



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

**DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE VECTORES PARA LA MODIFICACIÓN
GENÉTICA DE CLOROPLASTOS Y OPTIMIZACIÓN
DE LA REGENERACIÓN *in vitro* DE LECHUGA (*Lactuca sativa*)**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS**

PRESENTA

**ELÍAS OCTAVIO GÓMEZ MONTES
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS**

DIRIGIDA POR:

DRA. MARÍA DEL CARMEN OLIVER SALVADOR

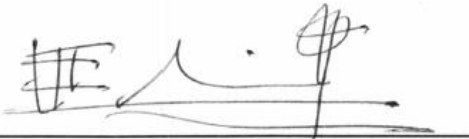
DR. JESÚS AGUSTÍN BADILLO CORONA



México, D.F., agosto 2015

Declaración de originalidad

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



M. en C. Elías Octavio Gómez Montes



Dra. María del Carmen Oliver Salvador



Dr. Jesús Agustín Badillo Corona

Resumen

En 2013, la Organización Mundial de la Salud reportó que había 35 millones de personas infectadas con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana, de las cuales 2.1 millones fueron nuevas infecciones, 11.5% niños menores de 15 años. La pandemia del VIH sigue constituyendo uno de los desafíos más importantes en enfermedades infecciosas para la salud pública, por lo que es necesario el desarrollo de sistemas de producción de biofármacos rentables y eficientes. La modificación genética de cloroplastos de plantas es una alternativa en la producción de proteínas terapéuticas al reducir los costos de producción, purificación y almacenamiento en frío. La mayoría de investigaciones sobre la producción de proteínas terapéuticas por modificación genética de cloroplastos se han realizado en tabaco (*Nicotiana tabacum*) cuya limitante es la presencia de altas concentraciones de alcaloides y toxinas. Una opción para la producción de dichas proteínas es el uso de plantas comestibles como la lechuga (*Lactuca sativa*), especie considerada inocua para humanos y animales.

En el presente trabajo se optimizó la regeneración *in vitro* de lechuga c.v. Romana aplicando un Diseño central Compuesto de Superficie de Respuesta para determinar las concentraciones óptimas de reguladores de crecimiento vegetal para obtener el mayor el número de brotes por explante. Con el medio MS y la combinación de ANA (0.1 mg L^{-1} , $0.54 \text{ } \mu\text{M}$) y BA (0.4 mg L^{-1} , $1.78 \text{ } \mu\text{M}$) se obtuvieron los mayores valores de brotes por explante, 35.36 y 37.44 a partir de hojas cotiledonales y verdaderas respectivamente. El número de brotes por explante estimados a partir de la ecuación del modelo fueron similares a los obtenidos experimentalmente. Por lo que, la metodología de superficie de respuesta puede usarse para optimizar la regeneración *in vitro* de diferentes variedades de lechuga así como de otras plantas.

Adicionalmente, se diseñaron y construyeron dos vectores específicos para la modificación genética de cloroplastos de lechuga. El vector pEOGM contiene un fragmento de 2.5 kb de la región que comprende los genes *rbcL-accD* del genoma del cloroplasto de lechuga c.v. Romana, dentro del cual se insertó el gen *aadA* en el sitio *BSU36I* que confiere resistencia a espectinomomicina y estreptomomicina. Dicho gen fue colocado bajo el control del promotor (*Prrn*) del operon de RNA ribosomal del cloroplasto de tabaco y la región terminadora del gen *psbA*. Este cassette está flanqueado por los sitios *loxP*. Además se construyó el vector

pEOGM-p24/nef, el cual tiene como base el vector pEOGM y en el que se insertaron los genes p24/nef del VIH. Estos genes están bajo el promotor (*Prrn*) del operón de RNA ribosomal del cloroplasto de tabaco fusionado a la región 5' UTR del gen 10 del bacteriófago T7 (*Prrn+T7g10 5'UTR*) y la región 3' del gen *rbcL* como terminador (*TrbcL*). Los resultados logrados en este trabajo apoyan la posibilidad de la modificación genética de cloroplastos de lechuga para la producción de proteínas terapéuticas.

Abstract

In 2013, the World Health Organization (WHO) reported that 35 million people are living infected with Human Immunodeficiency Virus (HIV). Of those 35 million, 2.1 million are newly infected individuals of which 11.5% are children under 15 years. The HIV pandemic remains one of the most important challenges for public health. Therefore, development of an efficient and cost-effective production system for biopharmaceuticals is necessary. Plant chloroplast genetic modification is an attractive production platform for therapeutic proteins where production, storage and transport cost can be kept to a minimum. Most research on the production of therapeutic proteins by chloroplast transformation has been successfully made in tobacco (*Nicotiana tabacum*). However, tobacco has the limitation of containing high concentrations of toxins and alkaloids. One alternative to this is the use of edible plants, such as lettuce (*Lactuca sativa*), a plant considered safe for humans and animals.

In this thesis, we report the optimization of regeneration of lettuce c.v. Romaine *in vitro* applying a Central Composite Design of Surface Response Methodology. We determined the optimum concentrations of plant growth regulators for the highest number of shoots per explant. With MS medium and the combination of ANA (0.1 mg L⁻¹, 0.54 μM) and BA (0.4 mg L⁻¹, 1.78 μM), 35.36 and 37.44 were obtained from cotyledon and true leaves explants, respectively. The number of shoots per explant estimated from the model equation were similar to those obtained experimentally. Therefore, Surface Response Methodology can be used to optimize the regeneration *in vitro* of different lettuce cultivars as well as other plants. Furthermore, we designed and constructed two specific vectors for lettuce chloroplasts transformation. Vector pEOGM, containing 2553 bp from the *rbcL-accD* region of lettuce c.v. Romaine chloroplast genome and the *aadA* expression cassette, which confers resistance to spectinomycin and streptomycin, was inserted into the *Bsu36I* restriction site. The *aadA* gene was placed under the tobacco 16S ribosomal RNA operon promoter (*Prrn*) and the 3' *psbA* gene region as terminator (*TpsbA*). The pEOGM-p24/nef vector is based on pEOGM, in which the HIV-p24 and HIV-nef were inserted in opposite orientation into the *HindIII* and *SacI* sites. These genes were placed under the control of the tobacco 16S ribosomal RNA operon promoter (*Prrn*) fused to gen 10 5'UTR from bacteriophage T7 (*Prrn+T7g10 5'UTR*) and the 3' *rbcL* gene region as terminator (*TrbcL*). These vectors were used to bombard true leaves and cotyledons but no transformed plants could be recovered.

Autorización de uso de obra

Autorización de uso de obra

Instituto Politécnico Nacional

Presente

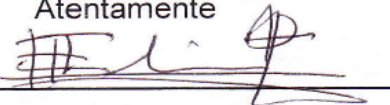
Bajo protesta de decir verdad el que suscribe Nombre **Elías Octavio Gómez Montes** (se anexa copia simple de identificación oficial), manifiesto ser autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de la obra titulada **“Diseño y construcción de vectores para la modificación genética de cloroplastos y optimización de la regeneración *in vitro* de lechuga (*Lactuca sativa*)”**, en adelante “La Tesis” y de cual se adjunta copia, por lo que por medio del presente y con fundamento en el artículo 27 fracción II, inciso b) de la Ley Federal del Derecho de Autor, otorgo al Instituto Politécnico Nacional, en adelante El IPN, autorización no exclusiva para comunicar y exhibir públicamente total o parcialmente en medios digitales (**uso en el Reservoirio Digital del IPN**) “La Tesis” por un período de **tres años** contado a partir de la fecha de la presente autorización, dicho periodo se renovara automáticamente en caso de no dar aviso expreso a “El IPN” de su terminación.

En virtud de lo anterior, “El IPN” deberá reconocer en todo momento mi calidad de autor de “La Tesis”.

Adicionalmente, y en mi calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de “La Tesis”, manifiesto que la misma es original y que la presente autorización no contraviene ninguna otorgada por el suscrito respecto de “La Tesis”, por lo que deslindo de toda responsabilidad a El IPN en caso de que el contenido de “La Tesis” o la autorización concedida afecte o viole derechos autorales, industriales, secretos industriales, convenios o contratos de confidencialidad o en general cualquier derecho de propiedad intelectual de terceros y asumo las consecuencias legales y económicas de cualquier demanda o reclamación que puedan derivarse del caso.

México D.F., 20 de julio de 2015

Atentamente



M. en C. Elías Octavio Gómez Montes

El trabajo de investigación “ **DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE VECTORES PARA LA MODIFICACIÓN GENÉTICA DE CLOROPLASTOS Y OPTIMIZACIÓN DE LA REGENERACIÓN *in vitro* DE LECHUGA (*Lactuca sativa*)** ” se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Molecular de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la **Dra. María del Carmen Oliver Salvador y el Dr. Jesús Agustín Badillo Corona** con el apoyo de la beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y del Programa Institucional de Formación de Investigadores y con el financiamiento de los siguientes proyectos:

Proyecto CONACYT Ciencia Básica CB-2008-01 0104529 otorgado al Dr. Jesús Agustín Badillo Corona.

Proyectos SIP-IPN 20121097, 201301819, 20141214 otorgados a la Dra. María del Carmen Oliver Salvador

Dedicatoria

A mis padres

Con todo mi cariño y mi amor para las personas que hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento. Por ser un gran ejemplo de perseverancia y constancia, por todo su apoyo durante toda mi formación personal y académica pero sobre todo por su infinito amor.

A Grisel

Por tu paciencia y comprensión, por tu apoyo incondicional. Por tu bondad y sacrificio que me inspiró a ser mejor, esta tesis fue realizada por ti y para ti con todo mi amor, gracias por estar siempre a mi lado.

Agradecimientos

A la Dra. María del Carmen Oliver Salvador mi más sincero y profundo agradecimiento. Sus conocimientos, sus orientaciones, su manera de trabajar, su persistencia su paciencia y su motivación han sido fundamentales para mi formación como investigador. Usted ha inculcado en mí un sentido de seriedad, responsabilidad y entrega sin los cuales no podría tener una formación completa como investigador. Expreso mi lealtad y admiración hacia su persona y quedo en deuda con usted por todo lo recibido durante el periodo de mi formación en el posgrado.

Al Dr. Jesús Agustín Badillo Corona que influyó con sus lecciones y experiencias en mi formación personal y académica. Le agradezco la oportunidad y el reto de incursionar en áreas de la investigación que para mí eran inimaginables. No olvidaré su entusiasmo para inculcar en mí el espíritu de búsqueda y perseverancia hasta alcanzar los objetivos trazados. Por su infinita paciencia y su gran calidad humana mil gracias.

Al Dr. Carlos Edmundo Salas Bravo por su invaluable colaboración en la escritura del artículo: “Optimization of direct shoot regeneration using cotyledonary explants and true leaves from lettuce cv. Romaine (Lactuca sativa L.) by surface response methodology”. Muchas gracias Doctor por todos sus conocimientos, paciencia, apoyo y comprensión.

