

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL
CENTRO DE LA REPUBLICA (PROPAC)**

Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

“Manipulación de los contenidos de carotenoides mediante la expresión del gen β -licopeno ciclasa (*lcy-b*) en cloroplastos de plantas de tabaco y tomate”

Tesis

**que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestra en
Ciencia y Tecnología de Alimentos**

Presenta:

I.B.Q. Erika Camacho Beltrán

Director de tesis:

Dr. Octavio Paredes López

Santiago de Querétaro, Qro. Abril 2008.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL
CENTRO DE LA REPUBLICA (PROPAC)
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

MANIPULACIÓN DE LOS CONTENIDOS DE CAROTENOIDES MEDIANTE LA
EXPRESIÓN DEL GEN β -LICOPENO CICLASA (LCY-B) EN CLOROPLASTOS
DE PLANTAS DE TABACO Y TOMATE

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:
I.B.Q. ERIKA CAMACHO BELTRÁN

ASESOR:
DR. OCTAVIO PAREDES LÓPEZ

SINODALES:

<u>Dr. Octavio Paredes López</u> Presidente	_____
	Firma
<u>MC. Sugey Ramona Sinagawa García</u> Secretario	_____
	Firma
<u>Dr. Quintín Rascón Cruz</u> Vocal	_____
	Firma
<u>Dra. Maria Elena Valverde González</u> Suplente	_____
	Firma
<u>Dr. Carlos Regalado González</u> Suplente	_____
	Firma

Quim. Magaly Aguilar Ortiz
Director de la Facultad de Química

Dr. Luis G. Hernández Sandoval
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Santiago de Querétaro, Qro.
Abril 2008
México

Resumen

La transformación genética de cloroplastos ofrece ventajas con respecto a la transformación genética nuclear: altos niveles del transgen debido a la presencia de ~10,000 copias del genoma, organización de genes en operones, incorporación del transgen por recombinación homóloga en una zona precisa y conocida evitando efectos epigenéticos, presencia de transmisión uniparental lo que evita la posible dispersión del transgen vía polen y existencia de sistemas de eliminación del marcador de selección después de la transformación. Una de las principales rutas metabólicas en plantas es la biosíntesis de carotenoides, que son compuestos que actúan como agentes pigmentantes y nutracéuticos (por sus propiedades anticancerígenas y porque son precursores de vitamina A). En este trabajo se propuso la modificación de la ruta metabólica de los carotenoides mediante la expresión del gen de la β -licopeno ciclasa (*Lcy-b*) de *Tagetes erecta* en el genoma de cloroplastos de plantas de tabaco y tomate. La región codificante de la *Lcy-b* fue incorporada en el vector pHK30 y regulada por el promotor RNAr plastídico (*Prrn*) y una región 3'-no traducida de la subunidad β de la ATP sintasa (*atpB*) para una eficiente transcripción y estabilización de RNAm. El vector cuenta además con dos secuencias de recombinación homóloga *trnV* y *3'-rps12/7*, que flanquean los genes *Lcy-b* y *aadA*. Se establecieron las condiciones y se bombardearon explantes de *Nicotiana tabacum* y *Lycopersicon esculentum* con los DNA plasmídicos. En el caso de tomate se bombardearon 1600 explantes y se obtuvieron 30 brotes resistentes a espectinomicina; sin embargo, no fue posible regenerarlos. En tabaco se bombardearon 130 explantes que permitieron la regeneración de 20 plantas transformadas. El análisis Southern blot confirmó la integración de *Lcy-b* en el genoma plastídico de plantas de *Nicotiana tabacum*. Se confirmó la expresión del mensajero en cloroplasto mediante el análisis Northern blot, encontrando la presencia de dos transcritos correspondientes al RNAm monocistrónico que contenía el gen *Prrn* (0.9 kb) y el RNAm dicistrónico que contenía el gen *aadA* (2.0kb). El análisis de las plantas transplastómicas de *Nicotiana tabacum* mostró cambios en la composición de carotenoides, confirmando el fenotipo esperado.

Palabras clave: cloroplasto, transformación plastídica, biosíntesis de carotenoides.

Summary

Chloroplast genetic transformation offers advantages over nuclear genetic transformation: high transgen accumulation levels (~ 10, 000 genomic copies), genes are organized in operons, transgen integration by homologue recombination in a precise zone of the genome, avoiding epigenetic effects, uniparental transmission avoiding possible transgen dispersion through pollen, and existence of various systems capable of selecting markers elimination once transformation has taken place. In plants, one of the major metabolic pathways is carotenoids biosynthesis, they are important compounds that act as pigmenting agents and nutraceuticals (due to their anticarcinogenic properties and because they are vitamin A precursors). The aim of the present work was the modification of carotenoids pathway through the expression of the lycopene β -cyclase gene (*Lcy-b*) from *Tagetes erecta* in tobacco and tomato chloroplast genome. The coding region of lycopene β -cyclase was incorporated in pHK30 vector and regulated by a plastidic rRNA promoter (*Prrn*) and a 3'-untranslated of ATP synthase β -subunit (*atpB*), for an efficient transcription and stabilization of mRNA. Two homologue recombination sequences *trnV* and 3'-*rps12/7* flanking the *Lcy-b* and *aadA* (spectinomycin resistance), were also included in the transformation vector. Conditions were established and explants from *Nicotiana tabacum* and *Lycopersicon esculentum* were bombarded with plasmid DNA. 1600 tomato explants were bombarded, obtaining 30 spectinomycin resistant shoots, however it was not possible to regenerate these explants. For tobacco, 130 explants were bombarded, they were capable of regeneration, obtaining 20 transformed plants. Southern blot analysis confirmed *Lcy-b* stable integration in the plastidic genome of *Nicotiana tabacum* plants. Expression of messenger RNA was confirmed in chloroplast by Northern blot analysis, the presence of two transcripts corresponding to monocistronic mRNA, containing the *Prrn* gene (0.9 kb) and dicistronic mRNA containing the *aadA* gene (2.0 kb) was detected. The analysis of transplastomic plants of *Nicotiana tabacum* demonstrated changes in carotenoid composition, confirming the expected phenotypes.

Keywords: chloroplast, plastid transformation, carotenoid biosynthesis.



Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología de Alimentos en el Departamento de Biotecnología y Bioquímica del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato, bajo la dirección del Dr. Octavio Paredes López.

Dedicatorias

A Dios porque nunca me abandona y guía mi camino

A mis padres Eva Luz y Heriberto

A mis hermanos Chuy, Mana, Ricardo y Miguel

A mis cuñadas y comadres Thelma y Georgina

A mis sobrinitos preciosos Melisa, Sebastián, Valeria
y Esteban

A mi novio Pedrin

LOS AMO!!!

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para llevar a cabo mis estudios de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología del Estado de Guanajuato (CONCyTEG) por el apoyo recibido para finalizar la elaboración de este trabajo.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, por permitirme realizar mis estudios de Posgrado en esta institución.

Al CINVESTAV unidad Irapuato, por abrirme sus puertas para realizar mi tesis de maestría.

Al Dr. Octavio Paredes López, gracias por aceptarme en su grupo de investigación, por su apoyo como director de este trabajo, sugerencias, consejos y por haber confiado en mi.

A la MC. Sughey R. Sinagawa García, gracias por ser mi maestra, amiga y hermana, por todo su apoyo incondicional desde el primer día. Gracias por ser parte de mi comité de evaluación y por las aportaciones tan valiosas a lo largo de la realización de este proyecto.

A la Dra. María Elena Valverde González, por ser parte de mi comité de evaluación y por el apoyo brindado durante la realización de mi trabajo de tesis.

Al Dr. Quintín Rascón Cruz, por ser parte de mi comité de evaluación y por el apoyo brindado durante la realización de mi trabajo de tesis.

Al Dr. Carlos Regalado González, por aceptar ser parte de mi comité y por sus sugerencias en la revisión de este trabajo.

Al Dr. Andrés Cruz Hernández, gracias por su amistad, ánimo, sugerencias, consejos y constante apoyo durante la realización de este trabajo. Por enseñarme lo importante que es ayudar y compartir.

A la Quim. Yolanda Rodríguez Aza, por su valiosa orientación en el manejo del equipo de HPLC.

A la Dra. Karla K. Valenzuela Sánchez, por su amistad, ánimo, consejos y apoyo desde el primer día que llegue a Irapuato.

A las secretarias del DIPA: Carmelita, Laurita y Silvia por su agradable y valiosa ayuda.

A mis amigos de la universidad: Gely, Cristina, Giovanna, Maritza, Lourdes, Estefani, Maya, Fernando (padre de familia), Alfonso, Betty (Nayarit), Carmen, América, Silvia, Guillermo, Ingrid, Betty (gld), Yene, Jerónimo, Lorenzo y Omar gracias por su amistad y por los momentos que vivimos juntos.

A mis compañeros de laboratorio: Maribel (mama mary), Tanía, Janeth, Edith, Gládis, Dámaris, Sílvia, Santos.

A Talia, por proporcionarme el material de laboratorio solicitado.

A mis amigos: Ana, Claudia, Karen, Rocío (Estudiosus), Iván, Laura, Américo, Gina, Ariana, Joako, Cinthia, Horacio y Roger por tantos momentos inolvidables y divertidos.

A mis amigas Paola y Fátima, gracias Tomate y Cempa por su amistad, por todos esos momentos tan divertidos que vivimos juntas, nunca las olvidaré. Gracias por su apoyo, consejos y por estar conmigo en las buenas y en las malas. Las llevaré siempre en mi corazón. Somos la onda!!!

A mi amiga Mary, gracias hermanita colmillini por ser tan linda y dejarme ser parte de tu vida. Gracias por ser mi amiga y mi hermanita del alma. Te quiero mucho y siempre seremos la onda triplemente anidada!!!

A mi amigo y novio Pedrin, gracias por todo el amor, apoyo y comprensión. Le doy gracias a Dios por haberte conocido. Gracias por todo Amor!!

A mi familia, gracias por estar siempre apoyándome y animándome en todo momento.

A mi hermana Mana, gracias por todo tu apoyo, porque fuiste la persona que me animó y me apoyó desde el inicio de la maestría. Le doy gracias a Dios por darme una hermana tan buena y linda. Gracias!!

A mi padre, gracias por enseñarme a ser una mejor persona, por tu apoyo y amor.

A mi madre, gracias por todo el amor, cariño y apoyo que siempre me has dado. Gracias por tus bendiciones y por estar presente en todos los momentos de mi vida. Te Amo!!

A Dios por todas las bendiciones!!!

Índice

Página

Resumen	i
Summary	i
Dedicatorias	iii
Agradecimientos.....	iv
Índice.....	vii
Índice de cuadros	xii
Índice de figuras	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
A. CAROTENOIDES.....	3
1. Definición.....	3
2. Clasificación	3
3. Ruta de biosíntesis de los carotenoides	4
3.1. Formación de licopeno	4
3.2. Ciclación de licopeno	6
3.3. Formación de xantofilas.....	8
4. Función e importancia de los carotenoides	8
5. El papel de los carotenoides en la dieta	10
5.1. Actividad de provitamina A	10
5.2. Papel en la prevención de enfermedades	11
B. INGENIERÍA METABÓLICA DE CAROTENOIDES	12

1. Manipulación genética nuclear de la ruta metabólica de carotenoides en tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	14
C. INGENIERÍA DE CLOROPLASTOS	16
1. Genoma del cloroplasto	16
2. Transformación genética de plástidos	19
2.1. Método de transformación de cloroplastos	19
2.2. Integración del transgen al genoma del cloroplasto.....	21
2.3. Selección de plantas transplastómicas.....	23
3. Implementación de la tecnología en nuevos cultivos	26
4. Transformación plastídica en plantas de tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	29
5. Ventajas de la transformación genética de plástidos	30
III. JUSTIFICACIÓN	34
IV. OBJETIVOS.....	35
A. GENERAL	35
B. ESPECÍFICOS	35
V. METODOLOGÍA	36
A. MATERIALES.....	36
1. Cepas de <i>Escherichia coli</i>	36
2. Vectores de transformación para cloroplasto	36
3. Material vegetal	36
B. MÉTODOS	36
1. Caracterización molecular de los vectores de transformación	36
2. Establecimiento del cultivo <i>in Vitro</i> de tomate	39

3. Establecimiento del sistema de regeneración vía organogénesis	
indirecta en plantas de tomate.....	40
3.1. Inducción y mantenimiento del estado de callo	40
3.2. Producción de brotes, enraizamiento y aclimatación.....	40
4. Determinación de la sensibilidad de explantes de tomate a	
kanamicina y espectinomicina en relación con la capacidad de	
formación de brotes.....	42
5. Transformación de tabaco y tomate mediante biobalística	44
5.1. Preparación de micropartículas de oro	44
5.2. Preparación del material utilizado para el bombardeo.....	44
5.3. Metodología para el bombardeo de hojas de tabaco y tomate	45
5.3.1. Cobertura de partículas con el ADN	45
5.3.2. Preparación del material biológico.....	45
5.3.3. Bombardeo de las hojas de tabaco y tomate	45
5.4. Análisis histológico de explantes de tabaco y tomate	
bombardeados con el plasmido pBI426	46
5.5. Selección y regeneración de explantes transformados	46
6. Análisis molecular de las plantas transformadas.....	47
6.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	47
6.2. Análisis tipo Southern blot	49
6.2.1. Extracción de DNA vegetal.....	49
6.2.2. Digestión de la sonda homóloga y su purificación de geles	
de agarosa	50

6.2.3. Preparación de las muestras de DNA y electroforesis en geles de agarosa	51
6.2.4. Transferencia del DNA a membranas Nylon	51
6.2.5. Marcaje de sondas radioactivas	51
6.2.6. Hibridación y exposición	52
6.3. Análisis tipo Northern blot.....	52
6.3.1. Extracción de RNA	52
6.3.2. Digestión de la sonda homóloga y su purificación de geles de agarosa	53
6.3.3. Preparación del gel desnaturizante	54
6.3.4. Preparación de las muestras de RNA y electroforesis en geles desnaturizantes.....	54
6.3.5. Hibridación y exposición	55
7. Análisis del contenido de carotenoides en hojas de tabaco transplastómico	56
7.1. Extracción de clorofilas.....	57
7.1.1. Determinación de clorofilas	57
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
A. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS VECTORES DE TRANSFORMACIÓN	59
B. ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE <i>LYCOPERSICON</i> <i>ESCULENTUM</i>	61

C. ESTABLECIMIENTO DEL SISTEMA DE REGENERACIÓN VÍA ORGANOGÉNESIS INDIRECTA EN PLANTAS DE <i>LYCOPERSICON ESCULENTUM</i>	63
1. Inducción y mantenimiento del estado de callo	63
2. Producción de brotes, enraizamiento y aclimatación	65
D. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE EXPLANTES DE TOMATE A KANAMICINA Y ESPECTINOMICINA EN RELACIÓN CON LA CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE BROTE	65
E. TRANSFORMACIÓN DE EXPLANTES DE TABACO Y TOMATE MEDIANTE BIOBALÍSTICA	68
1. Análisis histológico de explantes de tomate y tabaco con el plásmido pBI426	74
2. Selección y regeneración de explantes transformados de tomate y tabaco.....	76
F. ANÁLISIS MOLECULAR DE LAS PLANTAS TRANSFORMADAS	80
1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	80
2. Análisis tipo Southern blot.....	82
3. Análisis tipo Northern blot.....	85
G. ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE CAROTENOIDES EN HOJAS DE TABACO TRANSPLASTÓMICO	87
VII. CONCLUSIONES	92
VIII. LITERATURA CITADA.....	94
IX. APÉNDICE.....	105

Índice de cuadros

Cuadro	Página
1. Implementación de transformación de plástidos en especies de plantas superiores	27
2. Comparación de los sistemas de transformación nuclear y plastídica	31
3. Plásmidos utilizados en ensayos de transformación mediante biobalística.....	38
4. Evaluación del efecto de auxinas (NAA o IAA) y citocininas (BAP o Zeatina) en diferentes medios utilizados en el mantenimiento del estado de callo en la etapa de selección de las plantas de <i>Lycopersicon esculentum</i>	41
5. Tratamiento para la evaluación de la sensibilidad de explantes de tomate a kanamicina y espectinomicina.	43
6. Componentes para la mezcla de reacción para PCR.....	48
7. Programa para la amplificación de fragmentos por PCR.....	48
8. Contenido de carotenoides en hojas de tabaco sin transformar y transplastómicas ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco).....	91

Índice de figuras

Figura	Página
1. Etapas iniciales de la ruta de biosíntesis de carotenoides.....	5
2. Ruta de biosíntesis de licopeno.....	7
3. Ruta de biosíntesis de xantofilas en plantas.....	9
4. Cambios en los niveles de licopeno y β -caroteno en frutos maduros de tomate.....	15
5. Proplástidos que dan origen a diferentes tipos de plástidos.....	18
6. Transformación de cloroplastos mediante biobalística e integración del transgén por recombinación homóloga.....	22
7. Etapas de selección para una planta transplastómica.....	25
8. Representación del plásmido pHK β utilizado en los ensayos de transformación de cloroplasto mediante biobalística.....	37
9. Representación del plásmido pBI426 utilizado en los ensayos de transformación nuclear mediante biobalística.....	37
10. Caracterización molecular de los vectores pHK β y pBI426 con enzimas de restricción.....	60
11. Establecimiento del cultivo <i>in vitro</i> de <i>Lycopersicon esculentum</i>	62
12. Respuesta a la inducción del estado de callo en tejidos de hoja de <i>Lycopersicon esculentum</i>	64

13. Regeneración completa de <i>Lycopersicon esculentum</i> vía organogénesis indirecta a partir de segmentos de hoja.	66
14. Sensibilidad de explantes de tomate al antibiotico kanamicina y espectinomicina en relación con la capacidad de formación de brote.	67
15. Sensibilidad de explantes de <i>Lycopersicon esculentum</i> al antibiótico kanamicina.	69
16. Sensibilidad de explantes de <i>Lycopersicon esculentum</i> al antibiótico espectinomicina.	70
17. Esquema de la transformación de cloroplasto en plantas de tomate.	71
18. Esquema de la transformación de cloroplasto en plantas de tabaco.	72
19. Expresión del gen gus en explantes de tomate y tabaco.	75
20. Selección y regeneración de clonas transplastómicas.	77
21. Formación de callos de tomate en medio RMOP seleccionados con espectinomicina (500 mg/L).	79
22. Fenotipos de plantas de tabaco.	79
23. Amplificación del fragmento de 700 pb del gen <i>Lcy-b</i> en plantas de tabaco transplastómicas.	81
24. Mapa parcial del genoma plastidico sin transformar como blanco para el vector pHK β	83
25. Análisis tipo Southern blot de líneas transplastómicas de tabaco.	84
26. Acumulación del RNAm del gen <i>Lcy-b</i> en plastidos de plantas de tabaco.	86

27. Perfil cromatográfico de estándares por HPLC en la columna Symmetry C18.....	88
28. Cromatograma de la separación de carotenoides en tabaco por HPLC en la columna Symmetry C18.	89

I. INTRODUCCIÓN

Los carotenoides son pigmentos liposolubles que aportan coloración (rojo, anaranjado y amarillo) a flores y frutos en diferentes etapas de desarrollo de las plantas; sin embargo, el color es enmascarado por la clorofila en tejido vegetativo (Bartley y Scolnik, 1995). Los carotenoides son de los compuestos naturales más diversos, juegan un papel fundamental en la nutrición humana como antioxidantes y precursores de la vitamina A; su consumo está cada vez más asociado con la protección contra una gran gama de enfermedades. También se utilizan comercialmente como colorantes (pigmentos) en cosméticos, en la industria de la alimentación humana y animal. Por otro lado, protegen a las plantas contra el estrés fotooxidativo (Giuliano y col., 2008). Han adquirido gran importancia por lo que se ha estudiado la bioquímica de las rutas metabólicas y muchos de los genes que participan han sido clonados en diferentes organismos como: algas, bacterias, hongos y plantas superiores (Sandmann, 2001; Lee y col., 2002). Esto ha permitido la manipulación de las rutas biosintéticas mediante la ingeniería metabólica, por lo que muchos de los genes carotenogénicos han sido expresados en bacterias y plantas superiores, (Ye y col., 2000; Sandmann, 2001; Dharmapuri y col., 2002; Lee y col., 2002; Naik y col., 2003).

La biotecnología ha sido usada por años en la manipulación de muchos compuestos de interés para mejorar la calidad nutrimental de los alimentos, mejorar características agronómicas y aumentar el valor agregado a los cultivos (Belzile, 2002). Desde la década pasada, se ha venido manipulando el genoma de organelos que presentan su propia constitución genética, como las mitocondrias y

los plástidos (Johnston y col., 1988; Svab y col.,1990; Daniell y col., 1990; Bock, 2001; Maliga, 2003). Recientemente, la manipulación del genoma de los plástidos ha tomado gran interés porque se pueden expresar altos niveles de proteínas recombinantes como vacunas y proteínas de interés terapéutico (Staub y col., 2000; Tregoning y col., 2004) y porque presentan una gran variedad de ventajas con respecto a la manipulación del genoma nuclear, incluyendo aspectos de bioseguridad (Ruf y col., 2001; Belzile, 2002; Maliga, 2003).

Debido a la importancia de los carotenoides como agentes nutracéuticos y a la gran relevancia que ha tomado la manipulación del genoma de plástidos para la expresión de proteínas de interés farmacéutico (vacunas y proteínas terapéuticas humanas) en este trabajo nos propusimos manipular la ruta de biosíntesis de los carotenoides mediante la expresión del gen de la β -licopeno ciclasa de *Tagetes erecta* en el genoma de cloroplastos de plantas de tabaco y tomate.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

A. CAROTENOIDES

1. Definición

El nombre genérico de los carotenoides deriva de la zanahoria, *Daucus carota*, ya que fue de esta hortaliza de donde se aislaron por primera vez (Badui, 1993). Los carotenoides son compuestos de cadenas hidrocarbonadas de 40 átomos de carbono que se forman por la condensación de ocho unidades de isopreno y pueden ser lineales o tener ciclos en uno o en los dos extremos de la molécula (Fraser y Bramley, 2004). La característica estructural más importante de los carotenoides es que tienen de 3 a 15 dobles enlaces conjugados, responsables de las características de absorción y coloración que presentan.

2. Clasificación

Los carotenoides son clasificados por su estructura química como: (1) carotenos, constituidos por carbono e hidrógeno y (2) oxicarotenoides o xantofilas que tienen carbono, hidrógeno y oxígeno.

También han sido clasificados como primarios o secundarios. Los primeros son necesarios en las funciones fotosintéticas de las plantas (β -caroteno, violaxantina y neoxantina), mientras que los secundarios son los que se presentan en frutos y flores (α -caroteno, β -criptoxantina, zeaxantina, anteraxantina, capsantina, capsorubina) (Delgado-Vargas y col., 2000).

3. Ruta de biosíntesis de los carotenoides

En las plantas los carotenoides se sintetizan y localizan en los plástidos. Su biosíntesis está ligada a la síntesis de otros isoprenoides como, giberelinas, tocoferoles y plastoquinonas. Estos compuestos se sintetizan a partir del isopentenil pirofosfato (IPP) y del dimetilalilpirofosfato (DMAPP) y son de cinco átomos de carbono. El IPP se sintetiza por la ruta del ácido mevalónico (MVA) a partir del acetil-CoA (Figura 1); sin embargo, recientemente se reportó que la vía del ácido mevalónico no es la única para la formación del IPP. Se ha establecido una ruta alternativa para la síntesis de los isoprenoides, la ruta independiente del MVA o también llamada ruta alterna de 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato (DOXP) que realiza la biosíntesis de compuestos como carotenoides, plastoquinonas, isopreno, mono y diterpenos. Se ha confirmado que el isopreno utilizado para la biosíntesis de carotenoides en plástidos se forma mediante la ruta denominada DOXP (Logan y col., 2000); sin embargo, se ha demostrado que ciertos isoprenoides como esteroides, sesquiterpenos, triterpenos se forman particularmente a partir de la ruta del MVA.

