.</i>	<i>M. sativa</i>	Moapa	Cuf	<i>M. trunc.</i>
0.0	0.0	0	0	0	0	F	F	F	F
0.5	0.0	100	100	100	100	A	A	A	A
1.0	0.0	100	100	100	100	A	A	A	A
1.5	0.0	50	50	50	100	A,F	A,E	A,E	A
0.0	0.1	50	0	0	0	A,F	F	F	F
0.0	0.2	0	0	0	0	F	F	F	F
0.0	0.4	0	0	50	0	F	F	A,E	F
0.5	0.1	100	100	100	100	B	B	B	A
0.5	0.2	100	100	100	100	B	B	B	A
0.5	0.4	100	100	100	100	B	B	B	B
1.0	0.1	100	100	100	100	B	B	B	B
1.0	0.2	100	100	100	100	B	B	B	B
1.0	0.4	100	100	100	100	B	B	B	B
1.5	0.1	100	100	100	100	A	A	A	A
1.5	0.2	100	100	100	100	A	A	A	A
1.5	0.4	100	100	100	-	A	A	A	-

*Se sembraron 4 explantes de *M. truncatula* y 8 explantes de cada variedad restante de Alfalfa para cada variación en las concentraciones de auxinas y citosinas en el medio MS.

A. Callo pequeño/ **B.** Callo mediano/ **C.** Callo grande/ **D.** Embriogénesis somática indirecta / **E.** Embriogénesis somática directa / **F.** Tejido necrosado.

APENDICE 3

Inducción de callo en hojas

Tabla 9. Inducción de callo después de 30 días a partir de hojas de las cuatro variedades de trabajo de Alfalfa.

Medio de cultivo		Eficiencia en la formación de callo (%)				Crecimiento del callo			
[2,4-D] mg/L	[BAP] mg/L	<i>M. sativa</i>	Moapa	Cuf	<i>M. trunc.</i>	<i>M. sativa</i>	Moapa	Cuf	<i>M. trunc.</i>
0.0	0.0	0	0	0	0	F	F	F	F
0.5	0.0	0	0	0	0	F	E,F	F	E
1.0	0.0	0	100	0	0	F	A	F	-
1.5	0.0	50	50	50	0	A,E	A,E	A,E	E
0.0	0.1	0	0	0	0	F	E,F	F	F
0.0	0.2	0	0	0	0	E	E	F	F
0.0	0.4	50	50	100	0	A	A,E	A,E	F
0.5	0.1	100	100	100	0	A	A	A	-
0.5	0.2	100	100	100	100	A	A	A	A
0.5	0.4	100	100	100	100	A	A	A	A
1.0	0.1	100	100	0	100	A	A	-	A
1.0	0.2	100	100	100	100	A	A	A	A
1.0	0.4	100	100	100	100	A	A	A	A
1.5	0.1	100	100	100	0	A	A	A	-
1.5	0.2	100	100	100	100	A	A	A	A
1.5	0.4	100	100	100	100	A	A	A	A

*Se sembraron 4 explantes de *M. truncatula* y 8 explantes de cada variedad restante de Alfalfa para cada variación en las concentraciones de auxinas y citosinas en el medio MS.

A. Callo pequeño/ **B.** Callo mediano/ **C.** Callo grande/ **D.** Embriogénesis somática indirecta / **E.** Embriogénesis somática directa / **F.** Tejido necrosado.

APENDICE 3

Inducción de callo en meristemos

Tabla 10. Inducción de callo después de 30 días a partir de meristemos de las cuatro variedades de trabajo de Alfalfa.

Medio de cultivo		Eficiencia en la formación de callo (%)				Crecimiento del callo			
[2,4-D] mg/L	[BAP] mg/L	<i>M. sativa</i>	Moapa	Cuf	<i>M. trunc.</i>	<i>M. sativa</i>	Moapa	Cuf	<i>M. trunc.</i>
0.0	0.0	0	0	0	0	F	F	F	F
0.5	0.0	50	100	100	100	B,F	B	B	B,E
1.0	0.0	0	50	50	0	E	B,E	B,E	E
1.5	0.0	0	50	0	100	E,F	B,E	E	B,E
0.0	0.1	0	0	0	-	E	E	E	-
0.0	0.2	0	0	0	0	E	E,F	E	F
0.0	0.4	0	0	0	0	F	F	E,F	F
0.5	0.1	100	100	100	100	C	C	C	B
0.5	0.2	100	100	100	100	C	C	C	B
0.5	0.4	100	100	100	100	C	C	C	B
1.0	0.1	100	100	100	100	C	C	C	B
1.0	0.2	100	100	100	100	C	C	C	B
1.0	0.4	100	100	100	100	C	C	C	B
1.5	0.1	100	100	100	100	C	C	C	B
1.5	0.2	100	100	100	100	C	C	C	B
1.5	0.4	100	100	100	100	C	C	C	B

*Se sembraron 3 explantes de *M. truncatula* y 6 explantes de cada variedad restante de Alfalfa para cada variación en las concentraciones de auxinas y citosinas en el medio MS.

A. Callo pequeño/ **B.** Callo mediano/ **C.** Callo grande/ **D.** Embriogénesis somática indirecta / **E.** Embriogénesis somática directa / **F.** Tejido necrosado.