Se extiende un agradecimiento al comité tutorial: Dr. Juan Silvestre Aranda Barradas, Dr. Edgar Salgado Manjarrez y Dr. Noé Valentín Durán Figueroa por la revisión y observaciones realizadas a esta investigación.

ÍNDICE GENERAL

Declaración de originalidad	i
Resumen	ii
Abstract	iv
Autorización de uso de obra	v
Acta de revisión	vi
ÍNDICE GENERAL	x
Índice de Figuras	xiii
Índice de Cuadros	xiv
1. ANTECEDENTES	1
1.1. Importancia de la expresión de proteínas heterólogas en plantas	1
1.2. Virus de inmunodeficiencia humana (VIH)	2
1.3. Transformación genética de cloroplastos	4
1.4. Producción de proteínas heterólogas y expresión de genes para el mejoramiento agrícola de lechuga	6
1.5. Expresión de proteínas recombinantes en lechuga para la producción de vacunas y proteínas terapéuticas	1
1.6. Métodos de transformación genética de plantas	4
1.7. Regeneración de lechuga modificada genéticamente	5
2. JUSTIFICACIÓN	8
3. OBJETIVOS	9
3.1. General	9
3.2. Específicos	9
4. MATERIALES Y MÉTODOS	10
4.1. Medios de cultivo	10
4.2. Estrategia experimental	10
4.3. Regeneración <i>in vitro</i> de lechuga (<i>Lactuca sativa</i>)	11
4.3.1. Preparación de explantes	11
4.3.2. Medios de cultivo para la regeneración de lechuga a partir de brotes adventicios	12
4.3.3. Diseño experimental	12

4.3.1. Análisis estadístico	13
4.4. Vector pLCV2-GFP para la transformación genética de cloroplastos de lechuga.....	13
4.5. Vectores e iniciadores para el diseño y construcción de los vectores pEOGM y pEOGM-p24/nef	14
4.6. Métodos que involucraron bacterias en la construcción de los vectores pEOGM y pEOGM-p24/nef	16
4.6.1. Preparación de células de <i>E. coli</i> calcio competentes	16
4.6.2. Transformación de células calcio competentes por choque térmico.....	16
4.7. Métodos que involucraron ADN para la construcción de los vectores pEOGM y pEOGM-p24/nef	17
4.7.1. Extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina a partir de cultivos de <i>E. coli</i>	17
4.7.2. Extracción a pequeña escala (Miniprep) de ADN plasmídico a partir de cultivos de <i>E. coli</i>	17
4.7.3. Extracción a gran escala (Maxiprep) de ADN plasmídico a partir de cultivos de <i>E. coli</i>	18
4.7.4. Precipitación de ADN plasmídico con acetato de sodio.....	19
4.7.5. Digestión de plásmidos con enzimas de restricción.....	19
4.7.6. Ligaciones de fragmentos de ADN	20
4.7.7. Método para la clonación independiente de la secuencia y ligación, SLIC (Sequence- and Ligation- Independent Cloning).....	20
4.7.8. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	21
4.7.9. Determinación de la concentración de ADN por espectrofotometría	21
4.7.10. Purificación de fragmentos de ADN en geles de agarosa.....	21
4.7.11. Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR	22
4.8. Secuenciación de plásmidos de ADN.....	22
4.9. Modificación genética de cloroplastos de lechuga mediante biobalística	22
4.9.1. Método de bombardeo de hojas de lechuga con partículas recubiertas de ADN	22
4.9.2. Lavado de partículas de oro y tungsteno	23

4.9.3. Recubrimiento de partículas de oro o tungsteno con ADN	23
4.9.4. Protocolos de bombardeo de hojas de lechuga	24
4.10. Caracterización molecular de líneas transplastómicas	25
4.10.1. Identificación de líneas transplastómicas mediante PCR	25
5. RESULTADOS.....	26
5.1. Regeneración <i>in vitro</i> de lechuga (<i>Lactuca sativa</i>)	26
5.1.1. Protocolo de regeneración de lechuga variedad Flora.....	27
5.1.2. Protocolo de regeneración de lechuga variedad Romana	30
5.2. Diseño y Construcción de los vectores pEOGM y pEOGM-p24/nef	39
6.1. Modificación genética de cloroplastos de lechuga mediante biobalística	46
7. CONCLUSIONES	55
8. PERSPECTIVAS	57
9. APORTACIONES CIENTIFICAS	58
10. REFERENCIAS	60
11. ANEXOS.....	76
11.1. Análisis de varianza de los modelos de superficie de respuesta	76
11.2. Secuencia del vector pEOGM.....	78
12.3 Secuencia del vector pEOGM-p24/nef.....	81

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema del genoma del virus del VIH-1.....	3
Figura 2. Esquema de la estructura molecular del virus del VIH.	3
Figura 3. Representación esquemática de los métodos de transformación	4
Figura 4. Diagrama general de la estrategia experimental	11
Figura 5. Esquema de los vectores pLCV2 y pLCV2-GFP/aadA.	13
Figura 6. Protocolos de bombardeo reportados en la transformación genética de cloroplastos de lechuga	24
Figura 7. Cultivo <i>in vitro</i> de lechuga c.v. Romana.....	30
Figura 8. Graficas tridimensionales (3D) de superficie de respuesta mostrando el efecto de las variables (ANA y BA) sobre el número de brotes por explante.....	34
Figura 9. Graficas de contornos representando los valores predichos de brotes (brotes por explante) y la conveniencia (desirability) generada por el programa Design-Expert..	38
Figura 10. Esquema de la construcción del vector pEOGM.	40
Figura 11. Esquema de la construcción del vector pEOGM-p24/nef.	41
Figura 12. Electroforesis de agarosa de la región <i>rbcl-accD</i> y de su respectiva inserción en el vector pBSK SK(+).	42
Figura 13. Representación esquemática del vector pEOGM.	44
Figura 14. Electroforesis de agarosa del vector pEOGM y pEOGM-p24/nef.....	45
Figura 15. Representación esquemática del vector pEOGM-p24/nef.....	46
Figura 16. Bombardeo de hojas de lechuga c.v. Romana con micropartículas de tungsteno y oro empleando el vector pLCV2-GFP/aadA.	49
Figura 17. Transformación genética de cloroplastos de tabaco con el vector pZSJH-gfp.	51
Figura 18. Caracterización molecular de las plantas de tabaco modificadas genéticamente en cloroplasto con el vector pZSJH-gfp.	53
Figura 19. Bombardeo de hojas de lechuga con partículas de oro empleando el vector pLCV-GFP y pEOGM-p24/nef.....	54

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Producción de proteínas heterólogas y expresión de genes para el mejoramiento agronómico de lechuga (<i>Lactuca sativa</i>).....	1
Cuadro 2. Producción de proteínas heterológicas en lechuga (<i>Lactuca sativa</i>) para la obtención de vacunas contra diferentes enfermedades.....	1
Cuadro 3. Reguladores de crecimiento vegetal empleados en los medios de cultivo para la regeneración de lechuga (<i>Lactuca sativa</i>) modificada genéticamente.....	6
Cuadro 4. Iniciadores para la construcción y secuenciación de los vectores pEOGM y pEOGM-p24/nef.....	15
Cuadro 5. Diseño central compuesto de superficie de respuesta con dos factores implementado para la inducción de brotes a partir de explantes de lechuga c.v. Romana y Flora.....	27
Cuadro 6. Efecto de los reguladores de crecimiento vegetal BA y ANA en la inducción de brotes a partir de explantes de hojas verdaderas de <i>L. sativa</i> c.v. Flora	28
Cuadro 7. Efecto de los reguladores de crecimiento vegetal BA y ANA en la inducción de brotes a partir de explantes de explantes cotiledonales de <i>L. sativa</i> c.v. Flora.....	29
Cuadro 8. Efecto de los reguladores de crecimiento vegetal BA y ANA en la inducción de brotes a partir de explantes cotiledonales de <i>L. sativa</i> c.v. Romana.....	31
Cuadro 9. Efecto de los reguladores de crecimiento vegetal BA y ANA en la inducción de brotes a partir de explantes de hojas verdaderas de <i>L. sativa</i> c.v. Romana	32
Cuadro 10. Eventos de transformación para la modificación genética de cloroplastos de lechuga c.v. Romana con el vector pLCV2-GFP/aadA mediante biobalística	47
Cuadro 11. Eventos de transformación para la modificación genética de cloroplastos de lechuga c.v. Flora con el vector pLCV2-GFP/aadA mediante biobalística	50
Cuadro 12. Resultados de la caracterización molecular de las plantas de tabaco resistentes a espectinomicina	52
Cuadro 13. Análisis de varianza (ANOVA) del efecto de los factores A y B sobre el modelo de superficie de respuesta (brotes por explante) a partir de explantes cotiledonales de <i>L. sativa</i> c.v. Romana.....	76

Cuadro 14. Análisis de varianza (ANOVA) del efecto de los factores **A** y **B** sobre el modelo de superficie de respuesta (brotes por explante) a partir de hojas verdaderas de *L. sativa* c.v. Romana.....77

1. ANTECEDENTES

1.1. Importancia de la expresión de proteínas heterólogas en plantas

Se estima que aproximadamente 15 millones (26%) de las 57 millones de muertes por año en el mundo están directamente relacionadas con las enfermedades infecciosas. La vacunación se considera la estrategia más eficaz y rentable para combatir las enfermedades infecciosas. Sin embargo, debido al alto costo de la vacunación (costos de los sistemas de fermentación, purificación aunado a los costos de los adyuvantes, el almacenamiento en frío, transporte y entrega estéril) la hace inaccesible para la mayoría de las personas en los países en desarrollo. En las últimas décadas se ha observado un aumento de aproximadamente el 14% en el costo de producción y distribución de las vacunas lo que hace necesario la investigación de nuevas estrategias de producción y disposición. Respecto a la bioseguridad, existe un cambio creciente en el desarrollo de vacunas de subunidad (usando una o dos proteínas en lugar de cepas de patógenos no virulentos o muertos) empleando sistemas recombinantes (Daniell et al. 2009).

Las plantas son un sistema muy atractivo para la producción de muchas proteínas heterólogas con aplicación industrial y farmacéutica, ofreciendo significativas ventajas en seguridad y costo en comparación con otros sistemas de expresión. Las principales ventajas del uso de plantas incluyen el bajo costo de la producción agrícola de biomasa, la eliminación de los requerimientos de procesos de purificación posteriores para las vacunas expresadas en los tejidos de plantas comestibles, modificaciones post-traduccionales y la producción de proteínas multiméricas correctamente plegadas y ensambladas (Shih and Doran 2009). La capacidad que presentan las plantas modificadas genéticamente para producir proteínas complejas, usando un bajo grado de tecnología, las convierte en una poderosa herramienta para la producción de proteínas recombinantes. Las proteínas se pueden producir a través de la expresión estable o transitoria de transgenes. Los sistemas estables de producción involucran la inserción de un gen externo dentro del núcleo o cloroplastos de la planta huésped resultando la expresión durante múltiples generaciones (Penney et al. 2011). En la expresión transitoria las células están expuestas a la infección viral que produce transcritos de RNA (a partir de la transcripción inversa) y así producir las proteínas heterólogas sin la integración de la secuencia codificante de la proteína en el genoma. El virus infeccioso entra a las células iniciando la transcripción y acumulación de

la proteína a medida que este se propaga a las células vecinas y finalmente a toda la planta (Shih and Doran 2009).