3.1. Formación de licopeno

El isopentenil difosfato (IPP) y el dimetilalil difosfato (DMAPP) son isómeros interconvertibles activos en la ruta de biosíntesis de los isoprenoides. Como punto inicial de la síntesis (Figura 2) se lleva a cabo la condensación del DMAPP con el IPP para formar una molécula de 10 átomos de carbono, geranil pirofosfato (GPP); la adición de una segunda molécula de IPP genera farnesil difosfato (FPP) de 15

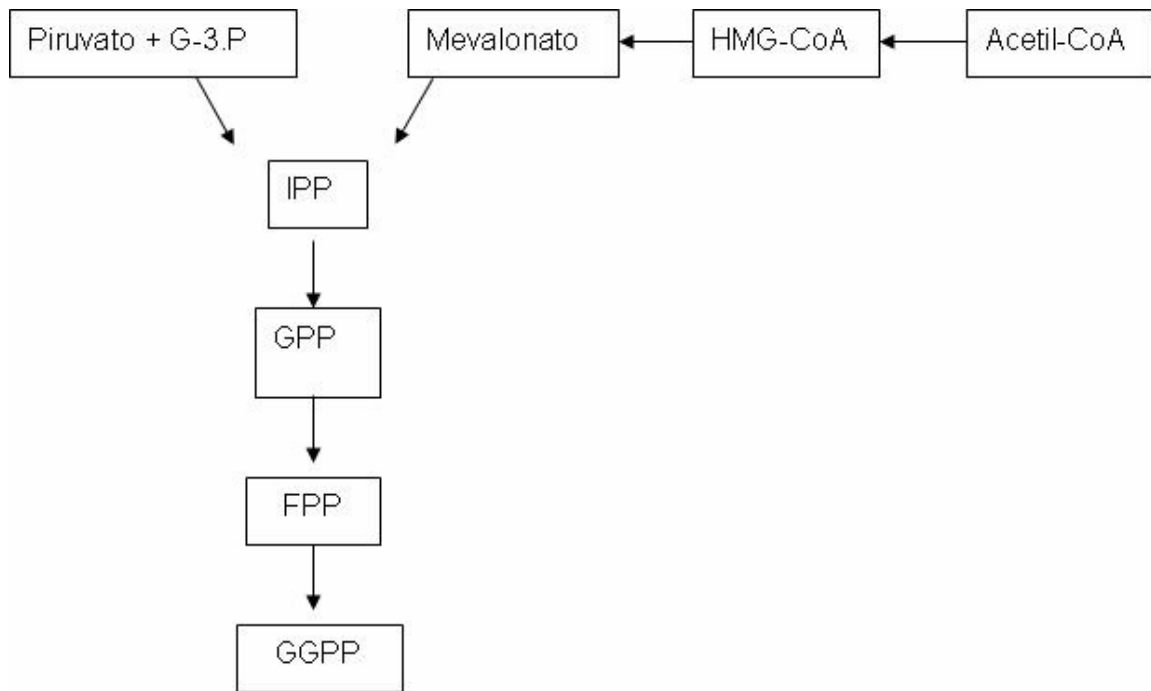


Figura 1. Etapas iniciales de la ruta de biosíntesis de carotenoides. G-3-P: Gliceraldehído-3-fosfato. HMG-CoA: Hidroximetil glutaril coenzima A. IPP: Isopentenil pirofosfato. GPP: Geranio pirofosfato. FPP: Farnesil pirofosfato. GGPP: Geranilgeranil pirofosfato.

átomos de carbono. Posteriormente la incorporación de otra molécula de IPP produce el geranylgeranyl pirofosfato (GGPP). Todas estas reacciones de condensación están catalizadas por un grupo de enzimas denominadas preniltransferasas (Fraser y col., 2002).

El primer paso en la biosíntesis de carotenoides es la condensación de dos moléculas de GGPP involucrando los grupos fosfato para producir fitoeno, carotenoide incoloro; esta reacción está catalizada por la fitoeno sintasa (Figura 2). Posteriormente se realiza la síntesis de carotenoides con color por medio de cuatro subsecuentes desaturaciones del fitoeno. Las dos primeras las cataliza la enzima fitoeno desaturasa (PDS) y se forma fitoflueno y ζ -caroteno, después la enzima ζ -caroteno desaturasa cataliza las dos siguientes etapas de desaturación del ζ -caroteno a neurosporeno y posteriormente a licopeno. Cada reacción de desaturación sirve para aumentar la serie de dobles enlaces conjugados que constituye la región cromófora de los carotenoides, la cual confiere la característica de impartir color (Cunningham y col., 1998).

3.2. Ciclación de licopeno

La ciclación del licopeno se ha planteado como punto de regulación importante en la ruta de biosíntesis de los carotenoides. La ciclación en ambas partes terminales de la cadena del licopeno da como resultado α o β -caroteno, esta reacción es catalizada por dos enzimas diferentes denominadas β o ϵ -licopeno ciclasa (Figura 3); *lcy-b* y *lcy-e*, respectivamente (Bartley y Scolnik, 1995).

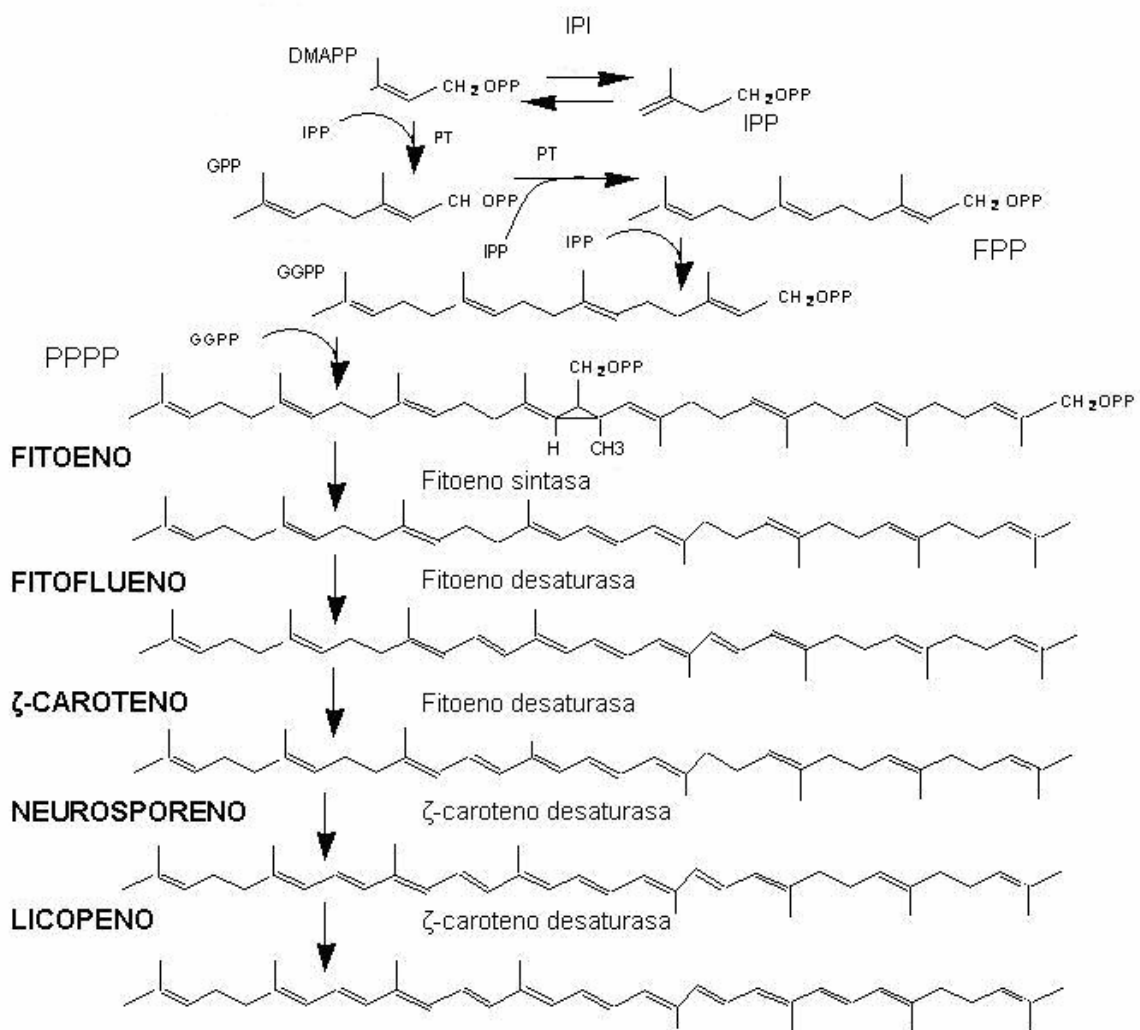


Figura 2. Ruta de biosíntesis de licopeno. DMAPP: dimetilalil pirofosfato, IPI: isopentenil pirofosfato isomerasa, IPP: isopentenil pirofosfato, PT: prenil transferasa, GPP: geranil pirofosfato, FPP: farnesil pirofosfato, GGPP: geranilgeranil pirofosfato, PPPP: prefitoeno pirofosfato. Fuente Beyer y col., 2002.

3.3. Formación de xantofilas

En las plantas superiores las xantofilas se forman enzimáticamente por los productos de oxidación de α y β -caroteno. Estos compuestos se derivan de los carotenos que tienen grupos funcionales; las modificaciones estructurales ocurren en la parte final de la molécula. La hidroxilación de las posiciones 3 y 3' de los anillos de α y β -caroteno forman la luteína y la zeaxantina, respectivamente (Figura 3). La introducción de grupos hidroxilo dentro de los anillos β está catalizada por hidroxilasas (Cunningham y col., 1998). Por último, el ciclo de las xantofilas se lleva mediante la epoxidación de la zeaxantina para formar violaxantina por la vía anteraxantina y la desepoxidación de la violaxantina para generar zeaxantina (Figura 3) (Cunningham y col., 1998).

4. Función e importancia de los carotenoides

Los carotenoides participan en procesos importantes en las frutas, flores y raíces de las plantas; por ejemplo facilitan la polinización y la dispersión de las semillas, intervienen en la fotosíntesis como pigmentos accesorios en la captura de la luz y como agentes protectores contra el exceso de luz (Ronen y col., 1999; Bramley, 2002). En las membranas fotosintéticas de cualquier planta generalmente existen cinco o seis carotenoides diferentes que se unen a la clorofila y a proteínas para formar complejos específicos denominados fotosistema I (PSI) y fotosistema II (PSII). El principal carotenoide en el PSI es el β -caroteno mientras que en el PSII son las xantofilas (principalmente la luteína) (Britton, 1995; Armstrong y Hearst, 1996).

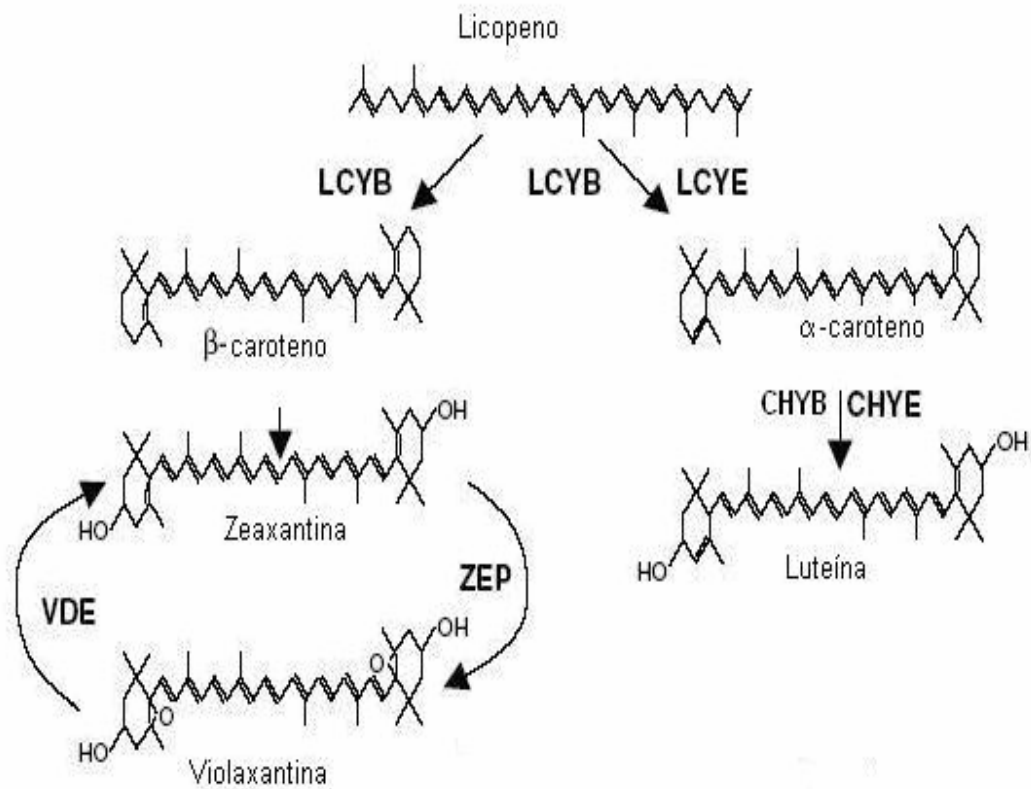


Figura 3. Ruta de biosíntesis de xantofilas en plantas. LCYB: β -licopeno ciclasa, LCYE: ϵ -licopeno ciclasa, CHYB: β -hidroxilasa, CHYE: ϵ -hidroxilasa, VDE: violaxantina desepoxidasa, ZEP: zeaxantina epoxidasa.

Los carotenoides son compuestos importantes en la dieta de los humanos y animales porque presentan una amplia gama de funciones: por ejemplo son precursores de la vitamina A, ayudan a prevenir ciertos tipos de cáncer e inducen una respuesta inmune, contribuyen en la prevención de enfermedades cardiovasculares; por lo que son comúnmente llamados “alimentos funcionales” o nutraceuticos (Fraser y col., 2002; Del Villar-Martínez, 2003).

La demanda y el mercado de los carotenoides han cambiado drásticamente en los últimos años debido a las diversas propiedades que se le han atribuido como agentes nutraceuticos. Además exhiben significativa actividad anticancerígena, prevención de enfermedades crónicas (Lee y col., 2002) y potencial antioxidante (Amitabha y col., 2007). Recientemente el mercado de los carotenoides se ha incrementado, proyectándose para el año 2010 una demanda de más de un billón de dólares (Del Campo y col., 2007).

5. El papel de los carotenoides en la dieta

5.1. Actividad de provitamina A

Se ha estimado que 124 millones de niños en el mundo presentan deficiencia de vitamina A. La UNICEF afirma que mejorando la calidad y cantidad de vitamina A en los alimentos se podrían prevenir de 1-2 millones de muertes anuales de niños entre uno y cuatro años de edad (Naik y col., 2003).

La actividad de provitamina A es una de las principales funciones de los α -caroteno, β -caroteno y β -criptoxantina (Voutilainen y col., 2006). Son procesados en el organismo por una enzima de tipo monooxigenasa y se convierten en retinol

(Kiefer y col., 2001). La vitamina A (retinol) es tóxica cuando es ingerida en cantidades excesivas; sin embargo, el β -caroteno parece estar desprovisto de toxicidad. El consumo en dosis elevadas da una coloración amarillo-anaranjada a la piel (carotenodermia), es totalmente benigno y reversible (Glasziou y Mackerras, 1996). Por lo contrario la deficiencia de Vitamina A produce xeroftalmía (Römer y col., 2000). Las cataratas y degeneración macular son problemas comunes, mundialmente conocidos y hay evidencias de que una dieta rica en carotenoides reduce su incidencia, probablemente secuestrando las especies activas de oxígeno.

La recomendación dietética en Estados Unidos de vitamina A es de 300 μg equivalentes de retinol por día para niños de 1 a 3 años de edad y 800 μg por día para adultos (Instituto de Medicina de la academia nacional; <http://www.iom.edu/Object.File/Master/7/296/0.pdf>) (Giuliano y col., 2008).

5.2. Papel en la prevención de enfermedades

La primera correlación entre la ingesta de carotenoides y beneficios en la salud apareció en la literatura en los años 70s. El consumo de frutas y vegetales confiere protección contra enfermedades debido a las propiedades antioxidantes que presentan los carotenoides (Persson y col., 2008). Recientemente las investigaciones se han enfocado al estudio individual de cada uno de los carotenoides en la dieta, especialmente β -caroteno, licopeno, luteína y zeaxantina, enfocándose principalmente en sus efectos como antioxidantes biológicos y como reguladores del sistema inmune.

El licopeno es uno de los principales carotenoides en la dieta de norteamericanos y europeos. Sin duda es el que más ha llamado la atención porque se ha relacionado con la prevención de enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer (Paredes López y col., 1999).

La ingesta de licopeno está inversamente asociada al riesgo de muchos tipos de cáncer. Estudios *in vitro* e *in vivo* demostraron que el licopeno posee un efecto antitumoral, recomendándolo de manera preventiva y terapéutica. Recientemente se han iniciado ensayos clínicos con licopeno y hasta el momento los datos disponibles imposibilitan conclusiones firmes con respecto al uso en la prevención y tratamiento de cáncer; sin embargo, se han autorizado ensayos clínicos en pacientes con cáncer tratados con licopeno (Seren y col., 2008).

B. INGENIERÍA METABÓLICA DE CAROTENOIDES

Recientemente la ingeniería metabólica ha jugado un papel fundamental en el desarrollo de productos de calidad alimentaria, farmacéutica y nutracéutica, (Lessard y col., 2002). Además de la modificación de la fisiología de las plantas, se pretende utilizar a las plantas como fábricas de bajo costo de producción de proteínas y vacunas con alto valor farmacéutico (Lessard y col., 2002; Ma y col., 2003; Sala y col., 2003; Tregoning y col., 2004).

La disponibilidad de un gran número de genes carotenogénicos y los eficientes métodos de transformación han permitido que las vías metabólicas de los carotenoides se modifiquen genéticamente en varias especies de plantas (Naik y col., 2003). Existen diferentes reportes que muestran la manipulación de la ruta

biosintética de los carotenoides para mejorar la calidad nutricional y nutracéutica, incrementando la concentración de carotenoides como el β -caroteno, la astaxantina y las xantofilas, entre otros. Por ejemplo, para incrementar el contenido de vitamina A (β -caroteno) Ye y col. (2000). Modificaron la ruta biosintética de carotenoides en endospermo de arroz. Expresaron los cDNAs que codifican para la fitoeno sintasa (psy) y β -licopeno ciclasa (lcy-b) de *Narcissus pseudonarcissus* bajo el control del promotor específico a endospermo de glutelinas de arroz, y el gen bacteriano que codifica para la fitoeno desaturasa de *Erwinia uredovora* bajo el promotor constitutivo 35S. Esta co-transformación permitió obtener diversos patrones fenotípicos y el contenido máximo de β -caroteno en el endospermo de arroz fue de 1.6 μ g por gramo de peso seco. Por otro lado, Mann y col. (2000) llevaron a cabo la transformación de plantas de tabaco con el gen de β -caroteno cetolasa bajo el control del promotor del gen de la fitoeno desaturasa de plantas de tomate. Con esta transformación no se detectó la formación de ceto-carotenoides en hojas de tabaco, esto probablemente se debió a la baja actividad del promotor de la fitoeno desaturasa en este tejido. En las flores se observó alto nivel de expresión con cambio de coloración roja especialmente por la astaxantina y otros ceto-carotenoides. Además los niveles de carotenoides totales se incrementaron a 140% comparado con plantas silvestres.

Existe gran interés comercial en la producción de carotenoides naturales para la nutrición humana, así como para la producción de antioxidantes y colorantes naturales, evitando con esto último la síntesis química de pigmentos artificiales (Bramley, 2002; Delgado-Vargas y Paredes-López, 2003). Otra de las ventajas

que se genera con la manipulación de la ruta de biosíntesis de los carotenoides es que facilita el entendimiento de los mecanismos regulatorios que controlan la carotenogénesis (Bramley, 2002).

1. Manipulación genética nuclear de la ruta metabólica de carotenoides en tomate (*Lycopersicon esculentum*)

Varias especies de plantas han sido modificadas genéticamente manipulando la ruta biosintética de carotenoides, como canola (Shewmaker y col., 1999), arroz (Ye y col., 2000) y tomate. En tomate existen varios reportes que han modificado los niveles de carotenoides en fruto (Figura 4). El primer enfoque fue la expresión constitutiva de la enzima fitoeno sintasa (Fraser y col., 1994), aunque se observó un incremento del contenido de carotenoides provocó cambios secundarios negativos en la fisiología de las plantas, por ejemplo enanismo. Para evitar este fenotipo, Fraser y col., en el 2002 utilizaron la misma enzima bajo el promotor de la poligalacturonasa con una secuencia dirigida a cromoplasto y lograron incrementar hasta 4 veces el contenido de carotenoides en frutos sin efectos secundarios aparentes.

Rosati y col. (2000) modificaron los niveles de β -caroteno en los frutos de tomate con el promotor del gen que codifica para la enzima fitoeno desaturasa fusionado al gen que codifica para la β -ciclase de *Arabidopsis*. Se diseñaron dos construcciones, una para sobreexpresar *lcy-b* (OE) y otra en antisentido (AS). Al analizar las transformantes se observó que las plantas que sobreexpresaron (OE) presentaron un incremento en el contenido de β -caroteno y un decremento en el

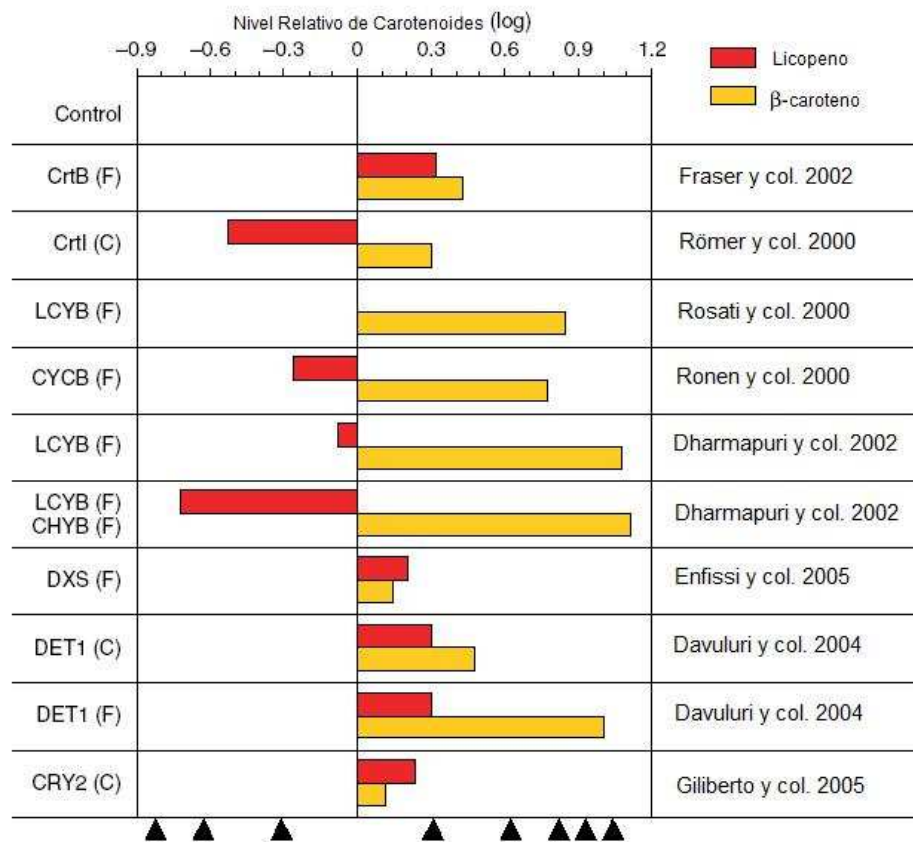


Figura 4. Cambios en los niveles de licopeno y β -caroteno en frutos maduros de tomate. Datos obtenidos de plantas de tomate transformado con las construcciones para sobreexpresión constitutiva (C) o dirigida al fruto (F) de las enzimas que se indican a la izquierda (referencias del lado derecho). Las flechas indican los valores logarítmicos que corresponden a 2 -, 4 -, a 6 -, 8 - veces los cambios.

contenido de licopeno, mientras en las plantas transformadas con el gen en antisentido AS presentaron un incremento en el contenido de licopeno.

Römer y col. (2000) incrementaron los contenidos de carotenoides en tomate transformado con el gen bacteriano (*crtl*) que codifica para la enzima fitoeno desaturasa que convierte fitoeno en licopeno. La expresión de este gen en tomate transgénico no incrementó los niveles totales de carotenoides; sin embargo, el contenido de β -caroteno incrementó en un 45% del total del contenido de carotenoides.

Los frutos de tomate acumulan cantidades significantes de licopeno y muy pocas cantidades de xantofilas (carotenoides oxigenados). Dharmapuri y col. (2002) sobrepresaron el gen que codifica para la β -licopeno ciclasa (*lcy-b*) y el gen de la β -caroteno hidroxilasa (*Chy-b*), observaron que los frutos transformados mostraron un significativo incremento de β -caroteno, β -criptoxantina y zeaxantina, y la composición de carotenoides no se vio alterada.