1.2. Virus de inmunodeficiencia humana (VIH)

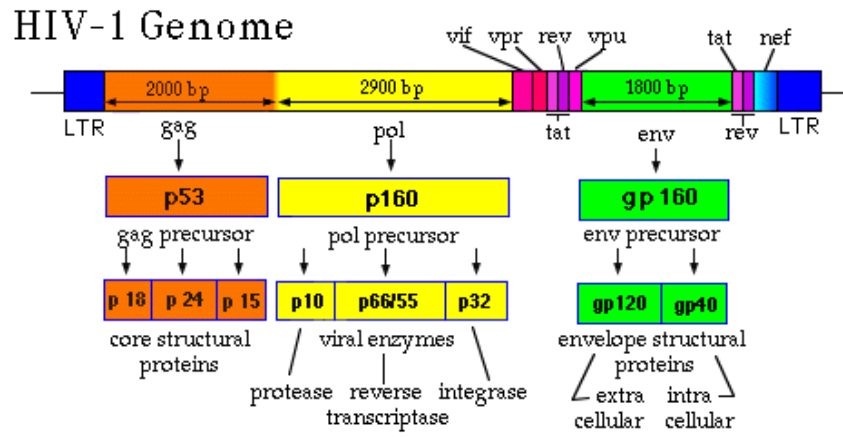
El programa conjunto de las Naciones Unidas sobre el Sida (ONUSIDA) estimó que en el año 2013 se encontraban 35 millones de personas viviendo con VIH en el planeta, con 2.1 millones de nuevos individuos infectados de los cuales 240 000 fueron niños menores de 15 años. Se estimó que las defunciones relacionadas a este virus alcanzaron 1.5 millones. La pandemia del VIH sigue constituyendo uno de los desafíos más importantes en enfermedades infecciosas para salud pública (ONUSIDA 2014; WHO 2013).

El desarrollo de vacunas e inmunoterapias eficientes para VIH ha sido una meta difícil de alcanzar desde que el virus fue identificado por primera vez. Existen varios factores que contribuyen a la incapacidad para generar una vacuna que proporcione protección. El virus del VIH es altamente variable debido en parte a dos errores realizados por el virus durante el proceso de replicación. Esta alta tasa de mutación facilita la evasión del virus a la respuesta inmune adaptativa celular y humoral (Hokey and Weiner 2006).

El genoma del virus del VIH (**Figura 1**) consiste de tres principales genes: *gag* (antígeno específico de grupo), *pol* (polimerasa) y *env* (glicoproteína de la envoltura). El gen *gag* codifica para un precursor de poliproteína Pr55gag, el cual es escindido por la proteasa viral (PR) en las proteínas gag maduras: genes de la matriz (p17), cápside (p24), nucleocápside (p7) y p6 (Binley et al. 1997; Novitsky et al. 2003). El producto más grande del desdoblamiento, p24 (**Figura 2**), constituye el núcleo cónico de las partículas virales de VIH-1 y es el blanco de las células T de la respuesta inmune de los pacientes en etapas tanto inicial como crónica (Obregon et al. 2006).

El gen accesorio, *nef* (**Figura 2**), se encuentra situado en el extremo 3' del genoma del virus del VIH que codifica para una proteína metilada accesoria de 27 kDa o un péptido de 25 kDa cuando es soluble, esta proteína tiene un papel muy importante en la replicación viral y la patogenicidad. La proteína VIH-1 *nef* contiene 206 aminoácidos pero es funcionalmente compleja. Estructuralmente esta complejidad se ve reflejada en la superposición de los dominios efectores que interactúan con múltiples proteínas celulares. Estas interacciones

llevan a cabo las asociaciones anormales de las proteínas de la célula huésped y que establecen un ambiente favorable para la replicación viral (Kirchhoff et al. 2008).



ccz/95

Figura 1. Esquema del genoma del virus del VIH-1. El genoma consta de tres genes principales que codifican para tres precursores (p53, p160 y gp 160) los cuales a su vez dan origen a ocho diferentes proteínas (p18, p24, p15, p10, p66/55, p32, gp120 y gp140) (EEB/HIV Lab Site 1998a).

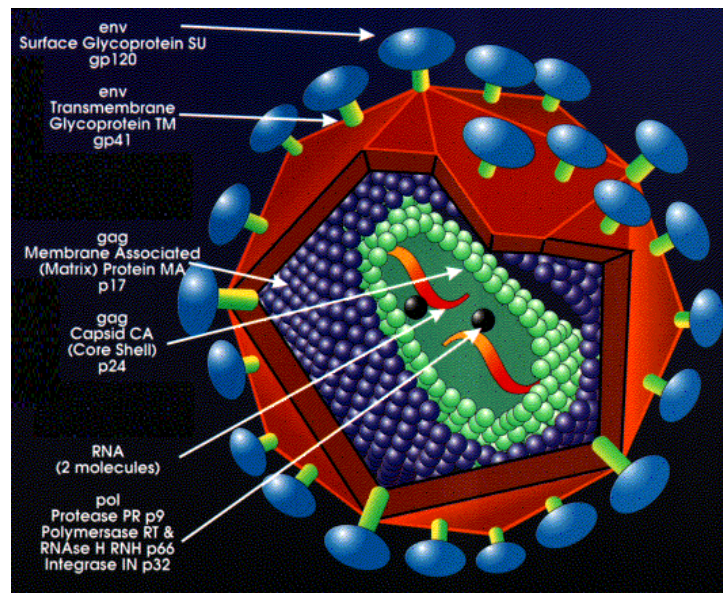


Figura 2. Esquema de la estructura molecular del virus del VIH. El virus está constituido por dos moléculas de RNA, nucleocápside, membrana (matriz), membrana de glicoproteína (envoltura) y una superficie de glicoproteína (EEB/HIV Lab Site 1998b).

1.3. Transformación genética de cloroplastos

Las plantas contienen tres compartimientos celulares con sendos genomas: 1) núcleo, 2) cloroplastos (plástidos) y 3) mitocondria. El número de orgánulos y las copias de su genoma por orgánulo dependen de la especie y el tipo de célula (Lutz et al. 2007). Los cloroplastos son orgánulos conocidos como plástidos en las células vegetales y en las algas eucariotas (Wang et al. 2009). Son orgánulos dinámicos dentro de las células vegetales que alberga al aparato fotosintético. Además de la fotosíntesis, en los cloroplastos, se realizan otras actividades metabólicas importantes incluyendo la producción de clorofila, almidón, ciertos aminoácidos y lípidos, pigmentos, vitaminas etc. Los cloroplastos poseen su propio genoma y la maquinaria completa de transcripción y traducción para expresar sus genes y producir sus propias proteínas (Singh and Daniell 2010). Cada célula vegetal puede contener hasta 100 cloroplastos cada uno de los cuales contiene ≈ 100 copias del genoma del plástido en cada célula. Además, la mayoría de los genes del plástido tienen dos repeticiones invertidas, por lo tanto, la integración del transgen en esta región puede producir $\approx 20,000$ copias por célula, lo que facilita la obtención de altos niveles de expresión de transgenes en las células vegetales (Singh et al. 2009).

La transformación del genoma del cloroplasto ha sido muy empleada en plantas superiores como tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) (McCabe et al. 2008; Svab et al. 1990; Svab and Maliga 1993; Zhou et al. 2008), papa (*Solanum tuberosum* L.) (Sidorov et al. 1999), Tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Ruf et al. 2001; Zhou et al. 2008), lechuga (*Lactuca sativa* L.) (Davoodi-Semiromi et al. 2010; Ichikawa et al. 2010; Kanagaraj et al. 2011; Kanamoto et al. 2006; Lakshmi et al. 2013; Lelivelt et al. 2005; Lim et al. 2011a; Maldaner et al. 2013; Ruhlman et al. 2007; Sharifi Tabar et al. 2013), soya (*Glycine max* L.) (Dufourmantel et al. 2004), col (*Brassica oleracea* L.) (Nugent et al. 2006) y álamo (*Populus alba* L.) (Okumura et al. 2006).

El concepto de ingeniería genética de cloroplastos fue concebido por primera vez a mediados de 1980 con la expresión de los genes de bacterias y cianobacterias en plástidos *in vivo* (Daniell and McFadden 1987). Posteriormente Svab and Maliga (1993) demostraron la primer expresión de genes endógenos en cloroplastos de tabaco, mediante biobalística. La inserción de los vectores de transformación de cloroplastos se ha llevado a cabo mediante biobalística (Boynton et al. 1988; Sanford et al. 1993) o por polietilenglicol (Golds et al. 1993).

La transformación del ADN del plástido (ptADN) se basa en la inserción dirigida de la transformación de ADN por recombinación homóloga seguida por el enriquecimiento de la copia de ptADN por el crecimiento celular en un medio de cultivo selectivo. El proceso gradual del orgánulo (plástido) y el genoma (ptADN) caracterizan en última instancia los rendimientos de las células homoplastómicas genéticamente estables portadoras del ptADN transformado. Las plantas genéticamente estables son obtenidas por la regeneración de plantas a partir de las células homoplastómicas. El objetivo de la ingeniería del genoma plastidal es ya sea para modificar (o eliminar) la secuencia de ADN nativo de los plástidos o incorporar nuevas funciones. La ingeniería de los genes nativos de los plástidos se lleva a cabo mediante la inclusión de una secuencia de ptADN modificado dentro de un vector con una región blanco (Lutz et al. 2007).

El gen *aadA* (que codifica para aminoglucósidas 3-adeniltransferasa) confiere resistencia a espectinomicina y estreptomycin, siendo el marcador de selección más eficiente y utilizada para la transformación de cloroplastos (Svab et al. 1990). En los tejidos de lechuga de tipo silvestre la espectinomicina y estreptomycin inhiben la división celular, el reverdecimiento de las plantas y la formación de brotes. Por lo tanto el reverdecimiento de las plantas, la rápida proliferación celular y la formación de brotes es empleado para identificar los clones transplastómicos en medio selectivo (Svab et al. 1990; Svab and Maliga 1993).

Los vectores básicos de transformación de cloroplastos se componen de secuencias de acompañamiento (regiones homólogas) y el cassette de expresión específico para el cloroplasto. Normalmente un cassette básico de expresión para cloroplasto consiste de un promotor fuerte de plástido, un marcador de selección y una región no traducida 5' y 3' para mejorar los niveles de traducción y transcripción del gen heterólogo. El promotor y los elementos regulatorios pueden ser directamente amplificados del ADN total de la célula, utilizando los iniciadores específicos basados en las secuencias disponibles del genoma del cloroplasto (Singh and Daniell 2010). Una secuencia reguladora 5' de uso común es la derivada de los genes *psbA* y *rbcL* mientras que para 3' son de *psbA*, *rbcL* y *rps16*. La mayoría de estas secuencias reguladoras son derivadas de tabaco. Un adecuado diseño y entendimiento del vector de transformación del cloroplasto con secuencias reguladoras

apropiadas juegan un papel muy importante en la eficiencia de transformación y en la expresión de los genes heterólogos integrados (Verma and Daniell 2007).

1.4. Producción de proteínas heterólogas y expresión de genes para el mejoramiento agrícola de lechuga

El principal objetivo del mejoramiento agronómico de lechuga ha sido la introducción de esterilidad (Takada et al. 2007), resistencia a insectos, herbicidas y enfermedades virales. El mejoramiento convencional de lechuga ha sido empleado para obtener líneas resistentes al mosaico del virus de la lechuga (Ryder 2002), marchitamiento (Garibaldi et al. 2004), pudrición de la raíz causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* (Tsuchiya et al. 2004) y a la enfermedad del acorchamiento de la raíz (Dufresne et al. 2004; Mou and Bull 2004) incitada por *Rhizomonas suberifaciens*. Otros objetivos del mejoramiento es la generación de lechugas resistente a la infección por *Bremia lactucae* causante del mildiu veloso (Jeuken and Lindhout 2002; Lebeda and Petrželová 2004), acronecrosis (gangrena regresiva) inducida por tombusvirus (Grube et al. 2005; Grube and Ryder 2003) y el decaimiento o colapso ocasionado por *Sclerotinia minor* (Grube and Ryder 2004).

Los primeros trabajos sobre modificación genética de lechuga tanto nuclear como de cloroplastos tuvieron como objetivos principales implementar protocolos de transformación vía *Agrobacterium tumefaciens* (Torres et al. 1993), biobalística (Kanamoto et al. 2006), polietilenglicol (Lelivelt et al. 2005) y de regeneración (Ampomah-Dwamena et al. 1997; Hunter and Burritt 2002; Lim et al. 2011b; Mohebodini et al. 2011), evaluando la progenie para determinar la estabilidad de la modificación y/o la correcta producción y expresión de proteínas, principalmente reporteras (gfp). Estas investigaciones abrieron un gran panorama para la aplicación de la biotecnología molecular en el mejoramiento agrícola y la producción de proteínas recombinantes (

).

La biotecnología agrícola tiene un gran potencial para contribuir al aumento de la productividad y el mejoramiento de las cosechas, esencial para los agricultores. Las grandes pérdidas económicas por infecciones virales y nematodos han permitido el auge del mejoramiento molecular ("*molecular breeding*") de lechuga. Se han introducido genes mediante-*Agrobacterium* que confieren resistencia a: Potyvirus del mosaico de lechuga (Dinant et al. 1997), virus Mirafiori de lechuga (Kawazu et al. 2009; Kawazu et al. 2010), virus del bronceado del tomate (Pang et al. 1996), nematodo del nudo de raíz (Zhang et al. 2010), insectos chupadores de savia (Valimareanu 2010), herbicidas como fosfotricina (McCabe et al. 1999b) y bialafos (Mohapatra et al. 1999). Se han producido también, plantas de lechuga tolerantes al estrés por deficiencia de agua y sales (Park et al. 2005), sequía y frío (Vanjildorj et al. 2005). Por otra parte se ha mejorado la productividad de las cosechas respecto al incremento de biomasa foliar de lechugas mediante la inserción de los genes que codifican para una fructosa-1,6-/sedoheptulosa-1,7-bifosfatasa de *Synechococcus sp* incrementando la capacidad fotosintética de la lechuga (Ichikawa et al. 2010), y una asparagina sintetasa A de *E. coli* mejorando el metabolismo del nitrógeno (Giannino et al. 2008), además de la obtención de lechugas que presentan una mayor acumulación de: calcio (Park et al. 2009), hierro (Goto et al. 2000), tocoferol (Li et al. 2011), y la reducción de nitrato en las hojas (Curtis et al. 1999). Se ha llevado a cabo la obtención de proteínas heterólogas como miraculina (Sun et al. 2005) e interferón alfa de pollo (Song et al. 2008).

Cuadro 1. Producción de proteínas heterólogas y expresión de genes para el mejoramiento agronómico de lechuga (*Lactuca sativa*)

Objetivo	Proteína recombinante/gen expresado	Promotor y terminador GOI /selección	Expresión tipo/sitio	Variedad	Referencia
Protocolos de transformación					
Sistema de transformación de lechuga	Neomicina fosfotransferasa II	CaMV35S-NOS Kanamicina	Estable/nuclear	Cobham Green	(Michelmore et al. 1987)
Sistema de transformación y regeneración de lechuga	β -glucuronidasa	CaMV35S-NOS Kanamicina	Estable/nuclear	South Bay	(Torres et al. 1993)
Método de transformación de lechuga	<i>Arabidopsis</i> H ⁺ /Ca ²⁺ transportador sCAX1	CaMV35S-NOS Cdc2a-NOS Kanamicina	Estable/nuclear	Simpson, Red Romana, Bibb	(Lim et al. 2011b)
Sistema de transformación de cloroplastos	gfp	Ls <i>Prrn</i> -Ls <i>TpsbA</i> <i>PpsbA</i> - <i>Trps16</i> Espectinomomicina	Estable/cloroplasto	Cisco	(Kanamoto et al. 2006)
Sistema de transformación de cloroplastos	gfp	<i>Prrn</i> - <i>TrmB</i> <i>Prrn</i> - <i>TpsbA</i>	Estable/cloroplasto	Flora	(Lelivelt et al. 2005)
Inducción de esterilidad					
Esterilidad masculina genómica	β -1,3-glucanasa	CaMV35S-NOS Kanamicina	Estable/nuclear	Lake Nyah	(Curtis et al. 1996b)
Inducción de esterilidad	Receptor mutado de etileno del melón <i>Cm-ERS1/H70A</i>	CaMV35S-NOS Kanamicina	Estable/nuclear	Kaiser	(Takada et al. 2007)

Resistencias

Potyvirus del mosaico de lechuga	Proteína de la capsida (LMV CP)	CaMV35S-RbcS Kanamicina	Estable/nuclear	Girelle, Jessy, Cocarde	(Dinant et al. 1997)
Resistencia al virus Mirafiori de lechuga	Gen <i>MiLV CP</i>	CaMV35S-NOS Kanamicina	Estable/nuclear	Kaiser	(Kawazu et al. 2009; Kawazu et al. 2010)
Virus del bronceado del tomate	Proteína de la nucleocapsida	CaMV35S- CaMV35S Kanamicina	Estable/nuclear	N.R.	(Pang et al. 1996)
Resistencia a insectos chupadores de savia	Genes <i>Pta</i> , <i>ct</i> y <i>cgrp</i>	CaMV35S-NOS Kanamicina	Estable/nuclear	Evola, Lake Nyah, Cortina, Luxor	(Valimareanu 2010)
Resistencia al nematodo del nudo de raíz	Gen <i>Mi-1</i>	CaMV35S-NOS Kanamicina	Estable/nuclear	Huaxuan, Naireerbaipi, Naichoutaishengcai	(Zhang et al. 2010)
Resistencia a herbicidas	Fosfinotricina acetiltransferasa (PAT)	petE-NOS Kanamicina	Estable/nuclear	Evola	(Mohapatra et al. 1999)
Resistencia a herbicidas	Fosfinotricina acetiltransferasa (PAT)	CaMV35S-NOS petE-NOS Glufosinato	Estable/nuclear	Evola	(McCabe et al. 1999b)
Tolerancias					
Tolerancia a sequía y frío	Gen <i>ABF3</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	Ubi mu-NOS Higromicina	Estable/nuclear	Chongchima	(Vanjildorj et al. 2005)
Tolerancia a estrés por deficiencia de agua y sales	Gen <i>LEA</i>	CaMV35S-NOS Kanamicina	Estable/nuclear	N.R.	(Park et al. 2005)

Mejoramientos

Mejora del crecimiento	fructosa-1,6- /sedoheptulosa- 1,7-bifosfatasa	<i>PpsbA-Trps16</i> Espectinomicina	Estable/cloroplasto	Green wave	(Ichikawa et al. 2010)
Mejora del crecimiento	Asparagina sintetasa A (AS-A)	35SMAS- <i>TO</i> Kanamicina	Estable/nuclear	Cortina	(Giannino et al. 2008)
Bio-fortificación de calcio	Transportador H ⁺ /Ca ²⁺ de <i>Arabidopsis thaliana</i>	CaMV35S-NOS Cdc2a-NOS Kanamicina	Estable/nuclear	Simpson	(Park et al. 2009)
Acumulación de hierro	Ferritina	CaMV35S-NOS Kanamicina	Estable/nuclear	Green leaf	(Goto et al. 2000)
Incremento del contenido de tocoferol	Homogentitasa fityltransferasa, γ - tocoferol metiltransferasa	CaMV35S-NOS Kanamicina	Estable/nuclear	Logifolia	(Li et al. 2011)
Reducción de la concentración de nitrato	Nitrato reductasa	CaMV35S- CaMV35S Kanamicina	Estable/nuclear	Flora, Cortina, Luxor, Evola	(Curtis et al. 1999)
Proteínas recombinantes					
Proteína modificadora del sabor	Miraculina	CaMV35S-NOS Kanamicina	Estable/nuclear	Kaiser	(Sun et al. 2005)
Proteína modificadora del sabor	Miraculina	CaMV35S-NOS Ls-Ubi – Ls-Ubi Kanamicina	Estable/nuclear	Kaisar	(Hirai et al. 2011)
Interferón alfa	Interferón alfa de pollo (ChIFN- α)	CaMV35S-NOS Kanamicina	Transitorio/nuclear	N.R.	(Song et al. 2008)

GOI: gen de interés; CaMV35S: promotor y/o terminador de RNA 35S del mosaico del virus de la coliflor; NOS: promotor y/o terminador de nopalina sintasa de *A. tumefaciens*; petE: promotor del gen de plastocianina de chícharo; RbcS: terminador de la subunidad pequeña de rubisco; Ubi mu: promotor de ubiquitina de maíz; Ls-Ubi: promotor y/o terminador de ubiquitina de *Lactuca sativa*; promotor del gen Cdc2a de *A. thaliana*

1.5. Expresión de proteínas recombinantes en lechuga para la producción de vacunas y proteínas terapéuticas

Los productos farmacéuticos derivados de plantas o biofármacos se pueden clasificar en tres áreas: a) anticuerpos, b) vacunas y c) proteínas terapéuticas (Giddings 2001). Las primeras proteínas recombinantes con aplicación farmacología (albumina de suero humana) fueron inicialmente producidas en plantas transgénicas de tabaco y papa (Sijmons et al. 1990). La biología molecular y la biotecnología han mejorado y expandido de muchas maneras las aplicaciones de las plantas en la medicina. Las plantas en especial lechuga, pueden ser diseñadas para actuar como biorreactores para la producción de vacunas y/o proteínas terapéuticas (**Cuadro 2**), además sus rutas metabólicas pueden ser manipuladas para incrementar los compuestos de interés (Penney et al. 2011). Uno o más antígenos inmunoprotectores pueden ser producidos en plantas por la expresión de genes que codifiquen para esas proteínas (Tiwari et al. 2009). Las vacunas consisten de cualquier sustancia antigénica (proteínas, péptidos, organismos atenuados, vivos o muertos) capaces de inducir una respuesta inmune que impida la infección o la enfermedad al ser expuesto posteriormente al microorganismo patógeno. El concepto original de las vacunas comestibles implica que las plantas o fruta transgénicas expresen un antígeno de un virus o una bacteria y que puedan ser ingeridas sin un procesamiento previo y, actuar como vacuna para desencadenar la suficiente respuesta inmune contra una enfermedad específica. En comparación, la inmunización parenteral es más eficiente que la inmunización oral ya que requiere de una menor cantidad de subunidades del antígeno para elicitarse una respuesta (Teli and Timko 2004).