C. INGENIERÍA DE CLOROPLASTOS

1. Genoma del cloroplasto

En los plástidos de las células vegetales se llevan a cabo diversos procesos metabólicos que ayudan a la arquitectura y funcionamiento de las células vegetales. Estos plástidos pueden almacenar una amplia variedad de compuestos importantes tales como: pigmentos, ácidos grasos, proteínas y carbohidratos (Maliga, 2004). Los proplástidos dan origen a diferentes tipos de plástidos, dependiendo del estado de desarrollo y del tejido específico de la planta se

pueden diferenciar en: cloroplastos (contienen clorofila; fotosíntesis), cromoplastos (contienen pigmentos), amiloplastos (almacenan almidón), etioplastos (carecen de clorofila) (Figura 5). (Hibberd y col., 1998; Mache y col., 2001). Los plástidos son organelos semiautónomos porque contienen la maquinaria genética requerida para sintetizar parte de sus proteínas y son capaces de multiplicarse de manera independiente a la división celular (Mache y col., 2001). El genoma de los plástidos es una molécula circular de doble cadena de 120 a 180 kb con aproximadamente 130 genes (Maliga, 2003). Los plástidos y las mitocondrias no obedecen las leyes mendelianas y usualmente exhiben transmisión uniparental a la siguiente generación (Sugiurá, 1992). Una característica remarcable del genoma de los plástidos es el alto nivel de ploidía, por ejemplo, una sola célula de hoja de *Arabidopsis* contiene aproximadamente 120 cloroplastos y un total de 1,000 a 1,700 copias de ADN plastídico, mientras que una sola célula de hoja de tabaco puede contener 100 cloroplastos y aproximadamente 10,000 copias del ADN plastídico (Lutz y col., 2007).

Desde la década pasada la estructura, los sistemas de expresión génica y la evolución del genoma de los plástidos han sido ampliamente estudiados empleando métodos moleculares (Sugiura, 1992; Mache y col., 2001). Esto ha generado información acerca de la función del sistema genético de los mecanismos regulatorios que gobiernan la cooperación de los organelos celulares con el compartimiento núcleo-citoplasma (Howe y col., 2002).

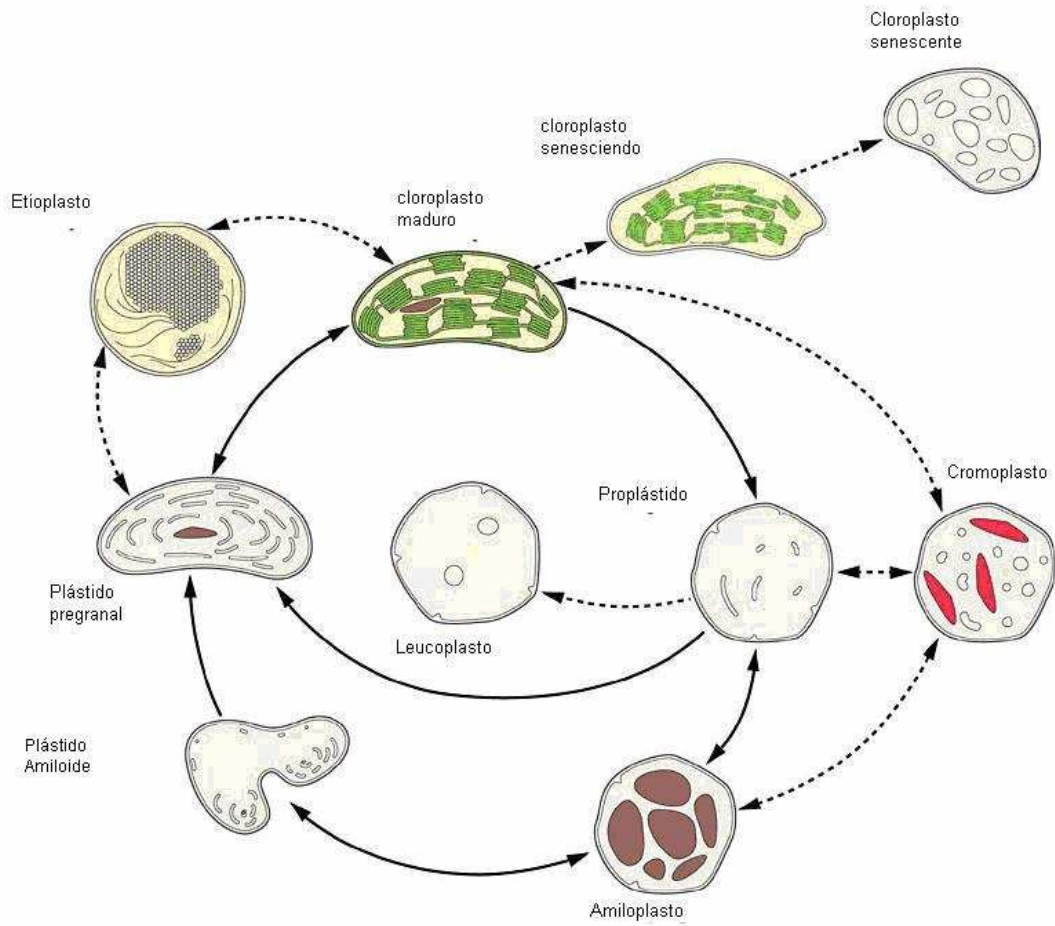


Figura 5. Proplástidos que dan origen a diferentes tipos de plástidos.

2. Transformación genética de plástidos

2.1. Método de transformación de cloroplastos

Las células de las plantas contienen el ADN en tres compartimientos celulares: núcleo, plástidos y mitocondria (Lutz y col., 2007). Después de la transformación nuclear en plantas y la transformación mitocondrial en levaduras, el genoma de los cloroplastos fue el siguiente en ser manipulado por los investigadores (Bock, 2001; Maliga, 2004). Durante muchos años la transformación genética de genomas de organelos parecía imposible debido a que la doble membrana es una poderosa barrera física para la liberación del DNA dentro del organelo, además no se conocía algún virus o bacteria que infectara cloroplastos o mitocondrias que pudiera ser usado como vehículo para transferir genes (Maliga, 2003). Este problema desapareció con el método de biobalística para la transformación de plantas, técnica que ha sido muy atractiva para introducir DNA dentro de las células vivientes (Maliga, 2003). La técnica de biobalística se considera como un sistema versátil que ha tenido aplicación en plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas; lo que ha estimulado el desarrollo de la ingeniería genética. El proceso puede ser definido como la introducción de material genético (DNA purificado) dentro de células y tejidos a través del disparo de microproyectiles a altas velocidades.

Este poderoso método de transformación está sujeto a un número de factores limitantes, las consideraciones técnicas incluyen; el tipo de pistola (alta o baja presión), el tipo de partícula (oro o tungsteno) y las condiciones experimentales (distancia y presión), además algunos tejidos pueden ser resistentes a la

penetración de las partículas debido a una cutícula fuerte, paredes celulares lignificadas o superficies irregulares (Hunold y col., 1994).

Después de que las partículas cubiertas de DNA son introducidas existen numerosos factores que influyen en la expresión génica y subsecuentemente la recuperación de plantas transgénicas, estos factores están lógicamente relacionados con la capacidad del tejido para servir como blanco en un proceso de introducción de DNA, resultando en la expresión y eventual integración del DNA foráneo. Para llevar a cabo una transformación exitosa vía bombardeo de partículas, el plásmido (DNA) debe ser cuidadosamente diseñado y seleccionado, además se debe poner especial atención en la naturaleza, estado y receptividad de los tejidos blancos (Finer y col., 1999).

En general las principales limitaciones del sistema son: a) la baja frecuencia de integración estable, que puede variar de 1% a 5% b) la baja penetración de las partículas c) el daño de las células debido a la onda de choque y d) la falta de consistencia entre las repeticiones (Birch y Franks, 1992; Mc Cabe y Christou, 1993).

El método de transformación por biobalística fue usado inicialmente en plantas de tabaco para introducir un plásmido con el gen 16S ribosomal como marcador de selección y la proteína ribosomal *rps 12* (Svab y col., 1990; Staub y Maliga, 1992).

En 1988 Boynton y col. reportaron la transformación por biobalística de cloroplastos de *Chlamydomonas reinhardtii*, alga verde unicelular con un solo cloroplasto que ocupa aproximadamente el 60% del volumen total celular. Emplearon mutantes fotosintéticamente incompetentes que presentan un defecto

en el gen *atpB*, sin actividad de ATP sintasa. El gen *atpB* silvestre fue usado para complementar el fenotipo mutado y se obtuvieron transformantes estables, el alelo mutado fue reposicionado por el alelo del gen silvestre. Desde entonces han habido progresos significativos en la ingeniería genética del cloroplasto; es probable que en los próximos años se vea incrementado el interés en usos comerciales de proteínas de alto valor terapéutico y otros productos recombinantes que se sinteticen en el cloroplasto de *chlamydomonas* (Purton S., 2007).

Otra estrategia ha sido desarrollada para la transformación de cloroplastos como es el método de polietilenglicol (Koop y col., 1996; Kofer y col., 1998). *Nicotiana plumaginifolia* y *Nicotiana tabacum* han sido transformadas por el método de polietilenglicol usando genes reporteros que están flanqueados por secuencias que permiten la recombinación homóloga.

2.2. Integración del transgen al genoma del cloroplasto

La integración del transgen en el genoma de los plástidos de las plantas se lleva a cabo mediante recombinación homóloga. Los vectores utilizados para la transformación genética de plástidos están compuestos de regiones llamadas en inglés “targeting regions”, que flanquean el gen de interés y el marcador de selección. Están dirigidas a una región específica del genoma de los plástidos en donde se llevará a cabo la integración del transgen por recombinación homóloga (Maliga, 2003). Estas regiones son de aproximadamente 1-2 Kpb en tamaño; en la (Figura 6) se muestra una representación gráfica de recombinación homóloga.

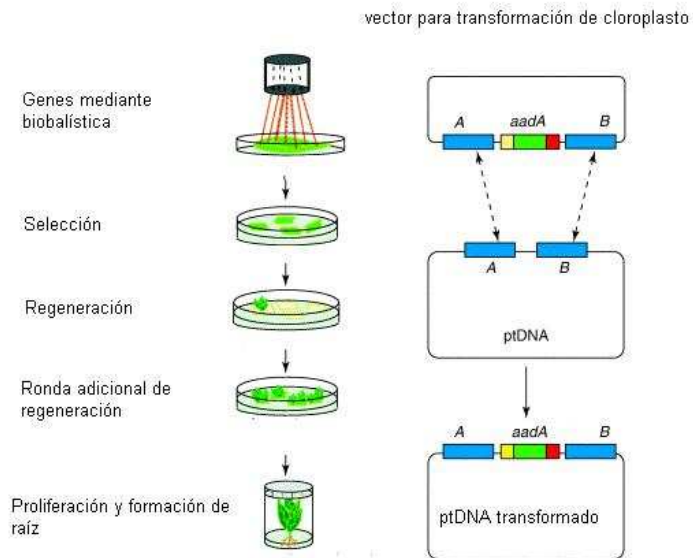


Figura 6. Transformación de cloroplastos mediante biobalística e integración del transgén por recombinación homóloga. A la izquierda: el vector de transformación adherido a micropartículas de oro o tungsteno es disparado a explantes de hoja. La hoja se corta en pequeñas piezas y se pone en un medio para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

2.3. Selección de plantas transplastómicas

En la ingeniería transplastómica se deben alterar uniformemente todas las copias del genoma para que exista una transformación genética estable (Lutz y col., 2007) o sea que en todas las copias se encuentre integrado el transgen. Esto se obtiene mediante un buen sistema de selección con el antibiótico apropiado (Maliga, 2003).

Una contribución fundamental para el mejoramiento de la tecnología de transformación de cloroplastos fue el desarrollo de los primeros marcadores de resistencia a antibióticos específicos para cloroplastos. El gen bacteriano *aminoglicosido 3'-adeniltransferasa (aadA)* que confiere resistencia a un número de antibióticos del tipo aminoglicosido que incluye espectinomicina y estreptomina ha sido ampliamente usado (Goldschmidt-Clermont, 1991). La selección con espectinomicina produce en promedio una línea transplastómica por cada hoja bombardeada (Maliga, 2003). Otro de los marcadores de selección que han sido usados en la transformación genética de cloroplastos es el gen *neo* que confiere resistencia a kanamicina. La primera versión que se utilizó del gen *neo* fue ineficiente, produjo una línea transplastómica por 25 muestras bombardeadas (Carrer y col., 1993). El gen de resistencia *AphA-6* presentó relativamente alta eficiencia de transformación con 0.5 líneas por hoja (Huang y col., 2002). Sin embargo, hasta la fecha el antibiótico más usado en la transformación de cloroplastos es la espectinomicina porque presenta una alta especificidad como inhibidor de la traducción en procariontes y por su bajo efecto sobre las células de las plantas. La proteína *aadA* cataliza la transferencia covalente de un residuo

AMP del ATP a la espectinomicina, por lo que convierte al antibiótico en una forma inactiva que inhibe la biosíntesis de proteínas en los ribosomas (Bock y col., 2001). Una vez llevada a cabo la transformación del cloroplasto se asume que hay cambios en una sola o en unas pocas copias del genoma del plástido (dentro de un cloroplasto). Consecuentemente líneas celulares transplastómicas primarias contienen una mezcla de genomas plastídicos transformados y no transformados; tales células, tejidos o plantas son llamadas heteroplásmicas o heteroplastómicas (Figura 7) y son genéticamente inestables. Para lograr estabilidad genética en las líneas celulares transplastómica se requiere un estado homoplásmico, es decir que en todas las copias del genoma de todos los cloroplastos se encuentre integrado el transgen. Este estado se puede lograr seleccionando los explantes de dos a cuatro ciclos, bajo una presión selectiva con altas concentraciones del antibiótico espectinomicina (Figura 7). La capacidad de selección del antibiótico es una característica importante debido a que permite la eliminación de copias del genoma plastídico no modificado antes de la regeneración de la planta.

En *Clamydomonas* el estado homoplásmico se puede obtener simplemente rastreando las colonias crecidas sobre medio fresco que contenga espectinomicina. En plantas de tabaco con una población uniforme de genomas transformados se puede obtener pasando las transformantes primarias a través de dos a cuatro ciclos de regeneración en un medio que contenga el antibiótico espectinomicina (Maliga y col., 2003).

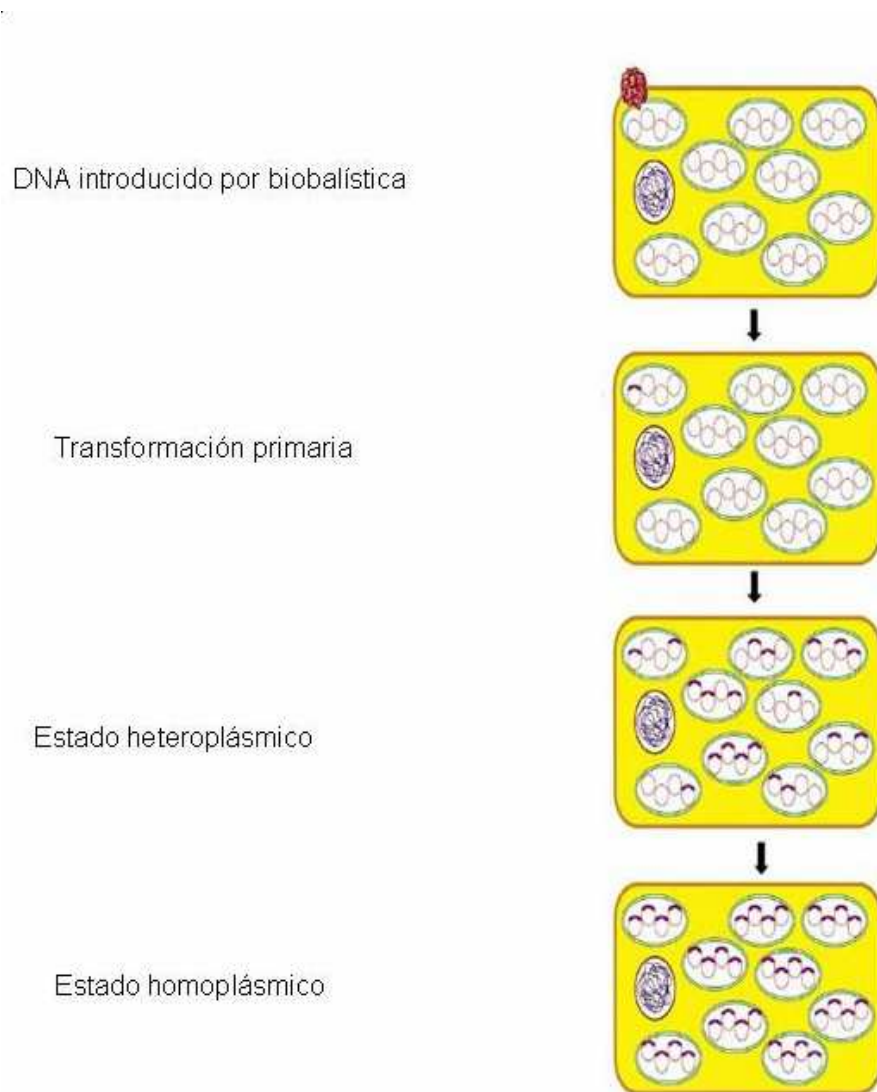


Figura 7. Etapas de selección para una planta transplastómica. En la ingeniería transplastómica se deben alterar uniformemente todas las copias del genoma para que exista una transformación genética estable mediante un buen sistema de selección con el antibiótico apropiado.

3. Implementación de la tecnología en nuevos cultivos

El grupo de Maliga y col. (1990) fueron los primeros en trabajar con transformación de cloroplastos en plantas superiores. Usando el gen del RNA ribosomal 16S modificado para introducir una mutación puntual que confiere resistencia a espectinomicina ó estreptomycin demostraron la transformación estable de plástidos de *Nicotina tabacum*.

La transformación se llevó a cabo bombardeando hojas estériles seguido por selección de líneas celulares resistentes a espectinomicina. En el genoma de cloroplastos de plantas transformadas (llamadas también plantas transplastómicas) el alelo modificado 16S presente en el vector de transformación se intercambi6 con el alelo tipo silvestre por recombinaci6n hom6loga. Aunque la tecnología de transformaci6n de cloroplastos tiene un poco m6s de 10 a6os, la transformaci6n de pl6stidos est6 disponible en pocos cultivos (Ruf y col., 2001), como en tabaco, papa y tomate, especies que presentan sistemas de cultivo de tejidos similares (Svab y col., 1990; Sidorov y col., 1999; Ruf y col., 2001). Recientemente se ha implementado la transformaci6n de pl6stidos en especies de plantas superiores como se muestra en la Cuadro 1 (Lutz y col., 2007).

Kuchuk y col., (2005) lograron la transformaci6n gen6tica de cloroplasto de *Solan6cea rickii* mediante el m6todo de biolística, llevando a cabo la selecci6n de estas plantas inmediatamente despu6s del microbombardeo con el gen *aadA*; resistente a estreptomycin y espectinomicina; evitando la presencia de línas mutantes. Las plantas transplast6micas de *Solan6cea rickii* no presentaron diferencias morfol6gicas comparadas con plantas sin transformar.

Cuadro 1. Implementación de transformación de plástidos en especies de plantas superiores.

Año	Planta	Cita
1993	Tobacco (<i>Nicotiana tabacum</i>)	Svab y Maliga.
1999	Papa (<i>Solanum tuberosum</i>)	Sidorov y col.
2001	Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	Ruf y col.
2004	Soya (<i>Glycine max</i>)	Dufourmantel y col.
2004	Algodón (<i>Gossypium hirsutum</i>)	Kumar y col.
2006	Lechuga (<i>Lactuca sativa</i>)	Kanamoto y col.
2006	Coliflor (<i>Brassica oleracea</i>)	Nugent y col.
2006	Álamo (<i>Populus alba</i>)	Okumura y col.

Daniell H. y col., (2004) bombardearon cotiledones y hojas de algodón con el vector pDD-GhaphA-6/nptII, los cuales fueron seleccionados con diferentes concentraciones de espectinomicina (25, 75 y 150 mg/L); sin embargo, no se recuperó ningún callo o plantas transplastómica en la etapa de selección debido al efecto tóxico del antibiótico sobre los explantes de algodón. En cambio, cuando se bombardeo callo embriogénico de algodón con el mismo vector y como agente selectivo kanamicina (50 mg/L) se obtuvieron líneas transplastómicas. Cabe resaltar que se ha logrado la transformación de plástidos vía embriogénesis somática en otros cultivos como soya (Dufourmantel y col., 2004) y zanahoria (Kumar y col., 2004a) usando secuencias particulares del genoma del cloroplasto.

Kanamoto y col., (2006) describieron el desarrollo de un sistema de transformación de plástido en lechuga, cv. Cisco. El vector de transformación contenía el gen (*aadA*), bajo el control de los elementos reguladores de la expresión de cloroplasto de lechuga, flanqueado por dos secuencias adyacentes del genoma del plástido de lechuga, permitiendo su inserción entre los genes *rbcL* y *accD*. En promedio, por cada bombardeo obtuvieron una planta transplastómica de lechuga. Además demostraron que los cloroplastos de la hoja de la lechuga pueden expresar el transgene que codifica para la GFP aproximadamente en un 36% de la proteína total soluble. Todas las plantas transplastómicas T0 fueron fértiles y la progenie T1 demostró estabilidad uniforme del transgene en el genoma del cloroplasto.

4. Transformación plastídica en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*)

Ruf y col. (2001) fueron los primeros en describir el sistema de transformación de plástidos de tomate (*Lycopersicon esculentum*) usando los vectores pRB70, pRB94 y pRB95 que tienen los elementos necesarios para la expresión del transgen *aadA* (aminoglicosido-3'-adeniltransferasa) que confiere resistencia al antibiótico espectinomicina.

Estos vectores fueron previamente probados en tabaco obteniendo una alta eficiencia de transformación de cloroplastos. Esto debido a que las regiones de recombinación homóloga y los elementos regulatorios de la transcripción y traducción de proteínas en cloroplastos son altamente conservados en el genoma de los cloroplastos de algunas solanáceas, como tabaco y tomate.

El análisis molecular de las plantas transplastómicas de tomate fue realizado mediante análisis de PCR y de RFLP mostrando la identificación de cloroplastos transformados, además mediante análisis de inmunodetección por Western blot se encontró una expresión del 50% de la proteína recombinante.

Bock y col., 2007 reportaron la expresión del gen de la β -licopeno ciclasa de *Erwinia herbicola* (*crtY*) usando el vector pRB96 y el promotor *atpI* para facilitar la expresión del transgen en frutos de tomate, provocando la conversión de licopeno a β -caroteno, con lo que incrementaron cuatro veces el contenido de provitamina A en plastidos de tomate mediante la transformación del genoma de cloroplastos. Las plantas transplastómicas de tabaco y tomate se confirmaron por análisis de tipo PCR y se verificaron por pruebas de doble resistencia, el medio

contenía dos antibióticos aminoglicosidos como la espectinomicina y estreptomina (Bock, 2001; Svab y Maliga, 1993). El estado homoplásmico (ausencia de alguna copia del tipo silvestre en el genoma del cloroplasto) de las líneas transplastómicas se verificó mediante análisis de RFLP, así como análisis tipo Southern y Northern blot, generando un total de 17 líneas transplastómicas con cuatro construcciones de transformación y demostrando así la viabilidad de la ingeniería de las rutas metabólicas importantes en plástidos no verdes.

5. Ventajas de la transformación genética de plástidos

El desarrollo de la tecnología de ingeniería de cloroplastos ofrece un gran potencial para la biotecnología del futuro y un gran número de ventajas sobre las plantas transgénicas convencionales (generadas por transformación del genoma nuclear) (Bock, 2001; Maliga, 2003, 2004). En el Cuadro 2 se hace una comparación de las características entre los sistemas de transformación nuclear y plastídica (Bock, R., 2001).

Debido a la poliploidía del sistema genético plastídico, con miles de copias del genoma por célula, se pueden encontrar altos niveles de acumulación de proteínas en los cloroplastos. Los plástidos transgénicos son una buena maquinaria para la producción de proteínas en altos niveles, se han obtenido niveles de expresión de más del 40% de proteína total soluble.

De Cosa y col. (2001) sobreexpresaron la toxina (BT) de *Bacillus thuringiensis* en cloroplasto de tabaco y reportaron aproximadamente de 10 a 100 veces más expresión de proteínas que en el genoma nuclear (Bock, 2001). Además, las

Cuadro 2. Comparación de los sistemas de transformación nuclear y plastídica.

Genomas		
	Plastídico	Nuclear
Número de copias	10,000/célula	Pocas copias
Nivel de expresión	Altos Hasta el 47%	Por lo general bajos Entre 0.001%-0.1%
Genes y expresión	Policistrónicos (Operones)	Monocistrónicos
Efectos de posición	Inserción en sitio específico elimina este problema	Inserción al azar (Expresión variable)
Silenciamiento génico	No se ha reportado	Silenciamiento, afecta la expresión
Transferencia horizontal	Herencia materna	Sí
Plegamiento y formación de puentes disulfuro	Correcto	Sólo si pasa por retículo endoplasmático
Glicosilación	No	Sí

proteínas son mucho más estables en los plástidos que en los compartimientos citoplasmáticos y en el núcleo debido a que en los plástidos están limitadas las vías de degradación de proteínas. Por lo que, otra de las ventajas de la tecnología transplastómica es que la expresión del transgen es más estable y uniforme entre las líneas transgénicas (Maliga, 2003).