Se ha reportado la expresión de genes codificantes de proteínas terapéuticas y con potencial para la producción de vacunas en lechuga, mediante la modificación genética de cloroplastos y nuclear por *A. tumefaciens* de forma estable y transitoria (**Cuadro 2**). La obtención de proteínas recombinantes con propiedades farmacéuticas ha sido mayor mediante la modificación nuclear en comparación con la modificación de cloroplastos (**Cuadro 2**). Las proteínas de la superficie del virus de hepatitis B se han obtenido mediante la modificación nuclear de lechuga cuya administración oral en ratones ha elicitado la respuesta humoral sistémica anti-HBV (Pniewski et al. 2011), y en humanos se observó el desarrollo de inmunoglobulinas (IgG) séricas específicas contra esta proteína (Kapusta et

al. 1999). La timosina $\alpha 1$ ha sido empleada para el tratamiento de hepatitis B y C además de algunos tipos de cáncer, una plataforma de producción ha sido la lechuga donde se ha obtenido aproximadamente $2 \mu\text{g g}^{-1}$ de hoja (Cui et al. 2011). El cólera enterotoxigénica causado por *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli* son la principal causa de diarreas en bebés y viajeros en países en desarrollo. Se han expresado los genes de la sub-unidad B termolábil de la toxina del cólera, la cual, al ser administrada en ratones vía oral produjo una respuesta inmune en suero y tejido epitelial (Martínez-González et al. 2011). También, han sido producidas en lechuga dos proteínas (ESAT6 y Ag85B) de la superficie de la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* causante de la tuberculosis (Lakshmi et al. 2013). La infección por virus del dengue causante de la fiebre del dengue, es una enfermedad vírica febril aguda que afecta a lactantes, niños y adultos, y en la búsqueda de nuevas plataformas para la producción de vacunas contra este padecimiento se han producido en lechuga proteínas de la capsida, premembrana y de la envoltura del virus del dengue (Kanagaraj et al. 2011) así como la producción de un péptido (tetraepítotope) que puede ser empleado en el diagnóstico serológico del dengue (Maldaner et al. 2013).

Se han utilizado diversas estrategias para la obtención de proteínas heterólogas en plantas una de ellas se basa en la optimización de los cassettes de expresión insertados en los vectores de transformación. Otra alternativa es fusionar genéticamente la secuencia del gen de interés a: 1) la sub-unidad B completa de la toxina de cólera (CTB), 2) la sub-unidad B sintética de la toxina de cólera (sCTB), 3) la parte termolábil de la sub-unidad B de la toxina de cólera (LTB), cuya función es la de portador y adyuvante para estimular la respuesta inmune al antígeno o para aumentar la captación de las moléculas de antígeno en el sistema inmune de la mucosa (Yuki and Kiyono 2003). Se ha fusionado la CTB a antígenos de malaria (Davoodi-Semiromi et al. 2010), a la proteína ESAT6 de *M. tuberculosis* (Lakshmi et al. 2013), proinsulina (Ruhlman et al. 2007), y sCTB se ha fusionado a proteínas del virus causante de la diarrea epidémica porcina (Huy et al. 2009; Huy et al. 2011). Por otro lado, también se han expresado proteínas con aplicación potencial de vacunas contra: la peste bubónica y neumónica (proteína F1-V) (Rosales-Mendoza et al. 2010), sarampión (hemaglutinina de virus) (Webster et al. 2006), epítotoes (O_{21} - O_{14} - A_{21} , A FMDV) del virus responsable de la fiebre aftosa (Deng et al. 2005), inmunogenos de la cepa O157:H7 de *E. coli* (Luan et al. 2009), proteasa cisteínica de *F. hepática* (Legocki et al. 2005), neuramidasa

del virus de la influenza H1N1 (Liu et al. 2012), proteína quimérica del VIH (Govea-Alonso et al. 2013), proteínas de *E. coli* causante del edema porcino (Matsui et al. 2009; Matsui et al. 2011) y glicoproteína E2 del virus responsable de la peste porcina clásica (Legocki et al. 2005).

Así mismo, diversas proteínas terapéuticas se han producido en lechuga tales como: inmunoglobulina humanizada IgG1 (Negrouk et al. 2005), interferón beta humanizado (Li et al. 2007), hormona del crecimiento humano (Sohi et al. 2005), tioredoxina humana 1 (Lim et al. 2011a) y el factor estimulante de granulocitos (Sharifi Tabar et al. 2013).

Cuadro 2. Producción de proteínas heterólogas en lechuga (*Lactuca sativa*) para la obtención de vacunas contra diferentes enfermedades

Enfermedad	Proteína recombinante	Promotor y terminador GOI /selección	Expresión tipo/sitio	Variedad	Referencia
Núcleo					
Tuberculosis	ESAT6 y Ag85B	CaMV35S-OCS Kanamicina	Estable/nuclear	Snezhinka, Rubinovoe, Kruzhevo, Eralash	(Matvieieva et al. 2009)
Hepatitis B y C	Timosina α 1	CaMV35S-NOS Kanamicina	Estable/nuclear	Zhouye	(Cui et al. 2011)
Cólera	Sub-unidad B termolábil de la toxina de cólera (LTB)	Ubi-NOS Fosfinotricina	Estable/nuclear	N.R.	(Kim et al. 2006)
Diarrea epidémica porcina	Epítotope del virus de la diarrea epidémica porcina fusionada a sCTB (sCTB-sCOE)	Ubi-NOS Kanamicina	Estable/nuclear	N.R.	(Huy et al. 2009)
Peste nemónica y bubónica	Proteína <i>F1-V</i>	CaMV35S-NOS Kanamicina	Estable/nuclear	Green Wave	(Rosales-Mendoza et al. 2010)
Hepatitis B	Antígeno del virus (S-HBsAg)	CaMV35S-NOS Fosfinotricina	Estable/nuclear	Syrena	(Pniewski et al. 2011)
Sarampión	Proteína hemaglutinina del virus (MV-H)	CaMV35S- CaMV35S Kanamicina	Estable/nuclear	Crystal	(Webster et al. 2006)
Cólera	Sub-unidad B termolábil de la toxina de cólera (LTB)	CaMV35S-NOS Kanamicina	Estable/nuclear	Potosina, Green Wave	(Martínez-González et al. 2011)

Diarrea epidémica porcina	Epítotope del virus de la diarrea epidémica porcina fusionado a sCTB (sCTB-sCOE)	Ubi-NOS Kanamicina	Estable/nuclear	N.R.	(Huy et al. 2011)
Cólera	Sub-unidad B termolábil de la toxina (LTB)	CaMV35S-NOS Kanamicina	Estable/nuclear	N.R.	(Kim et al. 2007)
Fiebre aftosa	Epítotope O ₂₁ -O ₁₄ -A ₂₁ , A FMDV	CaMV35S-NOS Kanamicina	Estable/nuclear	Capatata	(Deng et al. 2005)
Diarrea y colitis hemorrágicas	Inmunogeno <i>E. coli</i> O157:H7	CaMV35S-NOS Kanamicina	Estable/nuclear	N.R.	(Luan et al. 2009)
Hepatitis B	Antígeno (HBsAg)	CaMV35S-NOS Kanamicina	Estable/nuclear	Burpee Bibb	(Kapusta et al. 1999)
Hepatitis B	Antígeno de superficie (HBsAg)	CaMV35S-secuencia transcripcional Kanamicina	Estable/nuclear	Vitória de Verão	(Marcondes and Hansen 2008)
Edema porcino	Toxina Shiga 2e (Stx2eB)	CaMV35S-NOS Kanamicina	Estable/nuclear	Green wave	(Matsui et al. 2009)
<i>Fasciola hepatica</i>	Proteasa cisteínica	CaMV35S-NOS Kanamicina	Estable/nuclear	N.R.	(Legocki et al. 2005)
Virus de la peste porcina clásica	Glicoproteína E2	CaMV35S-NOS Kanamicina	Estable/nuclear	N.R.	(Legocki et al. 2005)
Inmunodeficiencia humana	Proteína quimérica	CaMV35S-NOS Kanamicina	Estable/nuclear	Green Wave	(Govea-Alonso et al. 2013)
Influenza H1N1	Neuraminidasa	CaMV35S-NOS Kanamicina	Estable/nuclear	Grand Rapids TBR	(Liu et al. 2012)
Transitoria					
Anticuerpo	Inmunoglobulina IgG1	3Mas-CaMV35S Kanamicina	Transitoria/nuclear	N.R.	(Negrouk et al. 2005)
Interferón humano	Interferón-beta (HuIFN-beta)	CaMV35S-NOS Kanamicina	Transitoria/nuclear	Japanese Glass	(Li et al. 2007)

Hormona del crecimiento humano	Proteína hGH	CaMV35S-NOS Kanamicina	Transitoria/nuclear	N.R.	(Sohi et al. 2005)
Edema porcino	Toxina Shiga (Stx2eB)	CaMV35S-TNOS Kanamicina	Transitoria/nuclear	Green wave	(Matsui et al. 2011)
Cloroplastos					
Dengue	Poliproteína DENV3prM/E	Ls- <i>PpsbA</i> – Ls- <i>TpsbA</i> Espectinomocina	Estable/cloroplasto	Simpson elite	(Kanagaraj et al. 2011)
Estrés oxidativo	Tioredoxina humana 1 (hTrx1)	<i>PpsbA-Trps16</i> Espectinomocina	Estable/cloroplasto	Romana	(Lim et al. 2011a)
Malaria	Proteína 1 de superficie fusionada a CTB (CTB-MSP1)	<i>PpsbA-TpsbA</i> Espectinomocina	Estable/cloroplasto	Simpson elite	(Davoodi-Semiromi et al. 2010)
Diabetes	Proinsulina fusionada a CTB (CTB-Pins)	<i>Prrn-Trps16</i> Espectinomocina	Estable/cloroplasto	Simpson elite	(Ruhlman et al. 2007)
Tuberculosis	ESAT6 y proteína de la membrana celular con actividad de lipasa fusionada a CTB	Nt <i>PpsbA</i> -Nt <i>TpsbA</i> Ls <i>PpsbA</i> -Ls <i>TpsbA</i> Espectinomocina	Estable/cloroplasto	Simpson Elite	(Lakshmi et al. 2013)
Dengue	Péptido tetra-epítotope (cE-DI/Ilp)	<i>PpsbA-Trps16</i> Espectinomocina	Estable/cloroplasto	Verónica	(Maldaner et al. 2013)
Leucemia	Factor estimulante de granulocitos humanos (hG-CSF)	<i>Prrn-TpsbA</i> Espectinomocina	Estable/cloroplasto	N.R.	(Sharifi Tabar et al. 2013)

GOI: gen de interés; CaMV35S: promotor y/o terminador de RNA 35S del mosaico del virus de la coliflor; NOS: promotor y/o terminador de nopalina sintasa de *A. tumefaciens*; Ubi: promotor de ubiquitina de tabaco; Ls: *Lactuca sativa*; Nt: *Nicotiana tabacum*; 35SMAS: promotor quimérico procariótico; LTB: sub-unidad B sintética termolábil de la toxina de cólera; CTB: sub-unidad B de la toxina de cólera N.R.: variedad de lechuga No reportada

1.6. Métodos de transformación genética de plantas

Las plantas usadas como vacunas o en el tratamiento de enfermedades se refiere a la producción de proteínas en sistemas de plantas recombinantes con aplicación clínica o veterinaria. Estos sistemas se pueden dividir en aquellos que utilizan las tecnologías de transformación nuclear, de plastos y la viral de plantas (**Figura 3**).

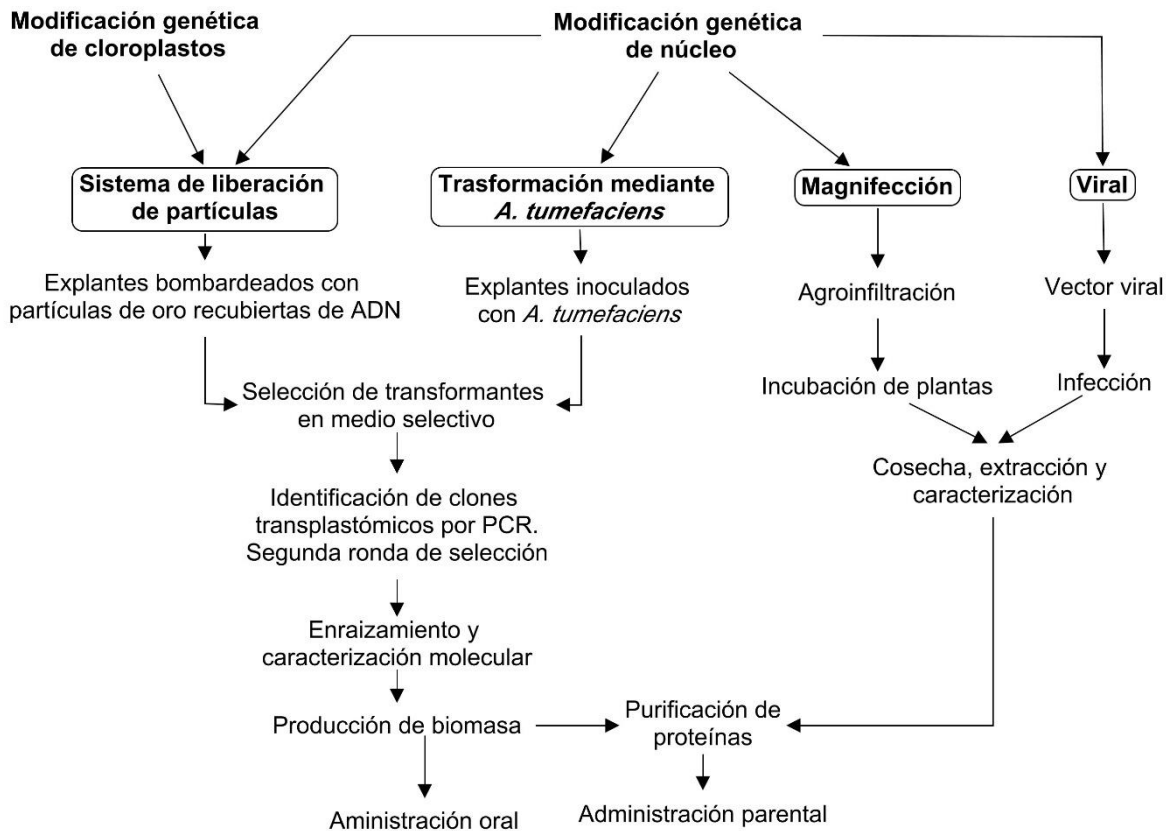


Figura 3. Representación esquemática de los métodos de transformación para la producción de antígenos y biofármacos en plantas y su evaluación funcional en animales modelo (Daniell et al. 2009).

Existen varias ventajas en la transformación de cloroplastos respecto de la transformación nuclear: la inserción del gen de interés es dirigida y controlada por las regiones del plástido que lo flanquean dentro del vector de transformación. Dicho cassette se integra por recombinación homóloga en función de las regiones que lo flanquean (Bock and Khan 2004; Staub and Maliga 1992). La ausencia de efectos epigenéticos (silenciamiento de genes) y la consistente expresión transgénica

parece ser estable en la progenie de muchas generaciones (Maliga 2003). Otras ventajas son que más de un gen puede ser introducido a la vez, y es posible una eficiente transcripción de operones y una traducción de mRNA policistronicos (Cosa et al. 2001; Staub and Maliga 1995). Además los bajos niveles de acumulación de proteína heteróloga en la transformación nuclear pueden ser superados por la transformación genética de cloroplastos. Esto se debe a que los plástidos son poliploides (Sugiura 1992), por lo tanto la transformación del genoma del plástido resulta en miles de copias del gen de interés por cada célula de la planta, generando niveles muy altos de acumulación de proteína heteróloga (Cosa et al. 2001).

1.7. Regeneración de lechuga modificada genéticamente

Lechuga es un vegetal de hoja verde que pertenece al género *Cicoreae* y a la familia *Compositae* (Hunter and Burritt 2002). Como se puede observar en el **Cuadro 3** la ingeniería genética puede ofrecer grandes ventajas para los cultivos hortícolas, tanto en el mejoramiento de la calidad agrícola, así como también en el conferirles resistencia a herbicidas y plagas. En la última década se ha empleado la manipulación genética de estos vegetales para la producción de proteínas heterólogas importantes en la industria de los alimentos y farmacéutica principalmente (**Cuadro 3**).

En la transformación genética exitosa de lechuga existen diferentes puntos críticos a considerar tales como: a) variedad (genotipo dependiente), b) método de transformación para la inserción del(los) gen(es) de interés y c) protocolo de regeneración de los tejidos transformados. Por lo anterior es necesario considerar un método (genotipo independiente) que facilite la generación de plantas de lechuga transgénicas. Se ha llevado a cabo la transformación de lechuga mediante *Agrobacterium*, sin embargo también existen trabajos que reportan procedimientos de transformación mediante biobalística (**Cuadro 3**).

Doerschug and Miller (1967) reportaron la primer producción de brotes adventicios mediante el cultivo de explantes cotiledonales en medios que contienen la combinación de dos reguladores de crecimiento ácido indolacético (AIA) y cinetina (CIN). Los reguladores de crecimiento vegetal juegan un papel muy importante en

la transformación y subsecuentemente en la regeneración de los tejidos vegetales (Curtis et al. 1994). La capacidad de regeneración de los cultivos de lechuga puede variar dependiendo de la concentración y el tipo de reguladores de crecimiento empleados, especialmente de auxinas y citocininas (Lim et al. 2011b).

Cuadro 3. Reguladores de crecimiento vegetal empleados en los medios de cultivo para la regeneración de lechuga (*Lactuca sativa*) modificada genéticamente

Reguladores de crecimiento vegetal (mg L⁻¹)	Método de transformación	Tejido	Referencia
0.1 ANA/0.2 BA	Biobalística	Hojas verdaderas	(Kanagaraj et al. 2011)
0.05 ANA/0.4 BA	<i>A. tumefaciens</i>	Cotiledones	(Mohapatra et al. 1999)
0.05 ANA/0.5 CIN/100 HC/1000 MES Na	<i>A. tumefaciens</i>	Cotiledones	(Matvieieva et al. 2009)
0.25 BA/0.1 ANA	<i>A. tumefaciens</i>	Cotiledones	(Cui et al. 2011)
0.05 ANA/0.4 BA	<i>A. tumefaciens</i>	Cotiledones	(Curtis et al. 1996b)
1.0 BA/0.25 ANA	<i>A. tumefaciens</i>	Cotiledones	(Zhang et al. 2010)
0.1 ANA/0.5 BA	<i>A. tumefaciens</i>	Cotiledones	(Li et al. 2011)
0.5 CIN/10 cisteína	<i>A. tumefaciens</i>	Cotiledones	(Park et al. 2008)
** 5.6 AIA/0.68 CIN	<i>A. tumefaciens</i>	Cotiledones	(Hee Kim and Botella 2004)
0.1 ANA/0.5 BA	<i>A. tumefaciens</i>	Cotiledones	(Kim et al. 2006)
0.1 ANA/0.5 BA	<i>A. tumefaciens</i>	Cotiledones	(Huy et al. 2011)
Vit B5/0.02 ANA/0.5 BA	<i>A. tumefaciens</i>	Cotiledones	(Rosales-Mendoza et al. 2010)
0.1 BA/0.1 ANA	<i>A. tumefaciens</i>	Cotiledones	(Sun et al. 2005)
0.1 BA/0.1 ANA	<i>A. tumefaciens</i>	Cotiledones	(Takada et al. 2007)
0.04 ANA/0.5 BA	<i>A. tumefaciens</i>	Cotiledones	(McCabe et al. 1999a)