En conclusión podemos decir que, la tecnología de transformación de cloroplastos es una herramienta prominente que tiene el potencial de resolver algunos problemas técnicos asociados a tecnologías transgénicas clásicas (transformación nuclear) y además minimizar los riesgos ecológicos clásicos sobre la liberación de plantas transgénicas dentro del ambiente (Bock, 2001).

Diversos estudios demuestran que el cloroplasto es el lugar celular ideal para expresar y acumular ciertas proteínas o sus productos biosintéticos que serían de otra manera dañinos a la planta si fueran expresados en el citoplasma. Esto fue demostrado con el efecto no tóxico de la subunidad de la toxina B del cólera (CTB), cuando fue acumulada en grandes cantidades dentro del plástido transgénico no provocó ningún daño; en contraste, incluso muy pequeñas cantidades de CTB fueron tóxicas cuando se expresaban en el citoplasma (Daniell y col., 2001; Molina y col., 2004). También la trehalosa, preservativo farmacéutico, fue muy tóxico cuando se acumuló en el citosol pero no lo fue cuando fue dividida en compartimientos dentro de los plástidos (Lee y col., 2003).

Una ventaja más que presenta la tecnología de transformación de cloroplastos es la de obtener plantas transplastómicas libres de marcadores. Recientemente se han desarrollado diferentes protocolos que se basan en homología vía secuencias

repetidas, supresión por medio de recombinasas sitio-específicos de fago, cointegración transitoria del gen marcador y el enfoque cotransformación-segregación (Lutz y col., 2007).

En los siguientes puntos se resumen las ventajas de la tecnología transplastómica con respecto a la tecnología transgénica.

1. Altos niveles de expresión del transgen y acumulación de la proteína recombinante arriba del 40% de la proteína total soluble (esto presumiblemente como resultado de la poliploidía del sistema genético plastídico y/o por la alta estabilidad de proteínas foráneas).
2. La posibilidad de expresar múltiples transgenes como operones debido a la eficiente traducción de RNA mensajeros policistrónicos en plástidos.
3. La ausencia de efectos de posición en plástidos debido a la eficiente integración del transgen por recombinación homóloga.
4. La ausencia de efectos epigenéticos (silenciamiento de genes).
5. Disminuye la contaminación por polen, ya que éste sólo se transfiere por vía materna (ausencia de transmisión del transgen por el polen).

III. JUSTIFICACIÓN

Debido a las ventajas que presenta la manipulación del genoma del cloroplasto con respecto a la del genoma nuclear (altos niveles de expresión de proteínas, expresión de múltiples transgenes como operones, ausencia de efectos de posición, ausencia de efectos epigenéticos y la ausencia de transmisión del transgen vía polen), así como la gran importancia que tienen los carotenoides en la alimentación (como nutraceuticos por sus propiedades anticancerígenas y precursores de la vitamina A) ha surgido gran interés en manipular la ruta biosintética de los carotenoides mediante la expresión del gen β -licopeno ciclasa (*lcy-b*) de *Tagetes erecta* en cloroplastos de plantas de tabaco y tomate.

IV. OBJETIVOS

A. GENERAL

Manipular la ruta biosintética de los carotenoides mediante la expresión del gen de la β -licopeno ciclasa (*Lcy-b*) en cloroplastos de plantas de tabaco y tomate.

B. ESPECÍFICOS

- Transformar vía cloroplasto, explantes de tabaco y tomate con el gen de la β -licopeno ciclasa.
- Seleccionar y regenerar explantes de tabaco y tomate transformados vía cloroplasto.
- Caracterizar molecularmente las plantas transplastómicas de tabaco regeneradas.
- Caracterizar bioquímicamente los contenidos de carotenoides de las plantas transplastómicas de tabaco.

V. METODOLOGÍA

A. MATERIALES

1. Cepas de *Escherichia coli*

La cepa de *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen, Carlsbad CA, EUA) se utilizó para el mantenimiento y propagación de plásmidos.

2. Vectores de transformación para cloroplasto

Para llevar a cabo la transformación vía cloroplasto de las plantas de tabaco y tomate se utilizó el vector pHK β (Figura 8), el cual se construyó en nuestro laboratorio por Sinagawa-García y Paredes-López (2006) (comunicación personal). El vector pBI426 (Figura 9) se utilizó como control, las características de estos plásmidos se encuentran descritas y esquematizadas en la Cuadro 3.

3. Material vegetal

Se utilizaron plantas de *Nicotiana tabacum* var. Xanti y *Lycopersicon esculentum* cultivar Tanksley.

B. MÉTODOS

1. Caracterización molecular de los vectores de transformación

Para llevar a cabo la transformación de cloroplasto de plantas de tabaco y tomate primeramente se realizó las minipreparaciones de DNA plasmídico de pHK β y pBI426 de acuerdo al método de Birnboim (1983) y las maxipreparaciones con el kit de QUIAGEN (Quiagen Inc., Valencia, EUA),

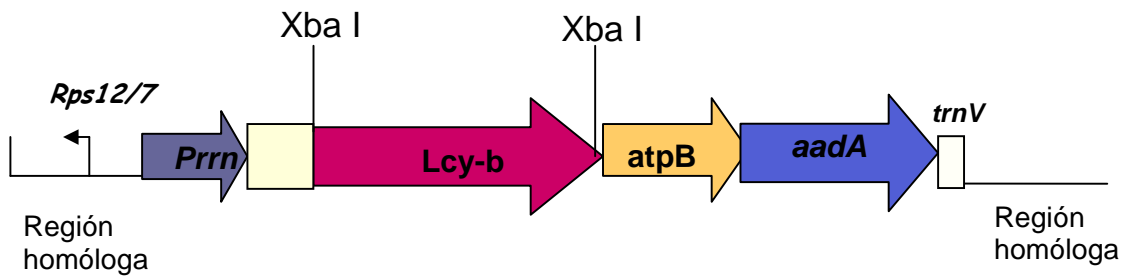


Figura 8. Representación del plásmido pHK β utilizado en los ensayos de transformación de cloroplasto mediante biobalística. En el esquema se muestra el gen de la β -licopeno ciclasa (*lcy-b*), el agente selectivo *aadA* con resistencia a espectinomicina, el promotor (*Prrn*) y dos eventos de recombinación homóloga *trnV* y *3'-rps 12/7* en donde se llevará a cabo la integración del transgen.

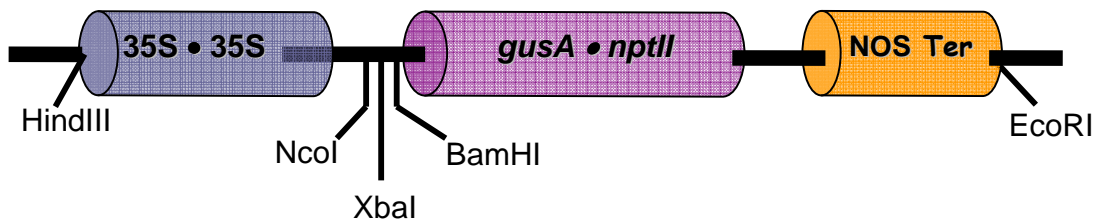


Figura 9. Representación del plásmido pBI426 utilizado en los ensayos de transformación nuclear mediante biobalística. En el esquema se muestra el gen reportero (*gus*), con resistencia al agente selectivo (*nptII*), así como el promotor 35S y terminador NOS.

Cuadro 3. Plásmidos utilizados en ensayos de transformación mediante biobalística.

Plásmido	Descripción
<p>pBI426 (Dalta y col., 1991)</p>	<p>Plásmido basado en pUC9 que contiene la información que codifica para la proteína fusionada de <i>GUS-NPTII</i> bajo el control de un promotor doble 35S del virus del mosaico de la coliflor (<i>CaMV</i>) y el terminador de la nopalino sintetasa (<i>NOS</i>).</p>
<p>pHKβ (Sinagawa-García y Paredes-López (2006) (comunicación personal)</p>	<p>Plásmido derivado de pHK30 que contiene el gen de selección aminoglicosido 3'-adeniltransferasa (<i>aadA</i>) que confiere resistencia a espectinomicina, bajo el control del promotor RNAr plastídico (<i>Prrn</i>) y una región 3'-no traducida del gen plastídico (<i>atpB</i>) de la subunidad β de la ATP sintasa para una eficiente transcripción y estabilización de RNAm.</p>

posteriormente se llevó a cabo la caracterización molecular de estos plasmidos bajo digestión con enzimas de restricción de acuerdo a las especificaciones y a las condiciones de manufactura (Invitrogen, Carlsbad CA, EUA). El vector PBI426 se utilizó únicamente para estandarizar los parámetros de distancia y presión en el sistema de transformación por biobalística.

2. Establecimiento del cultivo *in Vitro* de tomate

El cultivo *in vitro* de *Lycopersicon esculentum* cultivar Tanksley se estableció a partir de segmentos de hojas que se obtuvieron de plantas de aproximadamente 6 semanas de edad, en medio MG. Las semillas que se utilizaron para la obtención de estas hojas fueron a partir de frutos de tomate maduros crecidos en invernadero. Las semillas se desinfestaron lavándolas con etanol al 70%, después con hipoclorito de sodio comercial (Clorox) al 5.25% y tween 20 al 0.1%. Finalmente se enjuagaron con agua destilada, el proceso se llevó a cabo en condiciones asépticas en una campana de flujo laminar. Una vez desinfestadas las semillas se colocaron en medio de germinación MG (Apéndice). Previamente a la esterilización se ajustó el pH del medio a 5.8 y las condiciones de incubación fueron: temperatura de 25°C y un fotoperíodo de 18 h luz por 6 h de oscuridad.

3. Establecimiento del sistema de regeneración vía organogénesis indirecta en plantas de tomate

3.1. Inducción y mantenimiento del estado de callo

Para seleccionar la fuente de explante óptima para la producción de callo de *Lycopersicon esculentum* se evaluaron segmentos de hoja y cotiledones de plántulas de tomate enraizadas *in vitro*. Estos explantes fueron colocados en medio RMOP y SM suplementados con diferentes concentraciones de BAP o zeatina como fuente de citocinina en combinación con NAA o IAA como fuente de auxina (Cuadro 4). Las condiciones de incubación fueron: temperatura de 25°C y un fotoperíodo de 18 h luz por 6 h de oscuridad. La respuesta de los explantes se evaluó periódicamente hasta completar un mes de exposición al medio (subcultivos cada 15 días) y se eligió el tipo de explante formador de callo.

3.2. Producción de brotes, enraizamiento y aclimatación

Los callos obtenidos de los diferentes tratamientos fueron colocados en medio MG e incubados en las mismas condiciones para llevar a cabo la formación de brotes. Una vez que los brotes producidos alcanzaron una altura de 2 cm aproximadamente, fueron separados y transferidos a medio MG sin reguladores para la elongación y producción de raíces. Las plántulas que presentaban un sistema radical completo fueron lavadas para eliminar el fitigel, transferidas a macetas y llevadas a invernadero donde se completo su desarrollo.

Cuadro 4. Evaluación del efecto de auxinas (NAA o IAA) y citocininas (BAP o Zeatina) en diferentes medios utilizados en el mantenimiento del estado de callo en la etapa de selección de las plantas de *Lycopersicon esculentum*.

MEDIO RMOP	g/l
Sacarosa	30
Myo-inositol	0.0001
MS Sigma (Murashige y Skoog, 1962)	4.3
Tiamina	0.001
Ácido naftalenacético NAA	0.0001
6-bencilaminopurina BAP	0.001
Fitagel	2.5
pH	5.8

Medio SM	g/l
MS Sigma (Murashige y Skoog, 1962)	4.3
Sacarosa	30
Zeatina	0.002
Ácido 3-indoleacético IAA	0.0001
pH	5.8

4. Determinación de la sensibilidad de explantes de tomate a kanamicina y espectinomicina en relación con la capacidad de formación de brotes

Para establecer un sistema de transformación es necesario contar con un sistema de selección confiable que permita asegurar la recuperación de plantas transplásticas; para esto es necesario determinar la sensibilidad intrínseca de los tejidos a los agentes selectivos que se vayan a usar. Se realizaron experimentos en los cuales se expuso el tejido a diferentes concentraciones del antibiótico kanamicina y espectinomicina (Cuadro 5); esterilizados por filtración y adicionados al medio de selección RMOP. Las condiciones de incubación fueron a temperatura de 25°C y un fotoperíodo de 18 h luz por 6 h de oscuridad. Se evaluó la tasa de supervivencia de los explantes de forma semanal durante cuatro meses. Con los resultados obtenidos de estos experimentos se estableció la dosis letal mínima para la selección de los tejidos una vez transformados. Se evaluó además la formación de brote tomando en cuenta el número producido por explante y el número total de explantes que presentaban producción de brote. Estos datos se utilizaron para calcular el índice de capacidad de formación de brote de acuerdo a lo reportado por Martínez-Pulido y col. (1992):

$$CFB = (\text{Número promedio de brotes por explante}) \times (\% \text{ de explantes con brotes}) / 100$$

Los experimentos se realizaron en un diseño completamente al azar con 5 repeticiones por tratamiento. Cada repetición consistió en una caja petri con 10 explantes por caja. Los datos fueron evaluados con un análisis de varianza (ANOVA) con el paquete de diseños experimentales STATGRAPHICS Plus versión 5.1. Las medias de los tratamientos fueron separadas usando la prueba de diferencia mínima significativa (dms) ($\alpha=0.05$).

Cuadro 5. Tratamiento para la evaluación de la sensibilidad de explantes de tomate a kanamicina y espectinomicina.

Tratamiento	Kanamicina mg/l	Espectinomicina mg/l
1	0	0
2	50	50
3	100	100
4	200	200
5	400	400

5. Transformación de tabaco y tomate mediante biobalística

5.1. Preparación de micropartículas de oro

Para llevar a cabo la transformación de plástidos de plantas de tabaco y tomate se utilizó el método de transformación por biobalística. La preparación de partículas se realizó de acuerdo al protocolo de Daniel y col. (2004). Se pesaron 60 mg de partículas de oro de 0.6 μm (Bio-Rad) en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Se agregó 1 ml de etanol absoluto y se mezcló en vórtex por 3 min, se centrifugó a 13,000 rpm durante 2-5 min. Se descartó el sobrenadante y se agregó 1 ml de etanol al 70% y se mezcló con vórtex de 1-2 min. Se incubaron las partículas por 15 min a temperatura ambiente, agitando cada 3 min. Se centrifugaron 3 min a 13,000 rpm durante 2-5 min y se descartó el sobrenadante. Se agregó 1 ml de agua estéril y se mezcló con vórtex durante 1 min. Se precipitaron las partículas a temperatura ambiente durante 1 min. Se centrifugaron durante 2 min a 13,000 rpm y se descartó el sobrenadante.

Estos lavados se repitieron dos veces para finalmente resuspender las partículas en 1 ml de glicerol estéril al 50%.

5.2. Preparación del material utilizado para el bombardeo

La preparación del material consistió en esterilizar por inmersión las mallas de retención, los discos de ruptura y el macroacarreador (BioRad) en etanol al 70% y se dejaron secar en ambiente estéril.

5.3. Metodología para el bombardeo de hojas de tabaco y tomate

5.3.1. Cobertura de partículas con el ADN

Se utilizaron 50 µl de partículas de oro preparadas previamente en glicerol al 50%, se mezclaron con vórtex hasta que se resuspendieron completamente y se agregaron en orden los siguientes componentes, agitando 5 segundos entre cada componente: 12 µl de DNA (1µg/µl), 50 µl de CaCl₂ (2M), 20 µl de espermidina (5M), se mezclaron con vórtex durante 15 min a 4°C y se centrifugaron por 20 seg. Por último, las partículas precipitadas se resuspendieron en 50 µl de etanol absoluto y se colocaron en hielo hasta su uso. Este material se utilizó para 5 bombardeos.

5.3.2. Preparación del material biológico

Se utilizaron hojas jóvenes de tabaco y tomate de 6 semanas crecidas en medio MG en condiciones de esterilidad. Las hojas fueron colocadas en medio osmótico (apéndice) en cajas petri con la cara abaxial hacia arriba 4 h antes de realizar el bombardeo.

5.3.3. Bombardeo de las hojas de tabaco y tomate

Se esterilizó la campana de flujo laminar y la pistola con etanol absoluto. El procedimiento para realizar el bombardeo de las hojas de tabaco y tomate se realizó de la siguiente manera. Se abrió la válvula del tanque de helio, ajustando la presión del manómetro de salida a 1,400 psi (libras por pulgada cuadrada). Se encendió la pistola y la bomba de vacío para realizar los disparos. Se colocaron

los discos de ruptura de 900 psi y se depositaron 7 μ l de la suspensión de micropartículas de ADN. Se colocó la caja petri con los explantes a 11 cm de distancia y se cerró la cámara de vacío. Se aplicó el vacío hasta que el indicador marcó 20 mm de mercurio. Se realizó el disparo de las micropartículas con el ADN y se retiró la placa de petri con los explantes, todo en campana de flujo laminar.

5.4. Análisis histológico de explantes de tabaco y tomate bombardeados con el plasmido pBI426

Para analizar la expresión del gen *GUS* en los ensayos de expresión transitoria y en los tejidos que sobrevivieron a los procesos de selección se llevaron a cabo ensayos histoquímicos basados en el método de Jefferson (1987). Se adicionaron 500 μ l de buffer de reacción al tejido transformado con el sustrato X-gluc (5-bromo-4-cloro-indolil glucurónido), fosfato de potasio (100 mM pH 7.0), EDTA (10 mM pH 8.0), ferricianuro de potasio (0.5 mM) y ferrocianuro de potasio (0.5 mM) (apéndice). El tejido transformado con el regulador se incubó a 37°C en la oscuridad durante 24 h. Transcurrido este tiempo se retiró la solución y los tejidos fueron lavados tres veces con acetona para remover posibles pigmentos que pudieran interferir con la visualización del color. Las células transformadas fueron reconocidas fácilmente por la producción de un precipitado azul, que se registró como foci.

5.5. Selección y regeneración de explantes transformados

Los explantes bombardeados de tabaco y tomate se incubaron en oscuridad durante 48 h a 24°C para permitir la recuperación del tejido. Cada

explante se cortó en piezas de 3x3 mm aproximadamente y se depositaron en medio RMOP suplementado con espectinomicina (500 mg/l) para inducir la selección de las plantas transplastómicas (Bock, 2001; Svab y Maliga, 1993). Los explantes de tabaco se mantuvieron en medio de selección durante 4 semanas, mientras que los explantes de tomate por 4 meses, ambos explantes se cambiaron cada semana para permitir la aparición de callos homoplastómicos. Después los callos se colocaron en medio de regeneración suplementado con la dosis determinada del agente de selección hasta la aparición de raíz. Por último, las plantas con una raíz vigorosa se transfirieron a macetas.

6. Análisis molecular de las plantas transformadas

6.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El análisis de amplificación del DNA del material seleccionado para determinar la integración de los genes introducidos se llevó a cabo usando oligonucleótidos específicos para el gen *GUS* y/o *Lyc-b*. Los oligonucleótidos que se utilizaron para amplificar un fragmento de aproximadamente 700 pb del gen β -licopeno ciclasa fueron: 5' CCATATGCAAGAGTCAATAGAAAACA en la posición 245 (Sentido) y 3' TGCTAGCGTTCTTGCCACCAT en la posición 856 (Antisentido) y para amplificar el gen *GUS* fueron: 5' AGT GTA CGT ATC ACC GTT TGT GTG AAC 3' (Sentido) 5' ATC GCC GCT TTG GAC ATA CCA TCC GTA 3' (Antisentido). Los componentes y las condiciones de reacción se muestran en las Cuadros 6 y 7.

Los productos obtenidos fueron analizados en geles de agarosa al 1% y visualizados mediante tinción con bromuro de etidio

Cuadro 6. Componentes para la mezcla de reacción para PCR.

Componente	Concentración final	Volumen final (µl)
H ₂ O		19.2
Regulador Taq (10X)	1X	2.5
MgCl ₂ (50mM)	2mM	1.0
dNTP's (2.5mM)	50µM	0.7
Primer 1 (10 pM)	0.2µM	0.4
Primer 2 (10 pM)	0.2µM	0.4
Taq polimerasa	5u	0.3
DNA	100 ng	0.3

Cuadro 7. Programa para la amplificación de fragmentos por PCR.

	Temperatura °C	Tiempo min
Inicio	94	10
Desnaturalización	94	0.45
Alineamiento	56	0.45
Síntesis	72	2
Ciclos		30
Síntesis final	72	10
Temperatura final	4	∞

6.2. Análisis tipo Southern blot

La determinación de la integración del gen β -licopeno ciclasa en el genoma de los cloroplastos de las plantas de tabaco se llevó a cabo mediante un análisis tipo Southern blot (Sambrook y col., 1989).

6.2.1. Extracción de DNA vegetal

La extracción del DNA de los materiales seleccionados se realizó partiendo de 0.1 gramo de tejido fresco. El tejido fue congelado con nitrógeno líquido, molido y transferido a un tubo, posteriormente se adicionaron 800 μ l de buffer de extracción (5M NaCl, 0.5M EDTA, 1M Tris-HCl pH 7.5, 1% de CTAB, y 1% β -mercaptoetanol), se homogenizó y se incubó a 65°C por 30 min, posteriormente se agregó un volumen de cloroformo-isopropanol (24:1 V/V) se agitó y se centrifugó (12,000 rpm, por 12 min, 4°C), recuperándose la fase acuosa que se extrajo nuevamente con un volumen de cloroformo-isoamílico (24:1 V/V). Se mezcló suavemente y se centrifugó (12,000 rpm, por 12 min, 4°C), recuperando nuevamente la fase acuosa que se precipitó con 500 μ l de isopropanol y se centrifugó (12,000 rpm, por 15 min, 4°C). Finalmente, se lavó con 700 μ l de etanol al 70% (v/v) y se resuspendió en 30 μ l de agua estéril.

La integridad del DNA obtenido se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, visualizados con bromuro de etidio. La concentración se calculó por densidad óptica a 260 nm utilizando la siguiente fórmula:

$$[\text{DNA}] = \text{DO}_{260} \times 50 \times \text{FD}$$

[DNA] : Concentración de DNA ($\mu\text{g/ml}$)

DO₂₆₀ : Densidad óptica leída a 260 nm de longitud de onda

FD : Factor de dilución = Volumen total / Volumen de la muestra de DNA

6.2.2. Digestión de la sonda homóloga y su purificación de geles de agarosa

Para la preparación de la sonda se usaron 500 ng de DNA plasmídico y se agregaron 0.7 μL de cada una de las enzimas de restricción *EcoRV* y *APAI* en un volumen final de reacción de 23.4 μL . La mezcla de reacción quedó integrada de la siguiente forma:

5 μL de DNA plasmídico

2 μL de buffer

0.7 μL de *EcoRV*

0.7 μL de *APAI*

15 μL de H_2O

Se mezclaron todos los elementos de la reacción y se incubaron a 37°C al menos 1 h y se aplicó a un gel de agarosa al 1% utilizando TAE 1X como buffer de corrida. Para la purificación de la sonda homóloga se cortaron las bandas de ADN en un transiluminador (San Gabriel, CA. USA) y se transfirieron a tubos eppendorf. Los fragmentos se purificaron de la agarosa utilizando el sistema QIAEX II (QIAGEN, Alemania 1993) como describe el fabricante.

6.2.3. Preparación de las muestras de DNA y electroforesis en geles de agarosa

Cada muestra de 5 µg de DNA genómico fue digerida con la enzima de restricción *EcoRI* durante 4 h en un volumen de 23 µl. Las muestras se cargaron en el gel incluyendo un marcador de tamaño molecular. El gel fue corrido a 10 volts durante 16 h. El DNA fue visualizado por exposición del gel a luz ultravioleta en un transiluminador (San Gabriel, CA. USA) e inmediatamente fue transferido por capilaridad a una membrana de Nylon (Hybond N+, Amersham, Little Chalfont, Englad).

6.2.4. Transferencia del DNA a membranas Nylon

El gel de agarosa se puso en contacto con la solución desnaturizante (0.5M NaOH, 1.5M NaCl) durante 30 min y después se expuso a una solución neutralizante (0.5M Tris, 1.5M NaCl) durante 30 min, posteriormente el gel se lavó con la solución SSC 2X. El DNA se transfirió a la membrana de Nylon (Hybond N+, Amersham, Little Chalfont, Englad) con el equipo Bio-Rad modelo 785 (BIORAD, Paris). Se dejó transfiriendo el DNA durante dos horas, posteriormente fue fijado a la membrana por una doble radiación de 1,200 µjoules x100 de UV auxiliados de un Stratalinker (Stratagene, CA, USA).

6.2.5. Marcaje de sondas radioactivas

Se utilizaron 200 ng de la sonda resuspendidos en 25 µL de agua desionizada estéril. Se desnaturizó a 95°C por 5 min y 5 min en hielo, luego se le

adicionó la mezcla de reacción Random Prime Labelling System (Amersham Biosciences 2006) y se mezcló con 2 µl de [³²P] dCTP, se incubó a 37°C por 2 h.

6.2.6. Hibridación y exposición

Las membranas fueron prehibridadas a 42°C con 15 ml de una solución de prehibridación (50% formamida, 5X SSC, 5% dextrán sulfato, 0.05% SDS, 5X reactivo de Denhardt's y 100 mg/ml de esperma de salmón desnaturalizado) por al menos 2 h, el DNA de timo o esperma de salmón fue desnaturalizado a 95°C por 5 min y 5 min en hielo antes de ponerlo en contacto con el buffer de prehibridación. La hibridación se realizó agregando la sonda marcada con ³²P a 42°C durante toda la noche.

Las membranas hibridadas se lavaron primero con una solución 4X SSPE, 0.1% SDS y después 2X SSPE, 0.1% SDS, fueron expuestas a películas de rayos X para detectar las señales radiactivas (Kodak, Eastman Kodak, Rochester, N.Y.).

6.3. Análisis tipo Northern blot

Para conocer la expresión de los mensajeros de *Lcy-b* se realizaron análisis tipo Northern blot a partir del RNA obtenido de las plantas transformadas.

6.3.1. Extracción de RNA

Para el análisis tipo Northern blot se procedió a aislar el RNA a partir de hojas, las cuales se congelaron en nitrógeno líquido y se pulverizaron. Se tomaron aproximadamente 10 g de tejido molido y se homogenizaron con 15 ml de solución

de TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad CA, EUA) por 5 min a temperatura ambiente. La suspensión se extrajo con 4 ml de cloroformo-isoamílico (24:1; V/V), se agitó vigorosamente y de ahí se centrifugó a 12 000 rpm por 15 min a 4°C. El sobrenadante se extrajo ahora con 15 ml de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (25:24:1; V/V/V) y se centrifugó a 12 000 rpm por 10 min a 4°C. El sobrenadante se extrajo con 15 ml de Cloroformo-Alcohol Isoamílico (24:1; V/V), se centrifugó a 12 000 rpm por 5 min a 4°C. Finalmente, se precipitó con 15 ml de isopropanol por 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12 000 rpm por 10 min a 4°C. La pastilla se lavó con 15 ml de etanol al 75%, se resuspendió y se centrifugó a 12000 rpm por 5 min a 4°C. Se volvió a lavar la pastilla con 15 ml de etanol al 75%. Se dejó secar hasta que adquirió un color cristalino y se resuspendió con 1 ml de agua con DEPC y se transfirió el RNA a tubos eppendorf para su almacenaje. La integridad de RNA se analizó en un gel de agarosa al 1% en condiciones no desnaturizantes. Se analizaron 5 µg de RNA, se corrió a 70 mVolts 400 mA por 1 hora. El gel se observó en un fotodocumentador Bio-Rad (BIORAD, Paris). Se determinó la concentración de RNA en el equipo NANODROP (nanoDropnd/1000 spectrophotometer, USA).

6.3.2. Digestión de la sonda homóloga y su purificación de geles de agarosa

Para la preparación de la sonda se tomaron 5 µg de DNA plasmídico y se le agregaron 0.7µL de cada una de las enzimas de restricción *Bgl II* y *Hind III* en un volumen final de reacción de 25 µL. La mezcla de reacción quedó integrada de la siguiente forma:

5 μ L de DNA plasmídico

2 μ L de Buffer

0.7 μ L de *EcoR* I

0.7 μ L de *Hind III*

16.6 μ L de H₂O

La mezcla se incubó a 37°C al menos 1 h y se analizó a un gel de agarosa al 1% utilizando TAE 1X como buffer de corrida. Para la purificación de los fragmentos de DNA de la sonda homóloga se cortaron los fragmentos de agarosa en un transiluminador (San Gabriel, CA. USA) y se transfirieron a tubos eppendorf. Los fragmentos se purificaron de la agarosa utilizando el sistema QIAEX II (QIAGEN, Alemania 1993) como describe el fabricante.

6.3.3. Preparación del gel desnaturalizante

Se mezclaron 1.2 g de agarosa con 72 ml de agua DEPC y se calentó hasta disolver la agarosa, se dejó enfriar a 42°C y se adicionaron 10 ml de solución MOPS 10 X y 18.5 ml de formaldehído 37%. Se homogenizó la mezcla, se vació en un portageles y se dejó solidificar dentro de una campana de extracción.

6.3.4. Preparación de las muestras de RNA y electroforesis en geles desnaturalizantes

Cada muestra de 10 μ g de RNA se concentró en el equipo SAVANT Speed Vac SC 110 (Instrument, Inc Holbrook, USA) y se resuspendió en 10 μ l de buffer de carga para RNA(750 μ l formamida, 200 μ l glicerol 50%, 150 μ l 10X MOPS, 240

μl formaldehído, 130 μl de agua destilada). Se calentó la mezcla a 65°C por 5 min, se enfrió en hielo por 5 min y se aplicó a un gel de agarosa desnaturalizante. Las muestras se cargaron en el gel incluyendo un marcador de peso molecular tratado de la misma manera que el resto de las muestras. El gel se corrió a 70 volts durante hora y media. El RNA fue visualizado por exposición del gel a luz ultravioleta en un transiluminador (San Gabriel, CA. USA) e inmediatamente fue transferido por capilaridad a una membrana de nylon (Hybond N+, Amersham, Little Chalfont, Englad). Posteriormente fue fijado a la membrana por una doble radiación de 1200 μjoules x100 de UV auxiliados en un Stratalinker (Stratagene, CA, USA).

6.3.5. Hibridación y exposición

Las membranas fueron prehibridadas a 42°C con 15 ml de una solución de prehibridación (formamida 50%, SSC 5X, dextran sulfato 5%, SDS 0.05%, reactivo de Denhardt's 5X y esperma de salmón desnaturalizado 100 mg/ml) por al menos 2 h, el DNA de timo o esperma de salmón fue desnaturalizado a 95°C por 5 minutos y 5 minutos en hielo antes de ponerlo en contacto con el buffer de prehibridación. La hibridación se realizó durante toda la noche después de agregar la sonda marcada con ³²P a 42°C .

Las membranas hibridadas se lavaron en condiciones de baja (4X SSPE, 0.1% SDS) y alta astringencia (2X SSPE, 0.1% SDS), las membranas fueron expuestas a películas de rayos X para detectar las señales (Kodak, Eastman Kodak, Rochester, N.Y.).

7. Análisis del contenido de carotenoides en hojas de tabaco transplastómico

Las hojas de tabaco transplastómicas se colectaron y pulverizaron para realizar la extracción de carotenos con el método de Kurilich (1999). En tubos eppendorf de 2 ml, se pesaron 0.05 g de tejido y se adicionaron 500 μ l de etanol-BHT 0.1%, las muestras se colocaron a 80°C por 5 min y se adicionaron 10 μ l de KOH al 80%, se mantuvieron a 80°C por 10 min, se enfriaron en hielo 5 min. A cada muestra se adicionaron 250 μ l de hexano y 500 μ l de agua desionizada fría (tubo 1) y se agitaron en vortex, se centrifugaron a 12,000 rpm por 10 min a 4°C, se tomó el sobrenadante y se colocó en un tubo nuevo (tubo 2). El tubo se envolvió en papel aluminio para evitar la oxidación de los carotenos, nuevamente se adicionó 250 μ l de hexano (tubo 1), se agitó y se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min a 4°C, recuperando el sobrenadante y colocándolo en otro tubo (tubo 2). Se hizo una tercera extracción adicionando 250 μ l de hexano (tubo 1) y se agitó y se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min a 4°C, recuperando el sobrenadante y colocándolo en el tubo 2. Al tubo 2 se adicionaron 250 μ l de agua desionizada estéril fría y se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min a 4°C. Se recuperaron 400 μ l del sobrenadante en un tubo nuevo eppendorf (para análisis de HPLC) y 200 μ l del resto del sobrenadante en otro tubo nuevo eppendorf (para cuantificar carotenoides totales en el espectrofotómetro). Las muestras que contenían 400 μ l se evaporaron durante 30 min en un desecador y se resuspendieron con 200 μ l de etanol absoluto grado HPLC. Posteriormente se tomaron 100 μ l de la mezcla y se colocaron en un vial para determinar el contenido de luteína, β -criptoxantina y β -

caroteno por HPLC; los pigmentos se identificaron en base a sus características de absorción y tiempo de retención en comparación con estándares de referencia: luteína, β -criptoxantina y β -caroteno (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

Se utilizó un equipo Agilent serie 1200 con detector de arreglo de diodos (Agilent, Waldbronn, Germany), un flujo de 1.5 ml/min y una columna Symmetry C18 4.6X75 mm. Los pigmentos fueron detectados a 450 nm. La fase móvil consistió de acetonitrilo:metanol:cloruro de metilo (40:55:5 v/v/v), 0.05% de trietilamina (TEA) y 0.1% de butilhidroxitolueno (BHT) (Hart y Scott, 1995).

7.1. Extracción de clorofilas

Para la obtención de clorofilas se pesó 0.5 g del material vegetal congelado y pulverizado, se agregaron 3 ml de acetona 80% fría en condiciones de oscuridad, se homogenizó la muestra, se centrifugo a 2000 rpm durante 2 minutos y el sobrenadante se colectó en un tubo Falcon de 15 ml mientras la pastilla se lavó dos veces más agregando 1 ml de acetona 80% y centrifugando cada vez para recuperar los pigmentos remanentes (AOAC, 1997).

7.1.1. Determinación de clorofilas

Se determinó el contenido de clorofila a (Cl a), clorofila b (Cl b) y clorofila total (Cl t) mediante los valores de absorbancia del sobrenadante a 645 y 663 nm obtenidos en un espectrofotómetro BECKMAN modelo DU-640, utilizando una celdilla de cuarzo Sargent-Welch y como blanco para calibrar el equipo se utilizó

acetona al 80%. Las fórmulas empleadas para dichas determinaciones se presentan a continuación:

$$Cl\ a = 12.7 \times A_{663} - 2.7 \times A_{645}$$

$$Cl\ b = 22.9 \times A_{645} - 4.7 \times A_{663}$$

$$Cl\ t = 20.2 \times A_{645} + 8.05 \times A_{663}$$

Donde:

A_{663} es la absorbancia de las extracciones a 663 nm

A_{645} es la absorbancia de las extracciones a 645 nm

El contenido de clorofilas está dado en $\mu\text{g}/0.5$ g peso fresco (AOAC, 1997).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS VECTORES DE TRANSFORMACIÓN

Se llevó a cabo la caracterización molecular de los vectores de transformación pHK β y pBI426 con enzimas de restricción (Figura 10). El vector pHK β se derivó del plásmido pHK30 (Kuroda y col., 2001), el cual contenía el gen de la β -licopeno ciclasa (*Lcy-b*), así como el gen (*aadA*) que confiere resistencia a espectinomicina, el promotor (*Prrn*) y dos sitios de recombinación homóloga (*trnV* y *3'-rps 12/7*) en donde se llevará a cabo la integración del transgen. El vector pBI426 contenía el gen reportero (*gus*), así como el agente selectivo (*nptII*) con resistencia a kanamicina, el promotor 35S y el terminador NOS. El vector pHK β fue digerido con las enzimas *Eco RI* y *Xba I* para liberar el gen de la β -licopeno ciclasa, se obtuvo un fragmento de digestión esperado de 1500 pb aproximadamente (Figura 10a), mientras que el vector pBI426 fue digerido con las enzimas *Hind III* y *Xba I* obteniéndose un fragmento de 700 pb que correspondió al promotor 35S (Figura 10b).

Recientemente se han diseñado nuevos vectores para la transformación de cloroplastos, que permiten la inserción de transgenes en la región repetida invertida del plastoma entre las secuencias *trnV* y *3'rps12* o *trnI* y *trnA*. Los genes marcadores son flanqueados por los sitios blanco para Cre o Int, la P1 y phiC31 sitio-específico de recombinasas de fagos. Cuando se ha obtenido la transformación uniforme de todos los genomas del plástido, los genes marcadores se pueden eliminar por Cre o Int expresado en un gene nuclear (Lutz y col., 2007).

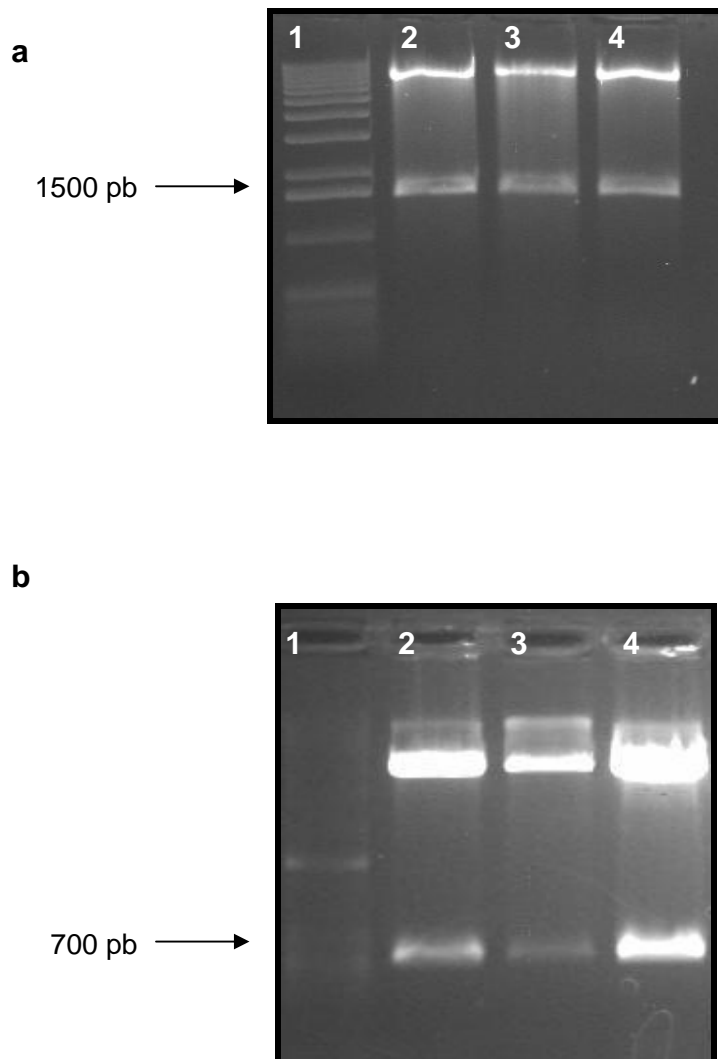


Figura 10. Caracterización molecular de los vectores pHK β y pBI426 con enzimas de restricción. a) Carril 1: Marcador de peso molecular de 1KB; carril 2-4: pHK β digerido con *EcoRI* y *XbaI*. b) Carril 1: Marcador de peso molecular de 1KB; carril 2-4: pBI426 digerido con *HindIII* y *XbaI*.

B. ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO *IN VITRO* DE *LYCOPERSICON ESCULENTUM*

Se logró establecer un sistema de cultivo *in vitro* en medio MG (Apéndice) de *Lycopersicon esculentum* cultivar Tanksley, a partir del cultivo de segmentos de hojas que se obtuvieron de plantas de aproximadamente seis semanas de edad. Se obtuvo la producción de brotes con una eficiencia de 10 a 15 brotes por segmento de hoja de tomate, llegando hasta el establecimiento de las plantas en invernadero. El método que se utilizó para llevar a cabo la asepsia de las semillas mostró muy buenos resultados ya que el material no presentó contaminaciones durante el proceso de germinación.

El tiempo total que se necesitó para obtener una plántula de *Lycopersicon esculentum* enraizada *in vitro* a partir de la desinfección fue de 3 meses aproximadamente. Estas plántulas fueron utilizadas como fuente de explante para los experimentos de transformación subsecuentes (Figura 11). Con respecto a la planta de tabaco no fue necesario establecer las condiciones de cultivo *in vitro* ya que el sistema de transformación de esta planta es de rutina (Maliga, 2004).

Rao y col., (2005) reportaron la inducción de múltiples brotes a partir de explantes de hoja de *Lycopersicon esculentum* cultivar MicroTom en 20-25 días en medio MS, suplementado con 8.9 μM de bencilaminopurina (BAP) y 1.14 μM de Ácido 3-indoleacético (IAA). La elongación de los brotes se llevó a cabo en medio MS suplementado con 4.9 μM de ácido 3-indolebutírico (IBA). La producción de raíces y el desarrollo de la flor se obtuvieron en un tiempo de 7 y 13 días, respectivamente.

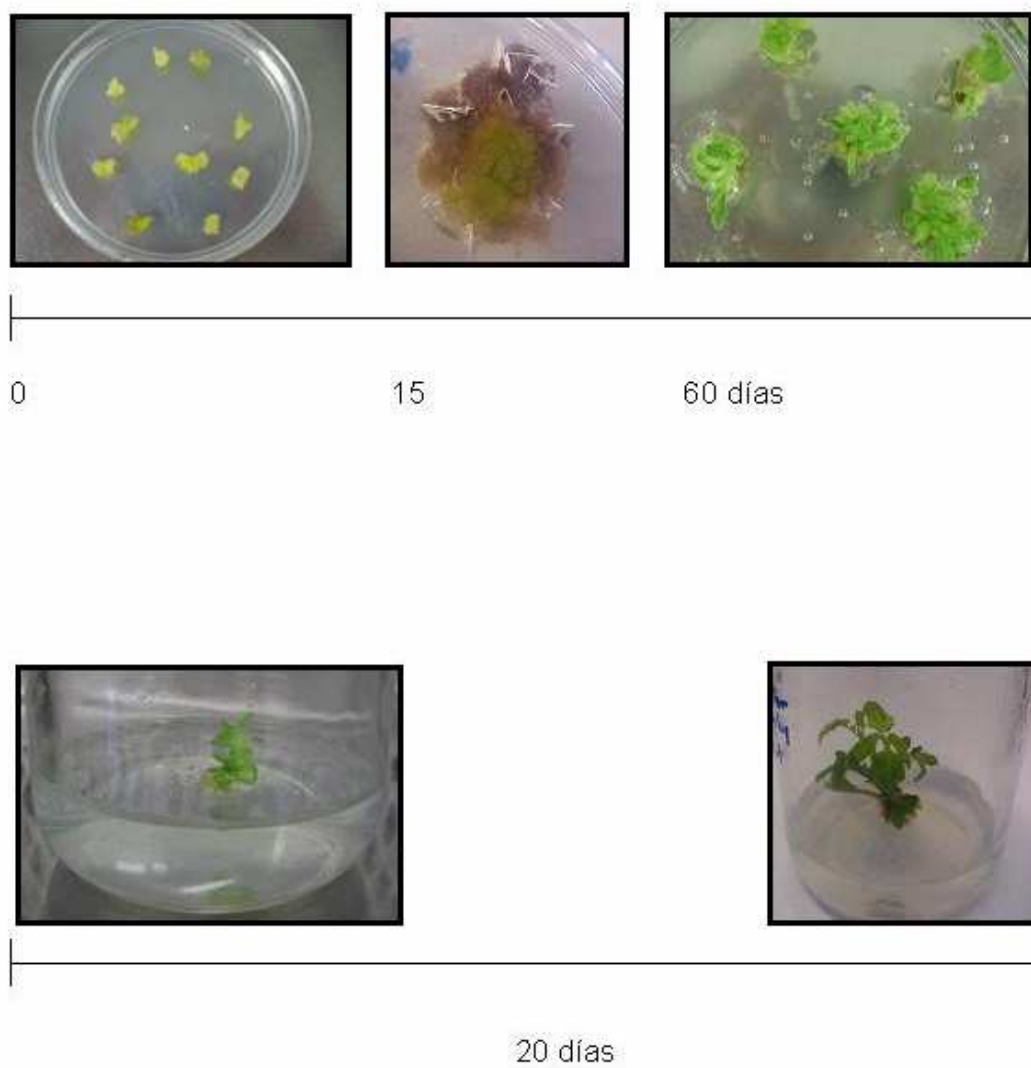


Figura 11. Establecimiento del cultivo *in vitro* de *Lycopersicon esculentum*.

El cultivo *in vitro* se estableció a partir de segmentos de hoja.

C. ESTABLECIMIENTO DEL SISTEMA DE REGENERACIÓN VÍA ORGANOGÉNESIS INDIRECTA EN PLANTAS DE *LYCOPERSICON ESCULENTUM*

1. Inducción y mantenimiento del estado de callo

Los segmentos de cotiledones que fueron expuestos a medio RMOP suplementado con 0.001 g/L de BAP y 0.0001 g/L de NAA y al medio SM suplementado con 0.002 g/L de zeatina y 0.0001 g/L de IAA no mostraron desarrollo de una estructura de callo. Solamente los segmentos de hoja expuestos al medio RMOP suplementado con 0.001 g/L de BAP y 0.0001 g/L de NAA tuvieron la capacidad de formar callo, los cuales presentaron una apariencia compacta, un color verde brillante y un desarrollo normal (Figura 12). Tomando en cuenta lo anterior, se decidió usar segmentos de hojas como fuente de explante; ya que fueron los que mostraron formación de callo. Además en la transformación de cloroplastos se requiere bombardear áreas grandes de hojas, haciendo impráctico el uso de cotiledones (Bock y col. 2007).

Plana y col., (2006) lograron optimizar un sistema de regeneración de tomate en cultivares como Campbell-28, Amalia, Lignon, y Floradle a partir de cotiledones en medio que contenía sales Murashige y Skoog, 4 mg/L de tiamina, 100 mg/L de mio-inositol y 3% de sacarosa. Después de dos o tres semanas, 60% de los explantes mostraron formación de brote, no se observó ningún cambio en las características morfológicas de regeneración de la planta y fruto. Una de las ventajas de este sistema consistió en evitar la formación de callo y permitió la recuperación normal de la planta con una eficacia de 1.45 +/- 0.05 a 2.57 +/- 0.06 brotes por explante.

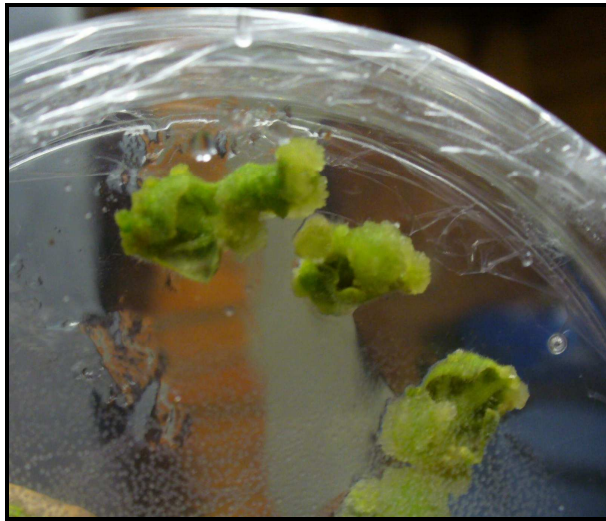


Figura 12. Respuesta a la inducción del estado de callo en tejidos de hoja de *Lycopersicon esculentum*. Segmentos de hoja expuestos al medio RMOP, suplementado con suplementado con 0.001 g/L de BAP y 0.0001 g/L de NAA tuvieron la capacidad de formar callo.

2. Producción de brotes, enraizamiento y aclimatación

Los explantes que presentaron brotación fueron transferidos a medio MG sin reguladores de crecimiento donde los brotes se elongaron y desarrollaron un sistema radicular normal. Cuatro semanas fue tiempo suficiente para que las plántulas desarrollaran un sistema radicular, dando como resultado plántulas con apariencia fuerte y saludable (Figura 13c y 13d). Las plántulas enraizadas fueron aclimatadas con un 100% de sobrevivencia y se mantuvieron en invernadero para que continuaran su ciclo de desarrollo y hasta las últimas observaciones se presentaban aparentemente normales (Figura 13e).

D. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE EXPLANTES DE TOMATE A KANAMICINA Y ESPECTINOMICINA EN RELACIÓN CON LA CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE BROTE

A las tres semanas de exposición al medio de regeneración RMOP suplementado con las concentraciones del antibiótico kanamicina (0, 50, 100, 200 y 400 mg/L) y espectinomicina utilizadas (0, 50, 100, 200 y 400 mg/L) los explantes mostraron diferencias significativas en su coeficiente de formación de brote (CFB). Los efectos del antibiótico fueron notorios a partir de los primeros 15 días, observándose una interrupción en la formación de callo a concentraciones elevadas de antibiótico (100, 200 y 400 mg/L), contrastando con el control en los que ya se observaba la aparición de los primeros brotes. En la Figura 14 se observa que existe una relación inversa entre la concentración del antibiótico en el medio y el índice de capacidad de formación de brote (CFB). A 0 mg/L de kanamicina la capacidad de formación de brote fue de 1.7%, a 50 mg/L disminuyó

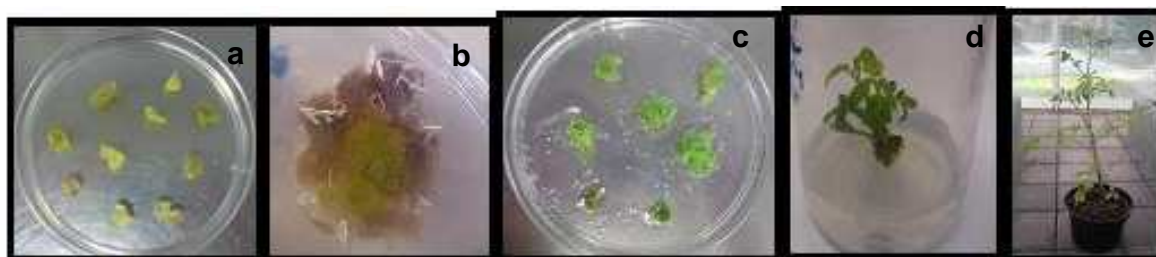


Figura 13. Regeneración completa de *Lycopersicon esculentum* vía organogénesis indirecta a partir de segmentos de hoja. a) Obtención del explante inicial, b) Inducción del estado de callo, c) Producción de brotes, d) Enraizamiento, e) Aclimatación.

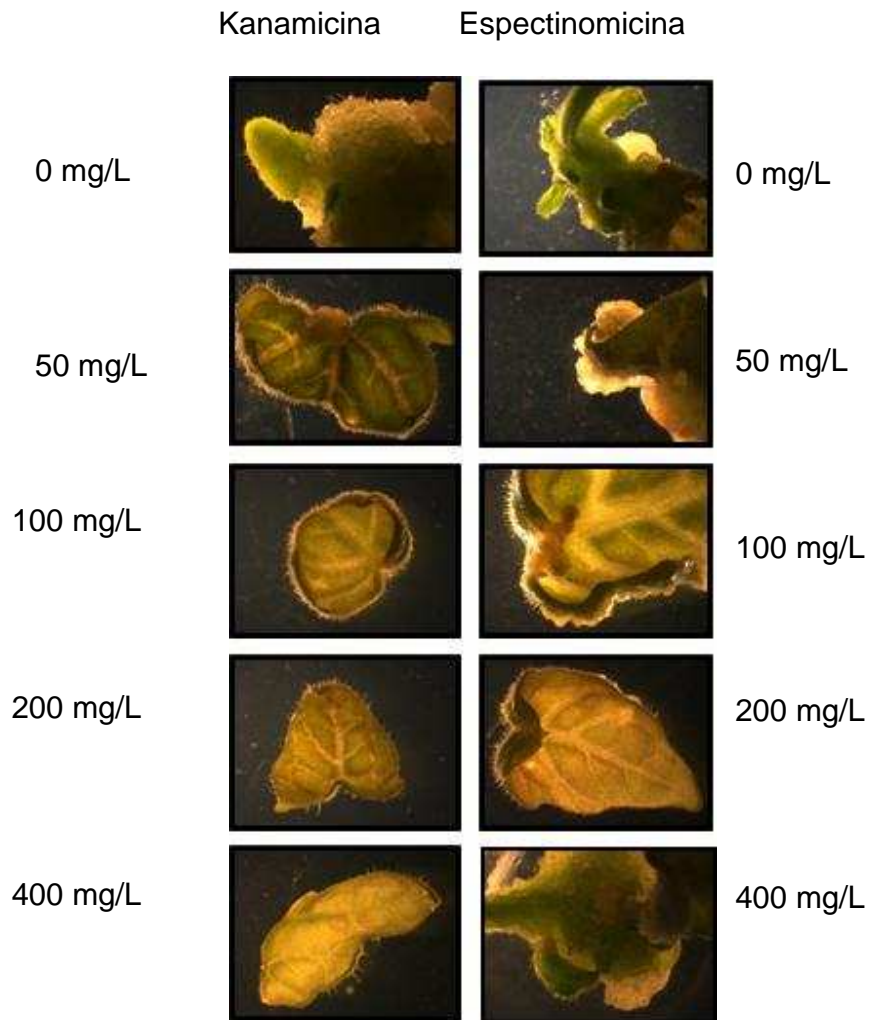


Figura 14. Sensibilidad de explantes de tomate al antibiotico kanamicina y espectinomicina en relación con la capacidad de formación de brote.

drásticamente a 0.32%. A 100 mg/L disminuyó significativamente a 0.18% y finalmente con 200 mg/L y 400 mg/L la capacidad de formación de brote fue de 0% en ambas concentraciones (Figura 15).

Tomando en cuenta lo anterior, se seleccionó la concentración de 50 mg/L de kanamicina para llevar a cabo una preselección de los explantes transformados. 100 mg/L podría resultar una dosis tóxica para el tejido en la primera etapa de selección, por lo que se decidió usarla como un segundo tratamiento selectivo, después de que los explantes se hubieran recuperado en el medio de regeneración. Por otro lado, a 0 mg/L de espectinomicina la capacidad de formación de brote fue de 1.2%, a 50 mg/L disminuyó a 0.928%. A 100, 200 y 400 mg/L de espectinomicina no hubo diferencia significativa en la capacidad de formación de brote obteniéndose valores de 0.422, 0.23 y 0.324%, respectivamente (Figura 16). En este caso, para llevar a cabo la etapa de selección de los explantes transformados, se seleccionó una concentración de espectinomicina de 400 mg/L ya que fue la dosis más confiable que permitió asegurar la recuperación de plantas transplastómicas y con una alta capacidad de formación de brote comparada con la concentración de 200 mg/L.

E. TRANSFORMACIÓN DE EXPLANTES DE TABACO Y TOMATE MEDIANTE BIOBALÍSTICA

Hojas estériles de *Lycopersicon esculentum* cultivar Tanksley (Figura 17) y *Nicotiana tabacum* var. Xanti (Figura 18) fueron bombardeadas con los vectores pHK β y pBI426 (materiales y métodos).

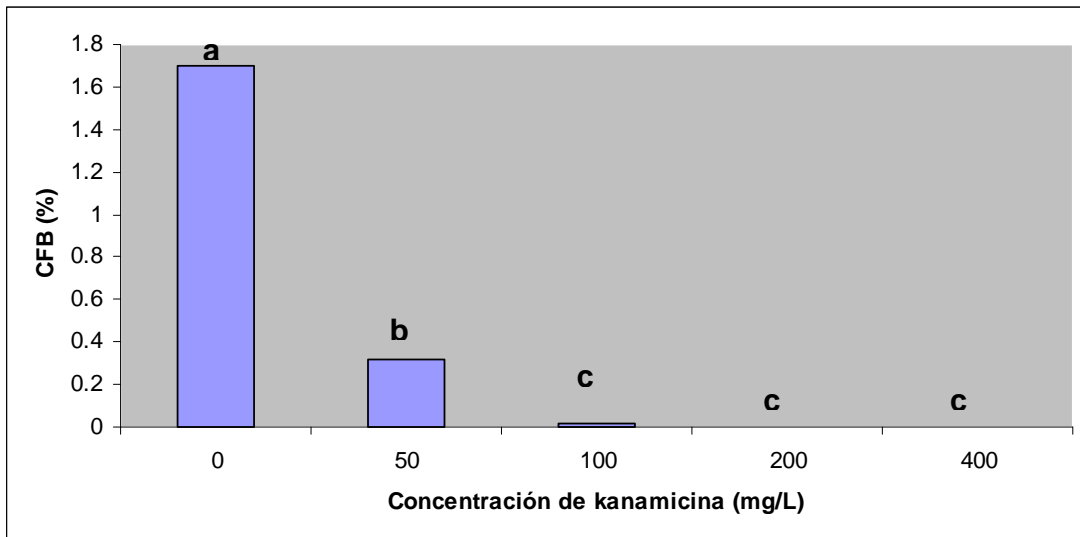


Figura 15. Sensibilidad de explantes de *Lycopersicon esculentum* al antibiótico kanamicina. Valores seguidos con la misma letra no difieren estadísticamente a $p= 0.05$ de acuerdo a la prueba de diferencias mínimas significativas (dms).

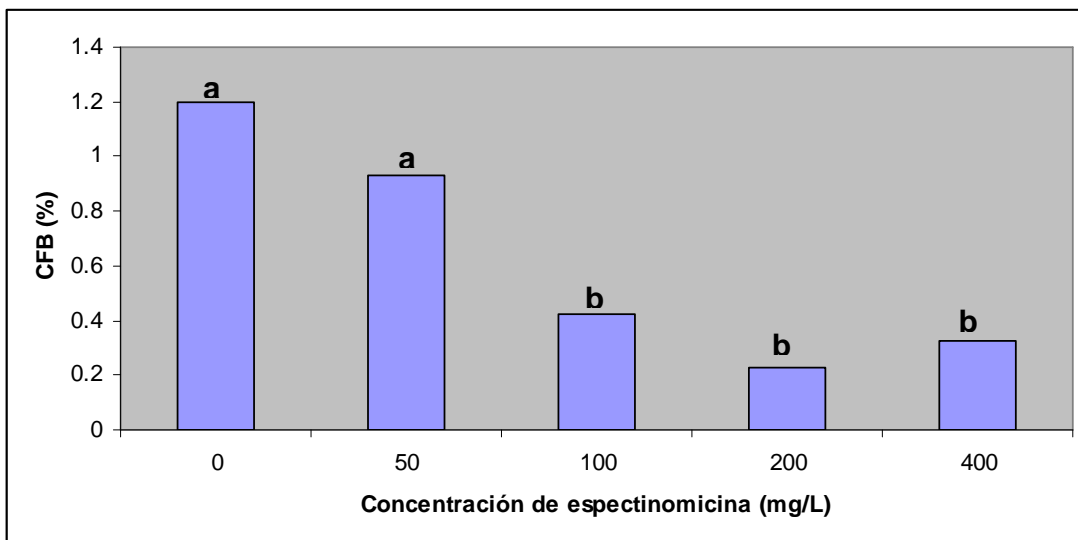


Figura 16. Sensibilidad de explantes de *Lycopersicon esculentum* al antibiótico espectinomicina. Valores seguidos con la misma letra no difieren estadísticamente a $p= 0.05$ de acuerdo a la prueba de diferencias mínimas significativas (dms).

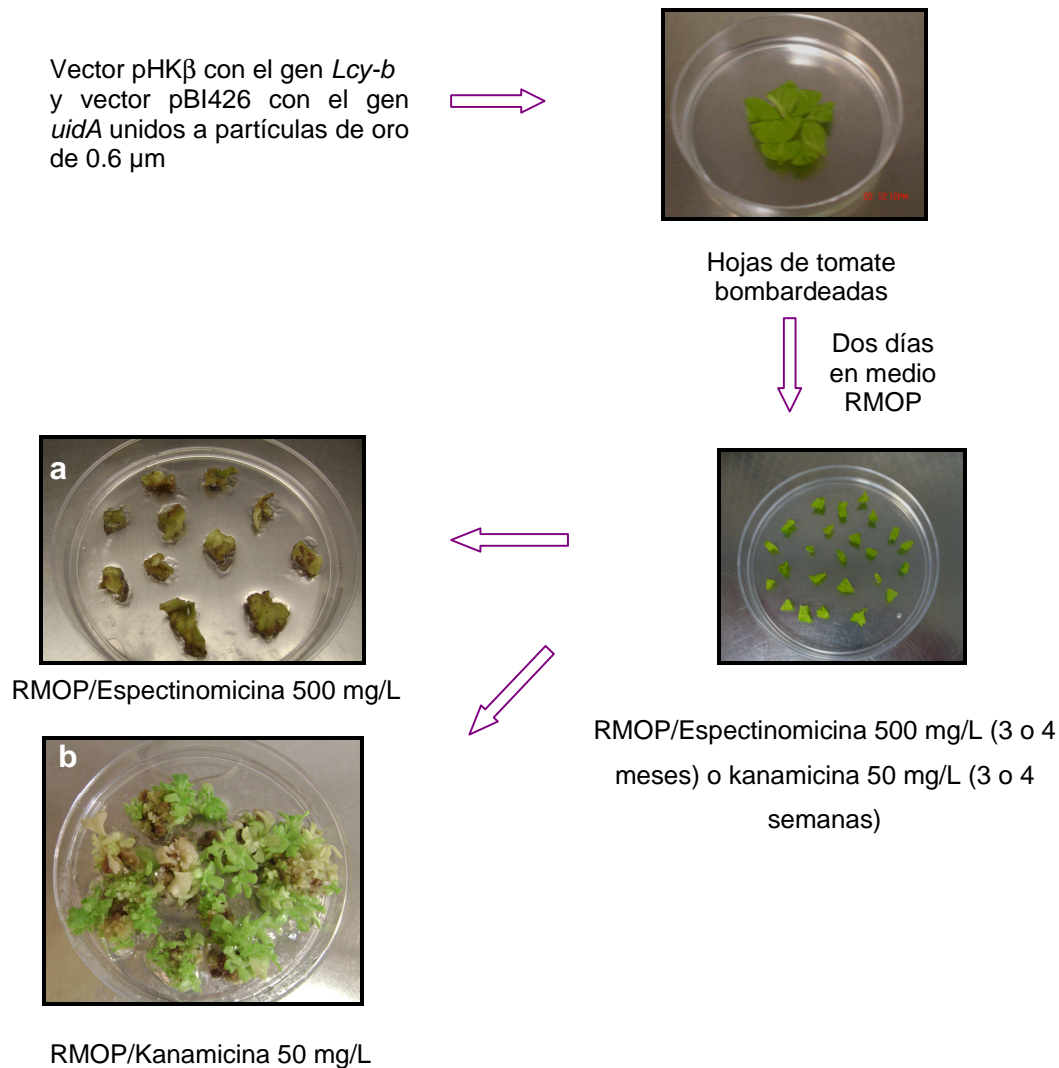


Figura 17. Esquema de la transformación de cloroplasto en plantas de tomate. Los vectores pHK β y pBI426 fueron utilizados para llevar a cabo los experimentos de biobalística en hojas de tomate. a) Explantes bombardeados con el plásmido pHK β seleccionados con espectinomicina. b) Brotes de explantes bombardeados con el plásmido pBI426 seleccionados con kanamicina.

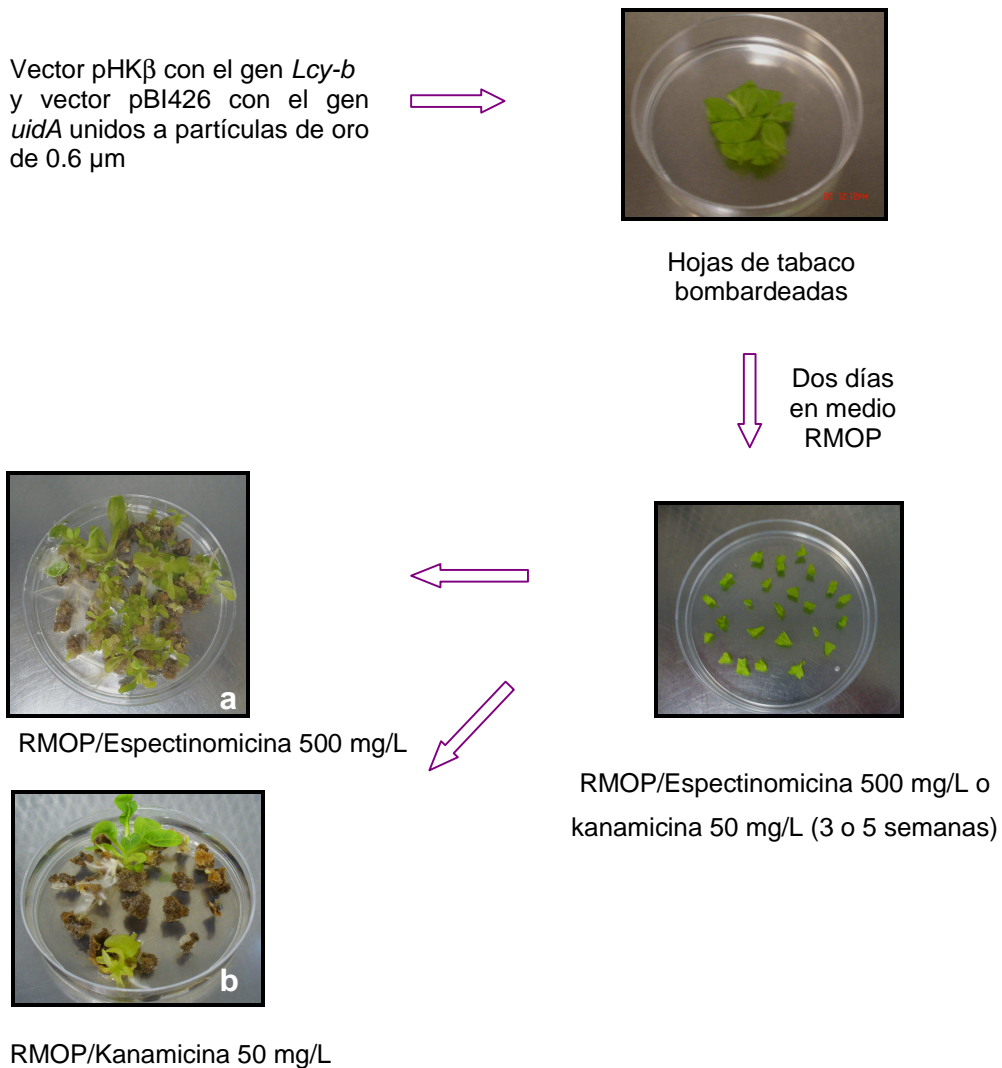


Figura 18. Esquema de la transformación de cloroplasto en plantas de tabaco. Los vectores pHK β y pBI426 fueron utilizados para llevar a cabo los experimentos de biobalística en hojas de tabaco. a) Brotes de explantes bombardeados con el plásmido pHK β seleccionados con espectinomicina. b) Brotes de explantes bombardeados con el plásmido pBI426 seleccionados con kanamicina.

Cada evento de bombardeo consistió de 30 repeticiones con el vector pHK β y 5 repeticiones con pBI426, a una distancia de 11 cm, una presión de 900 psi y una concentración de ADN de 1 μ g/ μ l. Los explantes que se bombardearon con el vector pBI426 sirvieron como control para realizar los análisis histológicos, mientras que los explantes bombardeados con el vector pHK β fueron los que se analizaron molecularmente.

Bock y col., (2001) reportaron que para llevar a cabo la transformación de cloroplasto de tomate es importante tener en cuenta: (1) el uso de las condiciones de luz extremadamente bajas durante la etapa de selección (2) la extensión drástica de la fase de selección primaria de tres o cuatro meses comparados con tres o cinco semanas en tabaco (3) el tamaño significativamente pequeño de las hojas expuestas al medio de cultivo durante la primera selección comparado con la transformación de plástidos de tabaco (tamaño óptimo de 3x3 mm) y (4) la optimización de la selección y regeneración de la planta.

Kuchuk y col., (2005) lograron la transformación genética de cloroplasto de *Solanácea rickii* mediante el método de biolística, con el gen *aadA*; resistente a estreptomicina y espectinomicina. Las plantas transplastómicas de *Solanácea rickii* no presentaron diferencias morfológicas comparadas con plantas sin transformar.

Daniell H. y col., (2004) bombardearon cotiledones y hojas de algodón con el vector pDD-GhaphA-6/nptII, los cuales fueron seleccionados con diferentes concentraciones de espectinomicina; sin embargo, no se recuperó ningún callo o plantas transplastómica debido al efecto tóxico del antibiótico sobre los explantes de algodón. En cambio, cuando se bombardeo callo embriogénico de algodón con

el mismo vector y seleccionando con kanamicina se obtuvieron líneas transplastómicas.

Kanamoto y col., (2006) describieron el desarrollo de un sistema de transformación de plástido en lechuga, cv. Cisco. En promedio, por cada bombardeo obtuvieron una planta transplastómica de lechuga. Además demostraron que los cloroplastos de la hoja de la lechuga pueden expresar el transgene que codifica para la GFP aproximadamente en un 36% de la proteína total soluble. Todas las plantas transplastómicas T0 fueron fértiles y la progenie T1 demostró estabilidad uniforme del transgene en el genoma del cloroplasto.

1. Análisis histológico de explantes de tomate y tabaco con el plásmido pBI426

Una vez bombardeados los explantes de tomate y tabaco con el plásmido pBI426 se evaluó el número de foci (manchas o puntos azules) como producto de la expresión transitoria del gen *gus*, la cual fue considerada como una unidad de expresión (Hagio y col., 1995).

En la Figura 19 se observan de manera abundante y homogénea los puntos azules (foci) sobre las hojas de tabaco y tomate como producto de la reacción enzimática llevada a cabo por la enzima β -glucuronidasa.

Tomando en cuenta lo anterior, podemos decir que tanto la concentración de DNA del plásmido, la presión y la distancia utilizados, fueron buenas ya que los índices de expresión transitoria obtenidos con el plásmido pBI426 fueron altos en los explantes de tabaco y tomate.

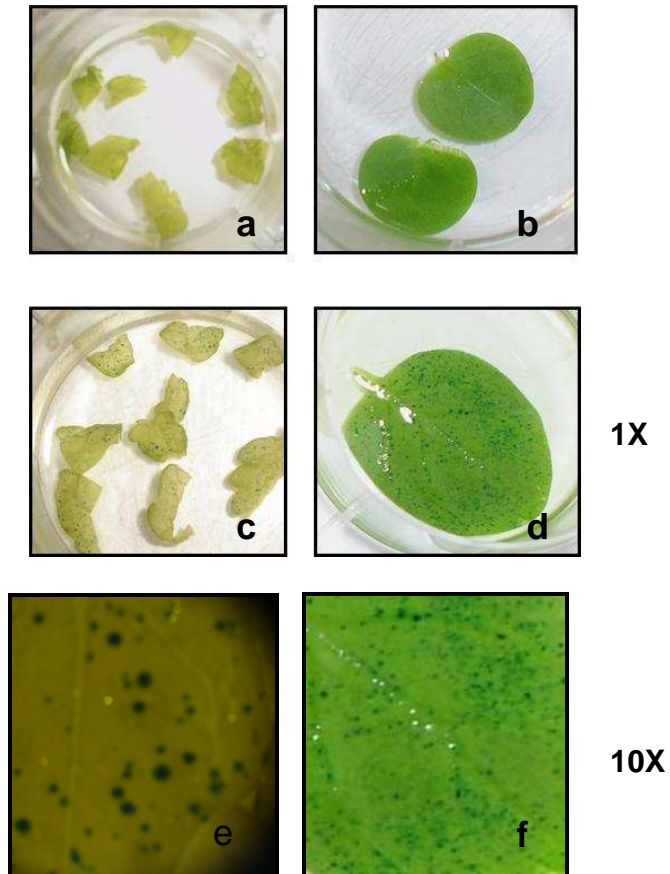


Figura 19. Expresión del gen gus en explantes de tomate y tabaco. a) Explantes de tomate sin bombardear, b) Explantes de tabaco sin bombardear, c) Explantes de tomate bombardeados con el plásmido pBI426, d) Explantes de tabaco bombardeados con el plásmido pBI426, e y f) Explantes de tomate y tabaco observados con un estereoscopio bifocal, respectivamente.

Como se ha reportado, la expresión transitoria de un gen es relativamente fácil de producirse; sin embargo, la recuperación de transformantes estables se presenta en porcentajes muy bajos (Russel y col., 1992).