0.04 ANA/0.5 BA	<i>A. tumefaciens</i>	Cotiledones	(Xu et al. 2004)
0.01 BA/0.05 ANA	<i>A. tumefaciens</i>	Cotiledones	(Goto et al. 2000)
Vit MS/0.2 BA/0.05 ANA	<i>A. tumefaciens</i>	Cotiledones	(Pniewski et al. 2011)
120 B5/0.5 BA/0.4 ANA	<i>A. tumefaciens</i>	Cotiledones	(Webster et al. 2006)
Vit B5/0.02 ANA/0.5 BA	<i>A. tumefaciens</i>	Cotiledones	(Martínez-González et al. 2011)
100 Mio/0.5 CIN/0.05 ANA	<i>A. tumefaciens</i>	Cotiledones	(Vanjildorj et al. 2005)
0.1 ANA/0.5 BA	<i>A. tumefaciens</i>	Cotiledones	(Huy et al. 2009)
0.1 BA/0.1 ANA	Biobalística	Hojas verdaderas	(Lim et al. 2011a)

MES Na: Ácido 2-morfolino etano sulfónico, HC: Hidrolizado de caseína, Mio: mioinositol, ANA: ácido naftalenacético; BA: bencilaminopurina; CIN: cinetina; AIA: ácido indolacético; ** Medio y vitaminas Linsmaier and Skoog; Vit MS: solución de vitaminas Murashige & Skoog 1 mL L⁻¹; Vit B5: solución de vitaminas Gamborg 1 mL L⁻¹

2. JUSTIFICACIÓN

Las plantas son consideradas un sistema biológico atractivo para la producción de proteínas recombinantes con múltiples aplicaciones en la industria principalmente farmacéutica, ofreciendo ventajas significativas en cuanto a costo de producción e inocuidad en comparación con otros sistemas de producción de proteínas heterólogas, ya que esta plataforma puede eliminar procesos caros de fermentación, purificación, almacenamiento en frío, transporte y entrega estéril de las vacunas principalmente. La vacunación sigue siendo el control de prevención más importante para enfermedades infecciosas en humanos y animales. Ningún otro producto ha tenido un impacto mayor en la salud y el bienestar humano ocasionando la disminución de la morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Uno de los requerimientos esenciales para el éxito en la producción de las vacunas es el desarrollo de una tecnología eficiente y rentable en la expresión de suficientes cantidades de proteínas heterólogas que serán empleadas como antígenos.

Se ha demostrado que VIH-1 p24 activa la respuesta inmune celular y humoral en seres humanos, ya sea solo o en combinación con otros antígenos del VIH como por ejemplo nef. Estas proteínas pueden ser empleadas como vacunas y/o proteínas terapéuticas contra el virus del VIH. Por lo anterior es de suma importancia el desarrollar protocolos de transformación de cloroplastos de lechuga y la regeneración de lechuga modificada genéticamente para la obtención de los antígenos VIH-1 p24 y VIH-1 nef minimizando o eliminando los procesos de purificación de estos antígenos.

3. OBJETIVOS

3.1. General

Diseñar y construir vectores para la modificación genética de cloroplastos y optimizar la regeneración *in vitro* de lechuga (*Lactuca sativa*)

3.2. Específicos

1. Diseñar y construir vectores de transformación con los genes VIH-1 p24/nef para la modificación genética de cloroplastos de lechuga (c.v. Romana)
2. Optimizar la regeneración *in vitro* de lechuga (c.v. Romana) mediante la inducción de brotes adventicios
3. Expresar los genes que codifican para las proteínas VIH-1 p24 y nef en plantas de lechuga (c.v. Romana) mediante modificación genética de cloroplastos por biobalística
4. Caracterizar molecularmente las plantas transplastómicas de lechuga obtenidas

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Medios de cultivo

Medio **MS**: 0.43% (p/v) sales Murashige & Skoog, 3% (p/v) sacarosa, 0.6% (p/v) agar noble, el pH fue ajustado a 5.7 con NaOH 10N antes de agregar el agar. El medio fue esterilizado a 121°C 15 psi durante 15 min.

Medio **MS**^{1/2}: 0.215% (p/v) sales Murashige & Skoog, 0.6% (p/v) agar noble, el pH fue ajustado a 5.7 con NaOH 10N antes de agregar el agar. El medio fue esterilizado a 121°C 15 psi durante 15 min.

Medio **LB**: 1% (p/v) triptona, 0.5% (p/v) extracto de levadura, 0.5% (p/v) NaCl (0.8% agar bacteriológico cuando el medio fue solido), el pH fue ajustado a 7.0 con NaOH 10N antes de agregar el agar. El medio fue esterilizado a 121°C 15 psi durante 15 min.

Medio **NBM**: 0.43% (p/v) sales Murashige & Skoog, 0.01% (v/v) vitaminas B5, 0.6% (p/v) agar noble, el pH fue ajustado a 5.7 con NaOH 10N antes de agregar el agar. El medio fue esterilizado a 121°C 15 psi durante 15 min.

4.2. Estrategia experimental

Con la finalidad de obtener de forma recombinante las proteínas VIH-p24 y VIH-nef inicialmente se realizó el estudio de las condiciones óptimas de cultivo *in vitro* de lechuga para obtener un protocolo de regeneración eficiente y reproducible el cual fue empleado durante los eventos de bombardeo para la modificación genética de cloroplastos de lechuga. Una vez obtenido lo anterior, se procedió a implementar la metodología de biobalística para la modificación genética de cloroplastos de lechuga empleando el vector pLCV2-GFP/aadA. Simultáneamente se procedió al diseño y la construcción de los vectores pEOGM y pEOGM-p24/nef con los cuales se continuó el bombardeo de hojas para obtener plantas transplastómicas de lechuga. La estrategia experimental se resume en la **Figura 4**.

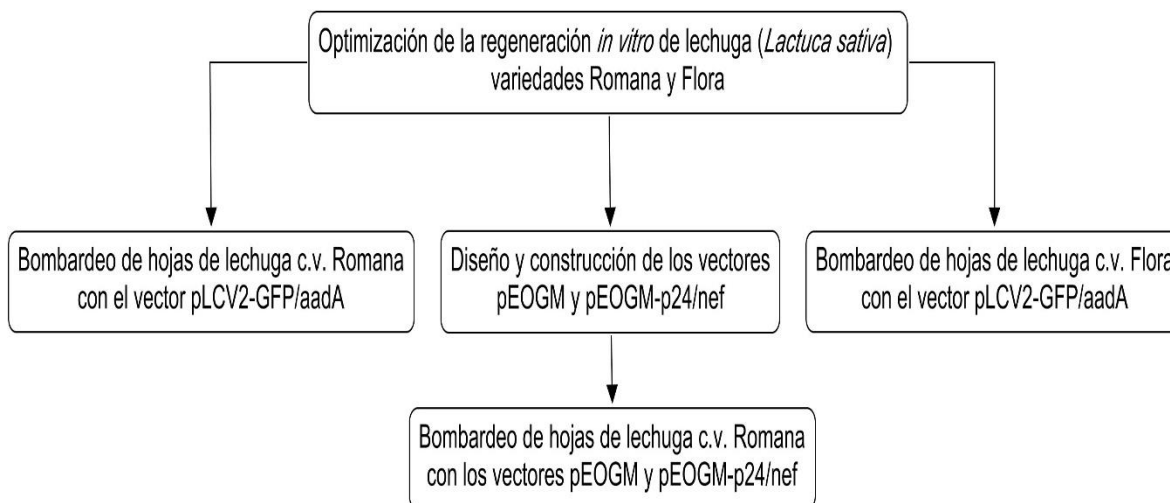


Figura 4. Diagrama general de la estrategia experimental para optimizar la regeneración *in vitro* de lechuga (*Lactuca sativa*) y la construcción de vectores para la modificación genética de cloroplastos.

4.3. Regeneración *in vitro* de lechuga (*Lactuca sativa*)

4.3.1. Preparación de explantes

Las semillas de lechuga variedad Romana (proporcionadas por agricultores de Zumpango, México) y de la variedad Flora (donadas por el Prof. John Gray, University of Cambridge, Reino Unido) fueron desinfectadas con etanol al 70% durante 1 min, posteriormente fueron sumergidas en una solución de hipoclorito de sodio 1% durante 10 min. Después de la desinfección las semillas fueron enjuagadas tres veces con agua destilada estéril. Las semillas fueron colocadas en cajas Petri con medio MS $\frac{1}{2}$ (sección 4.1). Las semillas fueron germinadas a 25°C con un fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad (50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-2}$) en una cámara de cultivo Sanyo (Versatile Environmental Test Chamber, Japón). Después de la germinación los explantes cotiledonales de 7 días de cultivo fueron escindidos transversalmente y colocados en los medios de cultivo con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal para inducir la formación de brotes. También en el día 7 de cultivo se transfirieron las plántulas a cajas magenta con medio MS (sección 4.1) sin sacarosa y fueron cultivadas aproximadamente 40 días para generar hojas verdaderas. Las hojas verdaderas resultantes fueron

cortadas en explantes (1-2 cm²) y puestas del lado adaxial en contacto con el medio de inducción de brotes.

4.3.2. Medios de cultivo para la regeneración de lechuga a partir de brotes adventicios

El medio MS (sección 4.1) fue empleado en todos los experimentos de regeneración, suplementado con reguladores de crecimiento vegetal a varias concentraciones (**Cuadro 5**). Se colocaron 10 explantes en cada caja Petri y los experimentos se realizaron por triplicado. Todas las cajas Petri fueron cultivadas como se detalla en el apartado 4.3.1, las cajas fueron sub-cultivadas cada 14 días, y después de 42 días de cultivo se contabilizó el número de brotes por explante.

4.3.3. Diseño experimental

Con la finalidad de determinar el efecto de los reguladores de crecimiento vegetal BA (6-bencilaminopurina) y ANA (ácido α -naftalenacético) en la inducción de brotes adventicios a partir del cultivo *in vitro* de lechuga c.v. Romana y Flora se aplicó un Diseño Central Compuesto de Superficie de Respuesta (DCC-SR) para obtener de forma aleatoria las combinaciones a estudiar de BA y ANA seleccionadas por el programa Design-Expert 7.0 (Stat-Ease 2005). A partir de una regresión lineal se obtuvieron los parámetros de la ecuación de segundo orden (**Ecuación 1**).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i,j < j}^k \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon$$

Donde:

Y = valor de la respuesta esperada

$\beta_0, \beta_i, \beta_{ii}, \beta_{ij}$ = parámetros del modelo

X_i, X_j = son los códigos de los factores estudiados

k = número de factores analizados

ε = error

Ecuación 1. Ecuación del modelo del diseño central compuesto de superficie de respuesta de segundo orden

4.3.1. Análisis estadístico

Se realizó el análisis estadístico del número de brotes por explante usando el programa SAS 9.0 (Statistical Analysis System) (SAS-Institute 2009). Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para determinar la significancia de las diferencias entre tratamientos. Para establecer las diferencias significativas entre grupos, se aplicó una prueba comparativa de medias de Duncan ($p < 0.05$).