2. Selección y regeneración de explantes transformados de tomate y tabaco

El proceso de selección de los explantes de tomate y tabaco bombardeados con el vector pHK β se realizó en varias etapas. En la ingeniería transplastómica se deben alterar uniformemente todas las copias del genoma para que exista una transformación genética estable, o sea que en todas las copias se encuentre integrado el transgen. Esto se obtiene mediante un buen sistema de selección con el antibiótico apropiado (Maliga, 2003). La primera ronda de selección consistió en colocar los explantes a medio RMOP con el antibiótico espectinomicina (500 mg/L) para inducir la selección de las plantas transplastómicas (Bock, 2001; Svab y Maliga, 1993), en esta etapa las células no transformadas formaron callos blancos de bajo crecimiento, mientras que las células transformadas formaron callos verdes con capacidad de formación de brote. Es importante mencionar que los explantes de tabaco se seleccionaron a una intensidad de luz de 70 μ E, mientras que los de tomate se mantuvieron con una intensidad de luz más baja de 25 μ E debido a que son muy sensibles a la luz en este estado (Bock y col. 2001). Posteriormente, los explantes de la primera etapa de selección que formaron callos verdes se colocaron en medio RMOP con espectinomicina (500 mg/L) y el mismo tejido se colocó con espectinomicina (500 mg/L) y estreptomycin (500 mg/L) (Svab y col., 1993), esto con la finalidad de diferenciar transformantes de posibles mutantes espontáneas (Figura 20). Las clonas transformantes fueron

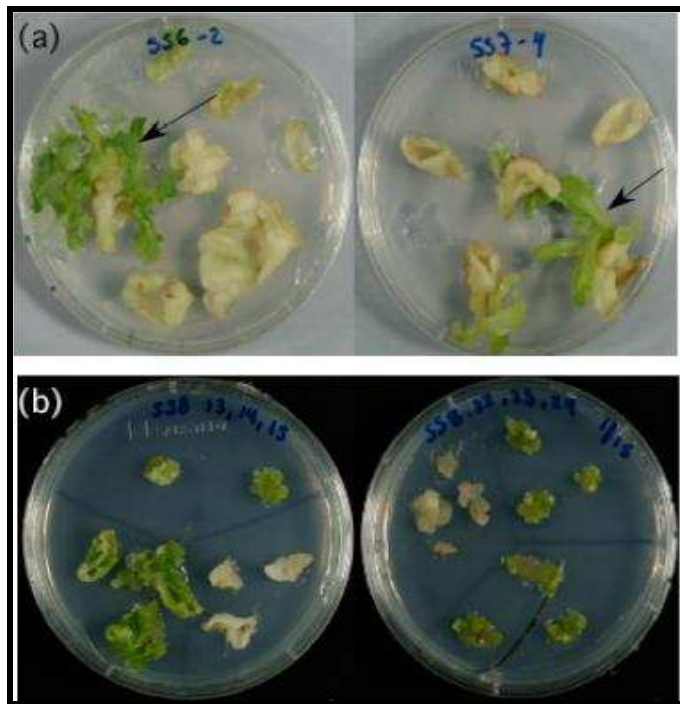


Figura 20. Selección y regeneración de clonas transplastómicas. (a) Los explantes resistentes a espectinomicina regeneraron después de 4-6 semanas después de bombardeados; (b) Las explantes verdes provenientes de la regeneración en medio con espectinomicina y estreptomina indicaron la transformación de su genoma plastídico mientras que los explantes blancos correspondieron a mutantes espontáneas.

resistentes a estreptomicina y espectinomicina, mientras que las mutantes espontáneas fueron sensibles a la estreptomicina. Durante esta etapa, los primeros callos de tomate eran de color verde pero a los cuatro meses en selección mostraron índices severos de oxidación y no fue posible regenerar ningún material resistente a la selección con el antibiótico (Figura 21). Lo anterior pudo deberse a que no se llevó a cabo una correcta integración del transgen por el mecanismo de recombinación homóloga. Una de las principales limitaciones en esta tecnología es la carencia de secuencias completas del genoma del cloroplasto en algunas plantas de importancia económica. Estas secuencias son necesarias para identificar las regiones intergénicas óptimas donde se llevará a cabo la integración de transgenes por recombinación homóloga; además, conocer la regulación de secuencias endógenas para una óptima expresión del transgen (Daniell y col., 2005; Maier y Schmitz-Linneweber 2004). En plantas superiores, cerca del 50% de cada genoma del cloroplasto, contiene regiones no codificantes y regiones reguladoras (Saski y col., 2005; Heces y col., 2006; Daniell y col., 2006).

Por lo mencionado anteriormente, solamente fue posible la regeneración de los callos verdes transformantes de tabaco que se colocaron en medio MG sin reguladores y suplementado con Espectinomicina (500 mg/L) hasta la aparición de una raíz vigorosa. Las plantas regeneradas se transfirieron a maceta y se llevaron a invernadero. Mostraron cambios fenotípicamente visibles en el color de sus hojas, hubo pérdida de clorofila (Figura 22). Por otro lado, se logró la regeneración de callos de tomate y tabaco bombardeados con el vector pBI426 en medio MG suplementado con 100 mg/L de kanamicina.

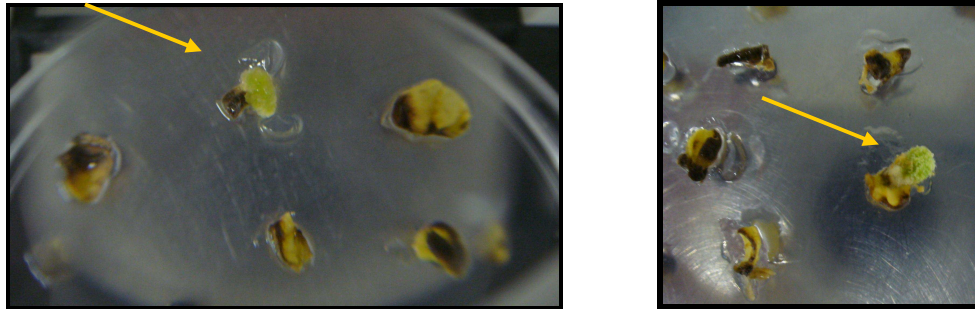


Figura 21. Formación de callos de tomate en medio RMOP seleccionados con espectinomicina (500 mg/L).



Figura 22. Fenotipos de plantas de tabaco. a) Tabaco transplastómico, b) tabaco sin transformar.

Los callos mostraron una apariencia sana e inicios de brotación durante los subcultivos en presencia del antibiótico. Se transformaron 1600 explantes de tomate con el plásmido pHK β y se obtuvieron 30 brotes resistentes a espectinomicina durante la primera etapa de selección, lo que representa el 1.87%. En las rondas posteriores de selección no fue posible la regeneración de estos explantes. En el caso de tabaco se transformaron 130 explantes y el número de brotes resistentes a espectinomicina durante la selección fue de 20, lo que nos da un 15.3% de eficiencia de transformación. Los brotes seleccionados fueron designados como tp β 1, tp β 2, hasta tp β 20. Los materiales seleccionados fueron analizados molecularmente para comprobar la presencia del transgen.

F. ANÁLISIS MOLECULAR DE LAS PLANTAS TRANSFORMADAS

1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los 20 brotes de tabaco sobrevivientes a la selección que fueron bombardeados con el plásmido pHK β se analizaron mediante PCR para corroborar la presencia del gen *Lcy-b* en estas plantas. En la Figura 23 se observó en los carriles 1 al 7 la amplificación de un fragmento de 700 pb correspondiente al gen *Lcy-b* de 7 posibles candidatas que fueron transformadas con el plásmido pHK β (tp β 1, tp β 2, tp β 3, tp β 4, tp β 5, tp β 6 y tp β 7), el resto de las muestras no amplificaron el gen *Lcy-b* por lo que no se tomaron en cuenta para los análisis posteriores. La presencia de estos fragmentos de manera preliminar sugiere que los materiales de donde se obtuvo el DNA es transplastómico. Todas las muestras anteriores fueron evaluadas posteriormente mediante un análisis tipo Southern blot para confirmar la integración del gen.

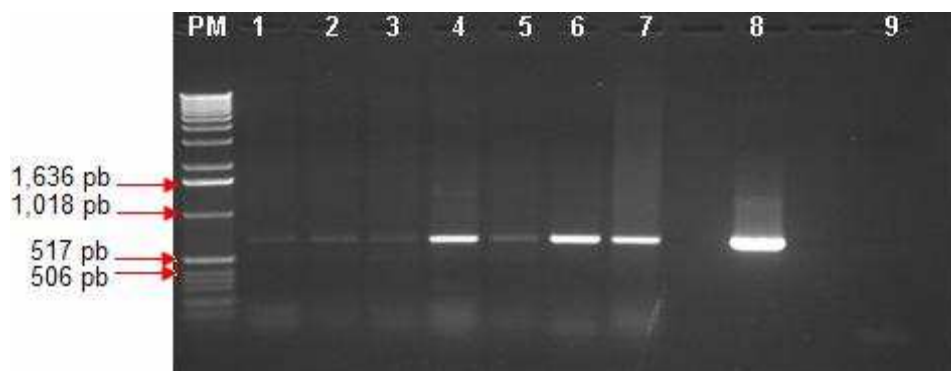


Figura 23. Amplificación del fragmento de 700 pb del gen *Lcy-b* en plantas de tabaco transplastómicas. Carriles 1-7) Muestras de candidatas $tp\beta 1$, $tp\beta 2$, $tp\beta 3$, $tp\beta 4$, $tp\beta 5$, $tp\beta 6$ y $tp\beta 7$, respectivamente, 8. Control positivo plásmido $pHK\beta$, 9. Control negativo (agua); PM: marcador molecular 1KB (In vitrogen).

2. Análisis tipo Southern blot

El análisis Southern blot confirmó la integración estable del gen *Lcy-b* en el genoma plastídico de plantas de *Nicotiana tabacum*, así como el estado de homoplasmía de estas plantas. En la Figura 24 se observa el mapa parcial del genoma plastídico sin transformar como blanco para el vector pHK β . La Figura 25 muestra el autoradiograma donde se detectaron señales positivas del carril 1 al 5, correspondientes a la hibridación de la sonda 16S con el plásmido pHK β . Estas muestras presentaron bandas de 4.0 kb y 1.36 kb que correspondieron a plantas transplastómicas, mientras que en el carril 6 se observó una banda de 3.0 kb que correspondió a una planta sin transformar (tipo silvestre). Las muestras 1, 2, 3, 4 y 5 presentaron un estado homoplastómico, es decir que en el genoma de los cloroplastos se encuentra integrado el gen *Lcy-b* y el gen *aadA*. Esto fue posible al seleccionar los explantes en tres ciclos, bajo una presión selectiva con espectinomicina (500 mg/L) y estreptomycinina (500 mg/L).

Es importante mencionar que la muestra 1 también presentó una banda de 3.1 kb aproximadamente que corresponde al patrón de una planta tipo silvestre. La persistencia de ésta señal incluso después de múltiples rondas de selección, se presenta con frecuencia en líneas transplastómicas y es causada generalmente no porque no esté presente un estado heteroplastómico, sino por la presencia de ADN promiscuo del plastido en uno de los otros dos genomas de la célula de la planta. Está establecido que durante la evolución los fragmentos grandes de DNA del cloroplasto se han integrado en el genoma nuclear y mitocondrial por lo que el DNA promiscuo no funcional puede producir bandas correspondientes a DNA del

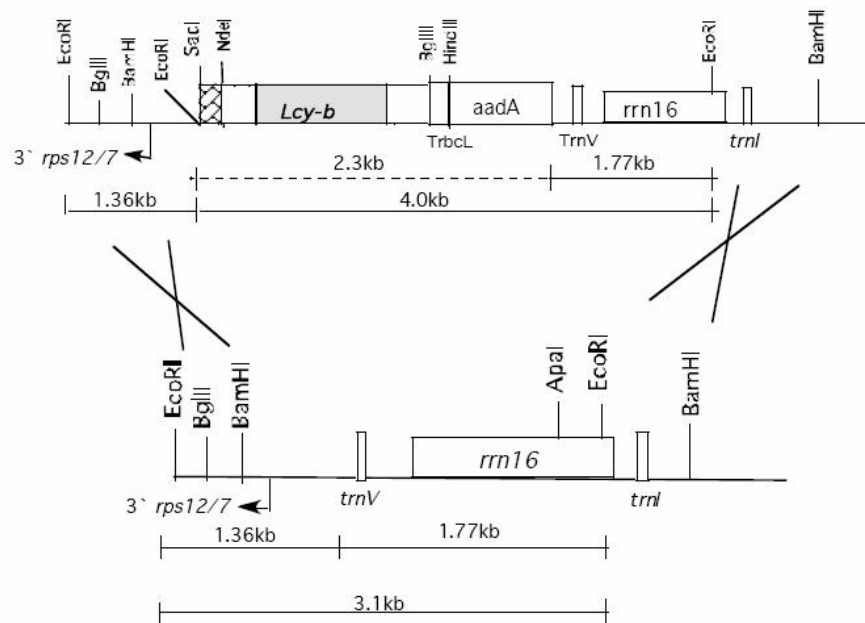


Figura 24. Mapa parcial del genoma plastidico sin transformar como blanco para el vector pHK β . Las líneas cruzadas indican las regiones donde se llevó la integración del transgen por recombinación homóloga vía LTR y RTR (por sus siglas en inglés left targeting regions y right targeting regions).

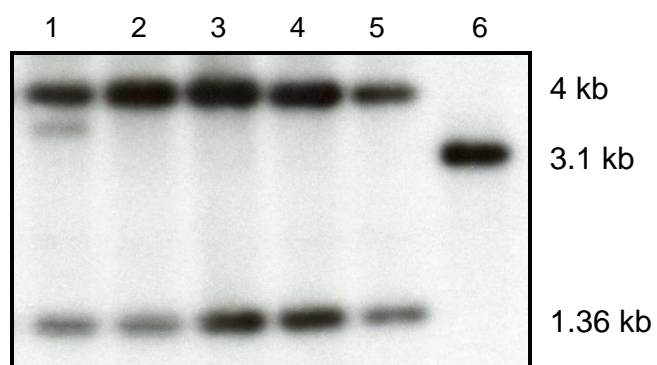


Figura 25. Análisis tipo Southern blot de líneas transplastómicas de tabaco.

El ADN total fue digerido con *EcoRI* y se hibridó con la sonda detectando la región del genoma del plástido que flanqueo el sitio de inserción del transgen. Carriles 1-5) Muestras tp β 1, tp β 2, tp β 3, tp β 4 y tp β 5; 6. Muestra sin transformar.

tipo silvestre en el análisis de líneas transplastómicas con estado homoplastómico (Bock y col., 2007).

Tomando en cuenta el número total de hojas bombardeadas de tabaco y el número de plantas que resultaron positivas en el análisis Southern blot, observamos que la eficiencia de transformación de plantas transplastómicas de tabaco fue de 3.8%.

3. Análisis tipo Northern blot

La regulación de RNAm en plástidos es un importante mecanismo postranscripcional. Por lo tanto se evaluó la acumulación de RNAm del gen *Lcy-b* en las plantas transplastómicas de tabaco (Figura 26).

En la Figura 26a que corresponde a la extracción de RNA, se observa que las muestras 1, 2, 3, 4, 5 y 6 contienen el RNA ribosomal 23S y 16S del plastido. En la Figura 26b se observa la señal positiva de las cinco muestras a la hibridación con la sonda para β -licopeno ciclasa encontrando la presencia de RNAm monocistrónico que contiene el gen *Prrn* (0.9 kb) y el transcrito dicistrónico que contiene el gen *aadA* (2.0kb), confirmando así la expresión del RNAm de *Lcy-b* en cloroplastos de plantas de tabaco.

De acuerdo a lo reportado por Bock y col., (2007) mencionan que este tipo de co-transcripción se observa comúnmente en las líneas transplastómicas que cargan genes de selección y genes de interés en la misma orientación.

Esto coincide con los resultados del análisis tipo Northern blot realizado a las muestras de tabaco transplastómico que se obtuvieron de la transformación con el

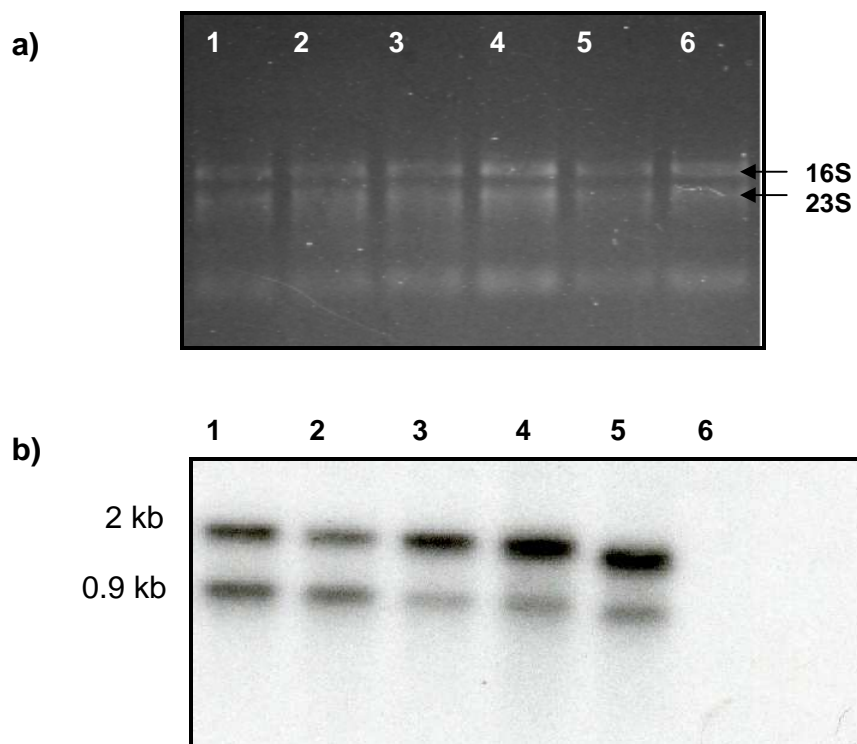


Figura 26. Acumulación del RNAm del gen *Lcy-b* en plastidos de plantas de tabaco. Carriles 1-5) Muestras tp β 1, tp β 2, tp β 3, tp β 4 y tp β 5; 6. Muestra sin transformar (control negativo).

plásmido pHK β , el cuál contiene el gen de selección aminoglicosido 3'-adeniltransferasa (*aadA*) que confiere resistencia a espectinomicina, bajo el control del promotor RNAr plastídico (*Prrn*) y una región 3'-no traducida del gen plastídico (*atpB*) de la subunidad β de la ATP sintasa para una eficiente transcripción y estabilización de RNAm.

G. ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE CAROTENOIDES EN HOJAS DE TABACO TRANSPLASTÓMICO

Para conocer los niveles de luteína, β -criptoxantina y β -caroteno en las líneas transplastómicas de tabaco que expresaron el gen *Lcy-b* se llevó a cabo la extracción y cuantificación del contenido de carotenoides en estas plantas y en plantas sin transformar. Para llevar a cabo la cuantificación de carotenoides en estas plantas primeramente se corrieron los estándares de luteína, β -criptoxantina y β -caroteno por HPLC. En la Figura 27 se observó el perfil cromatográfico de los estándares comerciales de luteína, β -criptoxantina y β -caroteno. Se observaron 3 picos principales con un tiempo de retención de 1.0, 2.4 y 6.1 min, respectivamente. Posteriormente se corrieron las muestras de las plantas transplastómicas de tabaco y una planta no transplastómica como control obteniéndose los cromatogramas, como se muestra en la Figura 28a y 28b, respectivamente. Es importante mencionar que los tiempos de retención de las muestras analizadas correspondieron con los tiempos de retención de los estándares de luteína, β -criptoxantina y β -caroteno. Una vez analizadas cada una

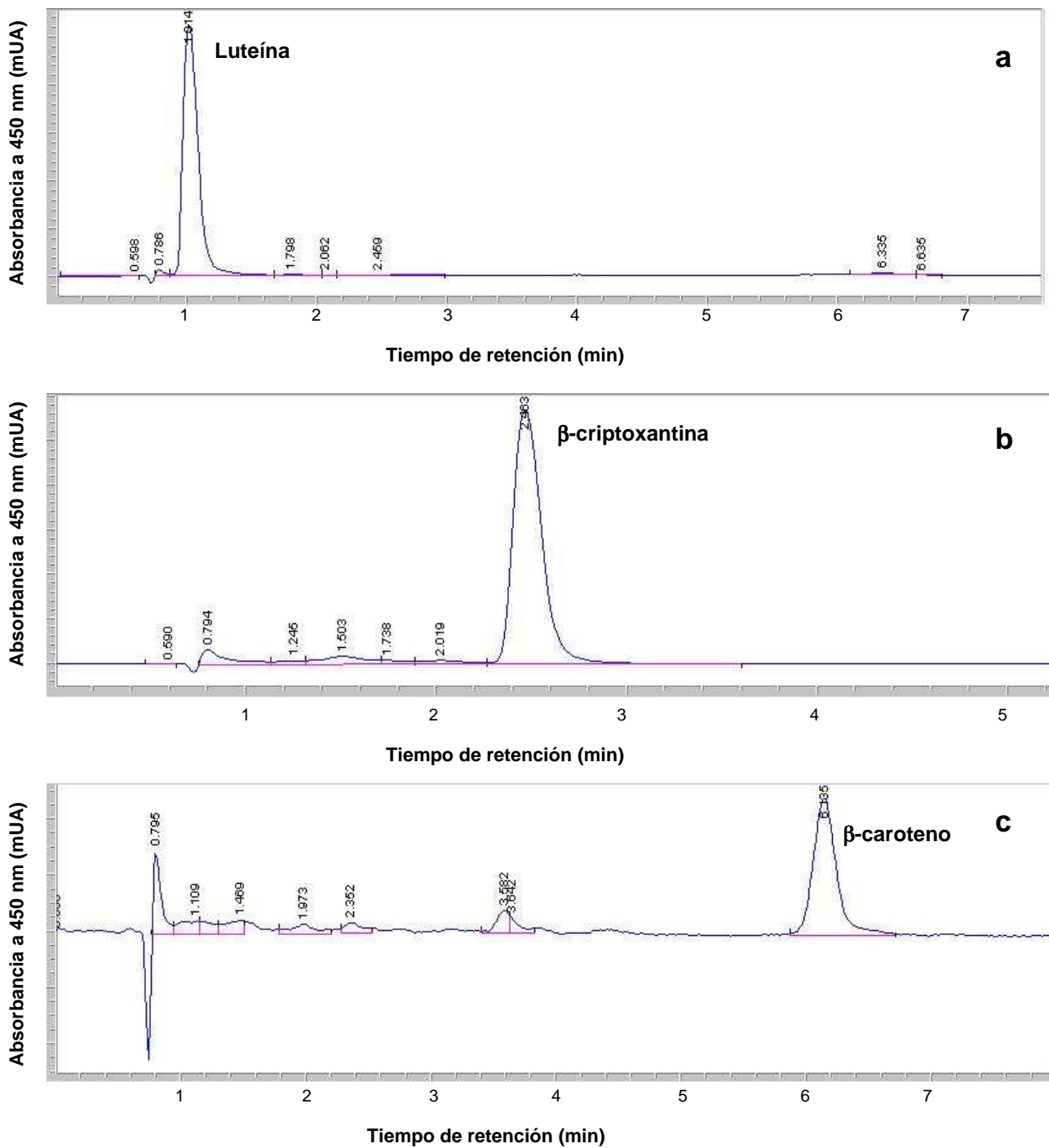


Figura 27. Perfil cromatográfico de estándares por HPLC en la columna Symmetry C18. a, b y c) Perfil cromatográfico del estándar comercial de luteína, β-criptoxantina y β-caroteno respectivamente.

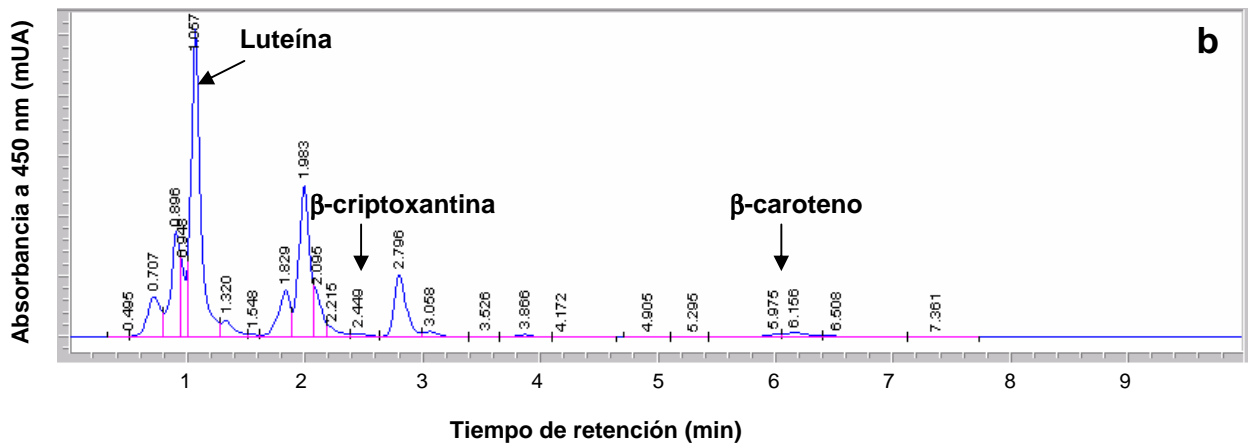
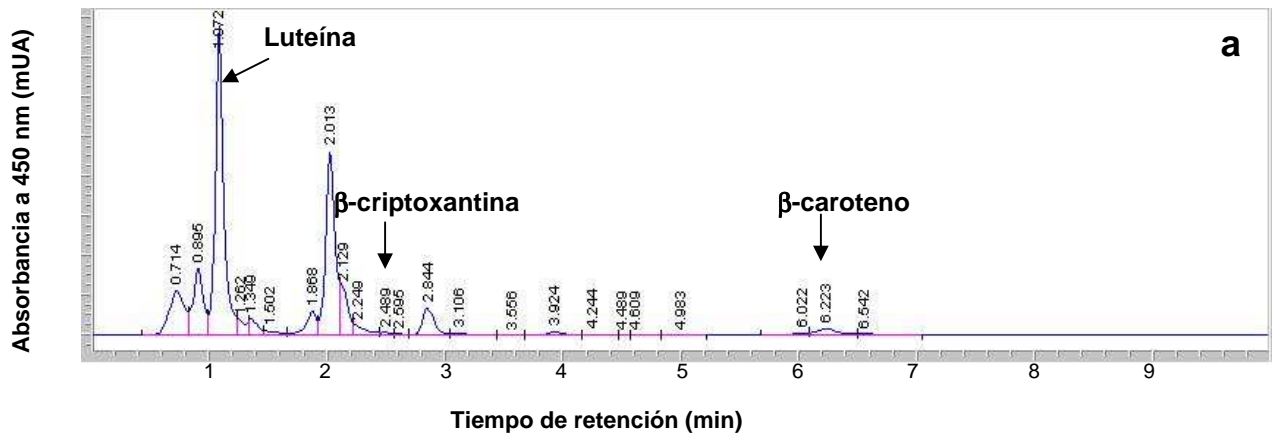


Figura 28. Cromatograma de la separación de carotenoides en tabaco por HPLC en la columna Symmetry C18. a) Tabaco transplastómico, b) Tabaco sin transformar (control negativo).

de las muestras se observó que el nivel de β -caroteno osciló entre 2.93 y 6.97 $\mu\text{g/g}$ de peso seco, mientras que β -criptoxantina y luteína oscilaron entre 0.17 y 4.31 $\mu\text{g/g}$ y 0.07 y 0.4 $\mu\text{g/g}$ de peso seco, respectivamente (Cuadro 8).

De manera general, en la muestra tp β 4 el contenido de β -caroteno (pro-vitamina A) incrementó casi el doble comparado con la plantas sin transformar, además presentó los niveles más altos de β -criptoxantina y β -caroteno en comparación con el resto de las muestras analizadas.

Bock y col. (2007) reportaron un incremento de cuatro veces más los contenidos de provitamina A en plástidos de tomate mediante la transformación del genoma de cloroplastos.

Nuestros resultados muestran que se estableció una relación entre el nivel de transcrito con respecto a la cantidad de β -caroteno, ya que se comprobó que la muestra tp β 4 fué la que presentó el nivel más alto de transcrito de *Lcy-b* (Figura 26b) así como el nivel más alto de β -caroteno (Tabla 8).

Por lo que podemos concluir que probablemente la acumulación de pigmentos está en función del nivel de transcrito de *Lcy-b*.

Cuadro 8. Contenido de carotenoides en hojas de tabaco sin transformar y transplastómicas ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco). Los valores fueron medias de tres extracciones de pigmentos y análisis independientes de HPLC.

	$\text{Tp}\beta_1$	$\text{tp}\beta_2$	$\text{tp}\beta_3$	$\text{tp}\beta_4$	$\text{tp}\beta_5$	Planta sin transformar
Luteína	0.0923 \pm 0.0031	0.076 \pm 0.0042	0.0835 \pm 0.0035	0.409 \pm 0.0014	0.223 \pm 0.0014	0.4065 \pm 0.0049
β -criptoxantina	0.616 \pm 0.0084	0.1763 \pm 0.0029	1.206 \pm 0.0028	4.312 \pm 0.0028	3.6035 \pm 0.0021	0.52 \pm 0.0197
β -caroteno	4.3335 \pm 0.0459	2.93 \pm 0.0424	3.998 \pm 0.0028	6.9725 \pm 0.0148	4.95 \pm 0.0424	4.0435 \pm 0.0091
Clorofila a	63.45 \pm 0.0282	59.83 \pm 0.0141	59.36 \pm 0.0282	57.845 \pm 0.0353	61.57 \pm 0.0282	59.76 \pm 0.0424
Clorofila b	99.335 \pm 0.0212	113.05 \pm 0.0565	114.96 \pm 0.0141	36.545 \pm 0.0212	66.46 \pm 0.0424	78.44 \pm 0.0282
Carotenoides totales	5.044 \pm 0.0049	3.1845 \pm 0.0035	5.286 \pm 0.0007	11.692 \pm 0.0007	8.774 \pm 0.0021	4.945 \pm 0.0353
Clorofila total	163.5 \pm 0.5656	173.26 \pm 0.0353	174.545 \pm 0.0070	94.655 \pm 0.0353	128.35 \pm 0.0424	138.3 \pm 0.2828

VII. CONCLUSIONES

1) Se logró establecer un sistema de regeneración vía organogénesis indirecta en plantas de *Lycopersicon esculentum* a partir de segmentos de hoja expuestos al medio RMOP suplementado con 0.001 g/L de BAP y 0.0001 g/L de NAA, mostrando capacidad de formación de callo.

2) Se logró la regeneración de callos de tabaco bombardeados con el vector pHK β resistentes a espectinomicina (400 mg/L) en medio MG, mientras que callos de tomate seleccionados con espectinomicina (400 mg/L) en medio MG no regeneraron obteniéndose índices severos de oxidación debido a una incorrecta integración y expresión del transgen mediante recombinación homóloga .

3) Se logró la amplificación de un fragmento de 700 pb correspondiente al gen *Lcy-b* en las muestras tp β 1, tp β 2, tp β 3, tp β 4, tp β 5, tp β 6 y tp β 7 de tabaco transformadas con el plásmido pHK β .

4) En el análisis molecular, se comprobó la integración de los genes.

a) Se confirmó la integración estable del gen *Lcy-b* en el genoma plastídico de plantas de *Nicotiana tabacum* mediante análisis tipo Southern blot comprobándose el estado homoplastómico de éstas plantas.

b) Se confirmó la expresión del RNAm de *Lcy-b* en cloroplastos de plantas de tabaco mediante el análisis tipo Northern blot encontrando la presencia de RNAm monocistrónico que contiene el gen *Prrn* (0.9 kb) y el transcrito dicistrónico conteniendo el gen *aadA* (2.0kb).

5) Se logró incrementar el contenido de β -caroteno (pro-vitamina A) en una de las líneas de plantas transplastómicas de tabaco.

VIII. LITERATURA CITADA

- AOAC.** 1997. Official Methods of Analysis (16th Ed.). Association of Official Agricultural Chemists.
- Amitabha, D., Sang-Hwal, Y., Sook-Hee, L., Jae-Yean, K., Deok-Kun, O., Seon-Won, K.** 2007. An update on microbial carotenoid production: application of recent metabolic engineering tools. *Appl Microbiol Biotechnol.* 77:505–512.
- Armstrong, G.A. y Hearst, J. E.** 1996. Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *FASEB J.* 10:228-237.
- Badui, D.S.** 1993. Química de los alimentos. 3^a edición. Editorial Alhambra Mexicana. México. Cap 6 pp. 327-340 y Cap 7 pp. 377-388.
- Bartley, G. E., y Scolnick. P. A.** 1995. Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *Plant Cell.* 7:1027-1038.
- Belzile, F. J.** 2002. Transgenic, transplastomic and other genetically modified plants: a Canadian perspective. *Biochimie.* 84:1111-1118.
- Beyer, P., Al-Babili, S., Ye, X., Lucca, P., Schaub, P., Welsch, R. y Potrykus, I.** 2002. Golden rice: Introducing the β -carotene biosynthesis pathway into rice endosperm by genetic engineering to defeat vitamin A deficiency. *Journal of Nutrition.* 132:506-510.
- Birch, R. G. y Franks, T.** 1992. Development and optimisation of microprojectile systems for plant genetic transformation. *Austrian J. Plant Physiol.* 18:453-469.
- Birnboim, H. C.** 1983. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* Academic Press, Inc. 243-255.

- Bramley**, P. M. 2002. Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. *J. Exp. Bot.* 53:2107-2113.
- Briton**, G. 1995. UV/Visible spectroscopy. In: *Carotenoids, Vol, 1B: Spectroscopy*, G. Briton, S. Liaaen-ensen, y H.P. Pfander, eds. Basel, Switzerland: Birkhäuser Verlag. 13-62.
- Bock**, R. 2001. Transgenic plastids in basic research and plant biotechnology. *J. Mol. Biol.* 312:425-438.
- Bock**, K. 2004. Taming plastids for a green future. *Trends Biotechnol.* 22(6):311-8.
- Bock** R., Wurbs, D., Ruf, S. 2007. Contained metabolic engineering in tomatoes by expression of carotenoid biosynthesis genes from the plastid genome. *The Plant Journal.* 49:276-288.
- Boynton**, J. E. 1988. Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science.* 240:1534-1538.
- Carrer**, H., Hockenberry, T. N., Svab, Z. y Maliga, P. 1993. Kanamycin resistance as a selectable marker for plastid transformation. *Mol Genet Genomics.* 241:49-56.
- Cunningham**, F. X. y Gantt, E. 1998. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Ann. Rev. Plant Mol. Biol.* 49:557-583.
- Dalta**, R. S. S., Hammerlind, J. K., Pelcher, L. E., Crosby, W. L. y G. Selvaraj. 1991. A bifunctional fusion between β -glucuronidase and neomycin phosphotransferase: a broad-spectrum marker enzyme for plants. *Gene* 101:239-246.

- Daniell, H., Vivekananda, J., Nielsen, B. L., Ye, G. N., Tewari, K. K. y Sanford J. C.** 1990. Transient foreign gene expression in chloroplasts of cultured tobacco cells after biolistic delivery of chloroplast vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:88-92.
- Daniell, H., Lee, S.B., Panchal, T., Wiebe, P.O.** 2001. Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts. *J. Mol. Biol.* 311:1001–1009.
- Daniell, H., Dhingra A. y Kumar Shashi.** 2004. Stable transformation of the cotton plastid genome and maternal inheritance of transgenes. *Plant Mol Biol.* 56:203–216.
- Daniell, H., Lee, S.B., Grevich, J., Saski, C., Quesada-Vargas, T., Guda, C., Tomkins, J. y Jansen, R.K.** 2006. Complete chloroplast genome sequences of *Solanum bulbocastanum*, *Solanum lycopersicum* and comparative analyses with other Solanaceae genomes. *Theor Appl Genet.* 8:1503-1518.
- De Cosa, B., Moar, W., Lee, S. B., Miller, M. y Daniell, H.** 2001. Overexpression of the Bt *cry2Aa2* operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. *Nature Biotech.* 19:71-74.
- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R. y Paredes-López, O.** 2000. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains – characteristics, biosíntesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 40:173-289.
- Delgado-Vargas, F. y Paredes-López, O.** 2003. Carotenoids. En: *Natural colorants for food and nutraceutical Uses.* CRC Press Boca Raton, Florida. pp: 113-166.

- Del Campo**, J. A., García-González M. y Guerrero M. G. 2007. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74:1163-1174.
- Del Villar**, M. A. A., García, S. P. A., Carabez, T. A., Cruz, H. A. y Paredes-López, O. (2005). Carotenogenic gene expression and ultrastructural changes during marigold flowering. *J. Plant Physiol.* 9:1046-56.
- Dharmapuri**, S., Rosati, C., Pallara, P., Aquilani, R., Bouvier F., Camara, B. y Giuliano, G. 2002. Metabolic engineering of xanthophyll content in tomato fruits. *FEBS Lett.* 519:30-34.
- Dufourmantel**, N., Pelissier, B., Garcon, F., Peltier, G., Ferullo, J.M., Tissot, G. 2004. Generation of fertile transplastomic soybean. *Plant Mol Biol.* 4:479-89.
- Finer**, J. J., Vain, P., Jones, M. W. y M.D. McMullen. 1992. Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cell. *Plant Cell Reports.* 11:323-328.
- Finer**, J. J., Finer, K. R. y T. Ponappa. 1999. Particle bombardment mediated transformation. *Current Topics in Microbiology and Immunology.* 240:59-86.
- Fraser**, P. D., Romer, S., Shipton C. A., Mills P. B., Kiano, J. W., Misawa N., Drake, R. G., Schuch W. y Bramley P. M. 2002. Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:1092-1097.
- Fraser**, P. D., y Bramley, P. M. 2004. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog. Lipid Res.* 43:228-265.

- Giuliano, G., Tavazza R., Diretto G., Beyer P. y Taylor M. A.** 2008. Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends in Biotechnol.* 26:139-145.
<http://www.iom.edu/Object.File/Master/7/296/0.pdf>.
- Glasziou, P.P., Mackerras, D.E.M.** 1996. Vitamina A. *Anales Nestlé.* 53:45-56.
- Goldschmidt-Clermont, M.** 1991. Transgenic expression of aminoglycoside adenyl transferase in the chloroplast: a selectable marker for site-directed transformation of *Chlamydomonas*. *Nucleic Acids Research.* 19:4083-4089.
- Hart, D.J., Scott, K.J.** 1995. Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. *Food Chem* 54:101-111.
- Hibberd, J. M., Linley, P. J., Muhammad, S. y Gray, J.** 1998. Transient expression of green fluorescent protein in various plastid types following microprojectile bombardment. *Plant J.* 16:627-632.
- Huang, F. C., Klaus, S. M. J., Herz, S., Zuo, Z., Koop, H. U. y Golds, T. J.** 2002. Efficient plastid transformation in tobacco using the aphA-6 gene and kanamycin selection. *Mol Genet Genomics.* 268:19-27.
- Hunold, R., Bronner, R. y G. Hahne.** 1994. Early events in microprojectile bombardment: cell viability and particle location. *The Plant Journal.* 5:593-604.
- Howe, C. J., Barbrook, A. C., Koumandou, V. L., Nisbet, R. E. R., Symington, H. A. y Wightman, T. F.** 2003. Evolution of the chloroplast genome. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 358, 99-107.

- Jefferson, R. A.** 1987. Assaying chimaeric genes in plants: the GUS gene fusion systems. *Plant Mol Biol.* 5:387-405.
- Johnston, S. A., Anziano, P. Q., Shark, K., Sanford, J. C. y Butow, R. A.** 1988. Mitochondrial transformation in yeast by bombardment with microprojectiles. *Science.* 240:1538-1541.
- Kanamoto, H., Yamishita A., Asao H., Okumura S., Takase H., Hattori M., Yokata A. y Tomizawa K.** 2006. Efficient and stable transformation of *Lactuca sativa* L. cv. Cisco (lettuce) plastids. *Transgenic Res.* 15:205-17.
- Kiefer, C., Hessel, S., Lampert, J. M., Vogt, K., Lederer, M. O., Breithaupt, D. E. y von Lintig, J.** 2001. Identification and characterization of a mammalian Enzyme catalyzing the asymmetric oxidative cleavage of provitamin A. *J. Biol. Chem.* 276:14110-14116.
- Kofer, W., Koop, H. U. Wanner, G. y Steinmuller, K.** 1998. Mutagenesis of the genes encoding subunits A, C, H, I, J and K of the plastid NAD(P)H-plastoquinone-oxidoreductase in tobacco by polyethylene glycol-mediated plastime transformation. *Mol Genet Genomics.* 258:166-173.
- Koop, H. U., Steinmuller, K., Wagner, H., Rossler, C., Eibl, C. y Sacher, L.** 1996. Integration of foreign sequence into the tobacco plastome via polyethylene glycol-mediated protoplast transformation. *Planta.* 199:193-201.
- Kumar, S., Dhingra, A., Daniell, H.** 2004. Plastid expressed *betaine aldehyde dehydrogenase* gene in carrot cultured cells, roots and leaves confers enhanced salt tolerance. *Plant Physiol.* 136:2343–2354.

- Kuroda, H., Maliga, P.** 2001. Sequences downstream of the translation initiation codon are important determinants of translation efficiency in chloroplasts. *Plant Physiol* 125:430-436.
- Kurilich A. C., Juvik J. A.** 1999. Quantification of carotenoid and tocopherol antioxidants in *Zea mays*. *J Agr Food Chem.* 47:1948-1955.
- Lee, P. C., Schmidt-Dannert, C.** 2002. Metabolic engineering towards biotechnological production of carotenoids in microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol.* 60:1-11.
- Lee, S.B., Byun, M.O., Daniell, H.** 2003. Accumulation of trehalose within transgenic chloroplasts confers drought tolerance. *Mol. Breed.* 11:1–13.
- Lessard, P. A., Kulaveerasingam, H., York, G. M., Strong, A. y Sinskey, J.** 2002. Manipulating gene expression for the metabolic engineering of plants. *Metabolic Engin.* 4:67-79.
- Logan, B. A., Monson, R. K. y Potosnak, M. J.** 2000. Biochemistry and physiology of foliar isoprene production. *Trends Plant Sci.* 5:477-48.
- Lutz, K.A., Azhagiri, A.K., Tungsuchat-Huang, T. y Maliga, P.** 2007. A guide to choosing vectors for transformation of the plastid genome of higher plants. *Plant Physiology.* 145:1201–1210.
- Ma, J. K. C., Drake, P. M. W. y Christou, P.** 2003. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature. Rev. Genet.* 4:794-805.
- Mache, R. y Lerbs-Mache, S.** 2001. Chloroplast genetic system of higher plants: Chromosome replication, chloroplast division and elements of the transcriptional apparatus. *Curr Sci.* 80:217-224.

- Mann, V., Harker, M., Pecker, I. y Hirschberg, J.** 2000. Metabolic engineering of astaxanthin production in tobacco flowers. *Nature*. 18:888-892.
- Maliga, P., Svab, Z., Hajdukiewicz, P.** 1990. Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 21:8526-30.
- Maliga, P.** 2003. Progress towards commercialization of plastid transformation technology. *Trends Biotech*. 21:20-28.
- Maliga, P.** 2004. Plastid transformation in higher plants. *Ann. Rev. Plant Biol.* 55:289-313.
- Martínez-Pulido, C., Harry, I. S. y T. A. Torpe.** 1992. Optimization of bud induction in cotyledonary explants of *Pinus canariensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 29:247-255.
- Mc Cabe, D. y Christou, P.**1993. Direct DNA transfer using electric discharge particle acceleration (ACCEL technology). *Plant Cell and Tissue Organ Culture*, 33:227-236.
- Molina, A., Daniell, H., Mingo-Castel, A., Veramendi, J.** 2004. High-yield expression of a viral peptide animal vaccine in transgenic tobacco chloroplasts. *Plant Biotechnol. J.* 2:141–153.
- Naik, P. S., Chanemougasoundharam, S. M., Khurana P. y Kalloo, G.** 2003. Genetic manipulation of carotenoid pathway in higher plants. *Curr. Sci.* 85, 1423-1626.
- Paredes-López, O., Guzmán-Maldonado, S. H., Reyes-Moreno, C., Ordorica-Falomir, C. y Delgado-Vargas, F.** 1999. Alimentos nutraceuticos realidad y función. *Revista de la Universidad Autónoma de Sinaloa*. 6:20-34.
- Persson, C., Sasazuki, S., Inoue, M., Kurahashi, N., Iwasaki, M., Miura, T., Ye, W., Tsugane, S.** 2008. Plasma levels of carotenoids, retinol, and tocopherol

and the risk of gastric cancer in Japan: A nested case-control study. Carcinogenesis.

Plana, D., Fuentes, A., Alvarez M., Lara, R.M., Alvarez, F., Pujol, M. 2006. A new approach for in vitro regeneration of tomato plants devoid of exogenous plant growth hormones. *Biotechnol J.* 10:1153-1157.

Purton, S. 2007. Tools and techniques for chloroplast transformation of *Chlamydomonas*. *Adv Exp Med Biol.* 616:34-45.

Rao, K.V., Kiranmayee, K., Pavan, U., Sree, T.J., Rao, A.V., Sadanandam, A. 2005. Induction of multiple shoots from leaf segments, in vitro-flowering and fruiting of a dwarf tomato (*Lycopersicon esculentum*). *J Plant Physiol.* 8:959-962.

Römer, S., Fraser, P. D., Kiano, J. W., Shipton, C. A., Misawa, N., Schuch, W. y Brambley, P. 2000. Elevation of the provitamin A content of transgenic tomato plants. *Nature Biotech.* 18:666-669.

Ronen, G., Cohen, M., Zamir, D. y Hirschberg, J. 1999. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: Expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant *Delta*. *Plant J.* 17:341-351.

Rosati, C., Aquilani, R., Dharmapuri, S., Pallara, P., Marusic, C., Tabaza, R., Bouvée, F., Camara, B. y Giuliano, G. 2000. Metabolic engineering of β -carotene and lycopene content in tomato fruit. *Plant J.* 24:413-419.

Ruf, S., Hermann, M., Gerger, I. J., Carrer, H., Bock, R. 2001. Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. *Nature Biotech.* 19:870-875.

- Russel**, J. A., Roy, M. K. y J. C. Sanford. 1992. Physical trauma and tungsten toxicity reduce the efficiency of biolistic transformation. *Plant Physiol.* 98:1050-1056.
- Sala**, F., Rigano, M., Barbante, A., Basso, B., Walmsley, A. M. y Castiglione, S. 2003. Vaccine antigen production in transgenic plants: strategies, gene constructs and perspectives. *Vaccine.* 21:803-808.
- Sambrook**, J., Fritsch, E. F. y T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual.* 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, EUA.
- Sandmann**, G. 2001. Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis: strategies, problems and achievements. *Trend Plant Sci.* 6:14-17.
- Saski**, C., Lee, S. B., Daniell, H., Wood, T.C., Tomkins, J., Kim, H.G. y Jansen, R.K. 2005. Complete chloroplast genome sequence of *Gycine max* and comparative analyses with other legume genomes. *Plant Mol Biol.* 2: 309-322.
- Seren**, S., Lieberman, R., Bayraktar, UD., Heath, E., Sahin, K., Andic, F. y Kucuk, O. 2008. Lycopene in cancer prevention and treatment. *Am J Ther,* 15:66-81.
- Sidorov**, V. A., Kasten, D., Pang, S., Hajdukiewicz, P. T. J., Staub, M. y Nehra, N. S. 1999. Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker. *Plant J.* 19:209-216.
- Staub**, J. M. y Maliga, P. 1992. Long regions of homologous DNA are incorporated into the tobacco plastid genome by transformation. *Plant Cell.* 4:39-45.
- Staub**, J. M., García, B., Graves, J. Hajdukiewicz, T. J., Hunter, P., Nehra, N., Paradkar, V., Schlittler, M., Carroll, J. A., Spatola, L., Ward, D., Ye, G. y

- Russell, D. A. 2000. High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nature Biotech.* 18:333-338.
- Svab, Z., Haroper, E. C., Jones, J. D. y Maliga, P.** 1990. Aminoglycoside-3" adenylyltransferase confers resistance to spectinomycin and streptomycin in *Nicotiana tabaccum*. *Plant Mol. Biol.* 14:197-205.
- Svab, Z., Maliga, P.** 1993. High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric aadA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:913-917.
- Shewmaker, C.K., Sheehy, J.A., Daley, M., Colburn, S., Ke, D.Y.,** 1999. Seed-specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects. *Plant J.* 4:401-412.
- Sugiura, M.** 1992. The chloroplast genome. *Plant Mol. Biol.* 19:149-168.
- Tregoning, J., Maliga, P., Dougan, G. y Nixon, P. J.** 2004. New advances in the production of edible plant vaccines: Chloroplast expression of a retanus vaccine antigen, TetC. *Phytochem.* 65, 989-994.
- Voutilainen, S., Nurmi T., Mursu J. y Rissanen T. H.** 2006. Carotenoids and cardiovascular health. *Am J Clin Nutr.* 83:1265–71.
- Ye, X., Al-Babili S., Klott A., Zhang J., Lucca P., Beyer P. y Potroykus I.** 2000. Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science.* 287:303-305.

IX. APÉNDICE

Medio MG	gr/l
MS (Murashige y Skoog, 1962)	4.43
Sacarosa	15
Fitagel	2.5
pH	5.8

Medio MS-15% maltosa	gr/l
Maltosa	150
MS (Murashige y Skoog, 1962)	4.4
Vit. B5 1000X	1
2.4 D 1000 mg/L	1
Fitagel	2.5

Preparación de solución de reacción de β - glucuronidasa

	Concentración Stock	Concentración final
NaPO ₄ (pH 7)*	1 M	100 mM
EDTA (pH 7)	0.5 M	10 mM
K ₄ Fe(CN) ₆ (fotosensible)	0.5 M	0.5 mM
Triton X-100	10%	0.1%

Esterilizar las soluciones en autoclave.

* Para preparar la solución de fosfatos pH 7, mezclar 57.7 ml de Na₂HPO₄ 1 M más 42.3 ml de NaH₂PO₄ 1M. Llevarlo a un litro con agua desionizada. El resultado es una solución 0.1 M de concentración.

La solución final se almacena en congelación (-20°C) hasta que se requiera prepararlo con el X-Gluc (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónico).

Para preparar 50 ml de reactivo:

1. Pesar 25 mg de X-Gluc.
2. Disolver con 500 μ l de DMSO.
3. Agitar en vórtex.
4. Adicionar al buffer.
5. Cubrir con aluminio y almacenar en congelación.