4.4. Vector pLCV2-GFP para la transformación genética de cloroplastos de lechuga

El vector LCV2 (**Figura 5**) contiene 2,253 pb de la secuencia blanco del ADN del cloroplasto de lechuga, dicha región fue insertada dentro de esqueleto del vector PCR2.1 (Invitrogen). La secuencia de inserción se extiende desde las regiones intergénicas *rrn16/trnI* hasta *trnA/rrn23* y corresponden a las posiciones de nucleótidos 104,366-106,260 de la secuencia del genoma del cloroplasto de tabaco (Lelivelt et al. 2005). El vector pLCV2-GFP/aadA (Lelivelt et al. 2005) (donado por el Prof. John Gray, University of Cambridge, Reino Unido) fue construido mediante la amplificación por PCR y la subsecuente inserción de los cassettes *aadA* y *gfp* a partir del vector pZS197 (Svab and Maliga 1993).

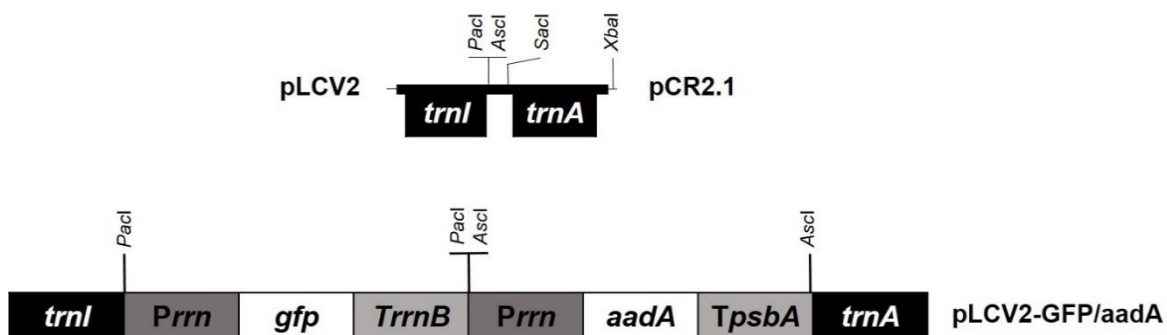


Figura 5. Esquema de los vectores pLCV2 y pLCV2-GFP/aadA. El vector pLCV2 contiene las regiones *trnI-trnA* específicas del genoma de cloroplasto de lechuga c.v. Flora con sitios de corte de *paclI/AscI*, en dichos sitios fue insertado el cassette de expresión GFP/aadA

4.5. Vectores e iniciadores para el diseño y construcción de los vectores pEOGM y pEOGM-p24/nef

Vector pLCV2-GFP/aadA

El vector pLCV2-GFP/aadA contiene las regiones intergénicas *rrn16/trnI-trnA/rrn23* específicas del genoma de cloroplasto de lechuga c.v. Flora conteniendo los sitios *pacl/Ascl* donde fueron insertados los cassettes de expresión GFP/aadA. El gen *aadA* contiene promotor (*Prrn*) del operon de RNA ribosomal del cloroplasto de tabaco (con una secuencia líder sintética de 18 pb y un sitio de unión a ribosomas) y la región 3' del gen *psbA* como terminador (*TpsbA*). El gen *gfp* tiene el promotor (*Prrn*) del operon de RNA ribosomal del cloroplasto de tabaco (con la región 5'UTR del gen *rbcL* y un sitio de unión a ribosomas) y el gen *rrnB* de *E. coli* como terminador (*TrrnB*) (Lelivelt et al. 2005).

Vector pZSloxP

El vector pZSloxP es un derivado del vector pZS197 (Svab and Maliga 1993) con dos sitios loxP flanqueando el gen *aadA*.

Vector pZSJH-gfp

El vector pZSJH-gfp contiene las regiones *rbcL-accD* del genoma del cloroplasto de tabaco. El gen *aadA* contiene el promotor (*Prrn*) del operon de RNA ribosomal del cloroplasto de tabaco y la región 3' del gen *psbA* como terminador (*TpsbA*). El gen *gfp* tiene el promotor (*Prrn*) del operon de RNA ribosomal del cloroplasto de tabaco (con la región 5'UTR del gen *rbcL* y un sitio de unión a ribosomas) y el gen *rrnB* de *E. coli* como terminador (*TrrnB*) (Newell et al. 2003).

Vector pBluescript SK(+)

El vector de clonación pBluescript SK(+) (2958 pb) contiene los promotores procaríoticos T7 y T3, un sitio múltiple de clonación, el gen de resistencia a ampicilina como marcador de selección, el gen *LacZ*, el origen de replicación bacteriano (*ori*), el origen de replicación f1 para la producción de ssADN y el sitio CAP de unión de proteínas.

Se tomaron las secuencias del genoma de cloroplasto de lechuga reportadas por Kanamoto et al., (2006) y Timme et al., (2007) para el diseño de los iniciadores.

Cuadro 4. Iniciadores para la construcción y secuenciación de los vectores pEOGM y pEOGM-p24/nef

Iniciador	Secuencia	Descripción
JAB420	TCTGGAAGATTTGCGAATCCCTAC	Primer Fwd para amplificar y secuenciar la región <i>rbcL-accD</i> específica del genoma del cloroplasto de lechuga c.v. Romana
JAB421	CCTGTATTTCTTTGATAAGAATCG	Primer Rev para amplificar y secuenciar la región <i>rbcL-accD</i> específica del genoma del cloroplasto de lechuga c.v. Romana
JAB467	TGGATCCACAATTAATCCTATGGATG GCGGGAATTAATTACTAGCTAGGT	Primer Fwd para amplificar y secuenciar el cassette de expresión loxP aadA
JAB468	acaggatctaaaataatatcccaatGT CGACGA GCTCGCGGCCGCAAGCTTGGGGCC CGGTACTAACTAGAATTCA	Primer Rev para amplificar y secuenciar el cassette loxP aadA e introducir los sitios <i>SacI</i> y <i>HindIII</i>
M13F	GTAAAACGACGGCCAGT	Primer Fwd para secuenciar la región <i>rbcL-accD</i> insertada en el vector pBluescript SK(+)
M13R	GCGGATAACAATTTACACAGG	Primer Rev para secuenciar la región <i>rbcL-accD</i> insertada en el vector pBluescript SK(+)

4.6. Métodos que involucraron bacterias en la construcción de los vectores pEOGM y pEOGM-p24/nef

4.6.1. Preparación de células de *E. coli* calcio competentes

Las células calcio competentes fueron preparadas de acuerdo con Sambrook and Russell (2001). A partir de una colonia de células de *E. coli* Top10 se inoculó un tubo con 5 mL de medio LB sin antibiótico, el cual se dejó incubando a 37°C en agitación durante toda la noche. Un mililitro del cultivo anterior fue utilizado para inocular matraces con 50 mL de medio LB sin antibiótico los cuales fueron cultivados en las mismas condiciones antes mencionadas durante 5-7 h. Los matraces fueron enfriados en hielo y luego centrifugados a 7000 rpm durante 5 min a 4°C y el sobrenadante fue desechado. Se adicionaron 20 mL de CaCl₂ 0.1 M (estéril y frío) se mezcló vigorosamente (vortex) y se incubó en hielo durante 15 min, el cultivo se centrifugó a 7000 rpm durante 5 min se retiró el sobrenadante, esto se repitió dos veces más con volúmenes de 10 mL y 7.5 mL de CaCl₂ 0.1 M. Finalmente las células fueron resuspendidas en 2 mL de una solución de CaCl₂ 0.1 M 15% glicerol (v/v) y dosificadas en tubos de 1.5 mL conteniendo 50 o 100 µL de células, inmediatamente después los tubos fueron congelados en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C.

4.6.2. Transformación de células calcio competentes por choque térmico

Se siguió el protocolo descrito por Pope and Kent (1996) para la transformación de células de *E. coli* Top10 calcio competentes con algunas modificaciones. Las alícuotas congeladas de 50 o 100 µL de células fueron mezcladas con 5 µL de plásmido (ADN) e incubadas en hielo durante 5 min, posteriormente se les adicionó 300 o 400 µL de medio LB, los tubos fueron incubados en agitación a 37°C durante 3 h. Las células fueron sembradas en cajas Petri con medio LB pre-incubadas a 37°C, conteniendo el antibiótico apropiado. Las cajas Petri fueron incubadas en las mismas condiciones antes mencionadas toda la noche hasta observar colonias de aproximadamente 0.2 mm de diámetro.

4.7. Métodos que involucraron ADN para la construcción de los vectores pEOGM y pEOGM-p24/nef

4.7.1. Extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina a partir de cultivos de *E. coli*

Para la extracción de ADN (0.1-2 μg) plasmídico se siguió el protocolo descrito por Sambrook and Rusell (2001). Una colonia de *E. coli* Top10 se transfirió a un tubo de 25 mL con 5 mL de medio LB con el antibiótico apropiado (0.2 mg mL^{-1} ampicilina y/o espectinomicina), se incubó a 37°C durante toda la noche con agitación vigorosa. El cultivo fue centrifugado en un tubo de 1.5 mL a 9000 x *g* durante 1 min, la pastilla de células fue resuspendida en 100 μL de solución de lisis alcalina I fría (50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA). Después se adicionaron 200 μL de solución de lisis alcalina II recién preparada (0.2 M NaOH, 1% SDS), la reacción fue incubada a temperatura ambiente por 5 min. Finalmente se adicionaron 150 μL de solución de lisis alcalina III fría (60 mL 5 mM de acetato de potasio, 11.5 mL de ácido acético glacial, 28.5 mL de agua) para neutralizar la reacción. El lisado bacteriano fue centrifugado a 9000 x *g* por 5 min a 4°C. El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo al cual se le adicionaron 900 μL de isopropanol y se incubó a 4°C durante 10 min, posteriormente el tubo se centrifugó a 9000 x *g* durante 10 min y se retiró el sobrenadante, al tubo se le agregaron 700 μL de etanol 70% (v/v) y se centrifugó a 9000 x *g* durante 5 min, se retiró el sobrenadante y el tubo se dejó secar en posición invertida hasta que el precipitado estuviera seco, finalmente el plásmido (ADN) se re-suspendió en 30-50 μL de buffer TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.3) conteniendo 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de DNase-free RNase A.

4.7.2. Extracción a pequeña escala (Miniprep) de ADN plasmídico a partir de cultivos de *E. coli*

Para el aislamiento a pequeña escala de ADN plasmídico se utilizó el Kit Wizard Plus SV Minipreps ADN Purification System (Promega, EUA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Una colonia de *E. coli* Top10 se transfirió a un tubo de 25 mL con 5 mL de medio LB con el antibiótico apropiado (0.2 mg mL^{-1} ampicilina

y/o espectinomicina), el tubo se incubo a 37°C durante toda la noche con agitación vigorosa. El cultivo fue centrifugado en un tubo de 1.5 mL a 9000 x g durante 1 min, la pastilla de células fue resuspendida en 250µl de Cell Resuspension Solution. Se adicionaron 250µl de Cell Lysis Solution a cada muestra se agitó por inversión 4 veces, después se agregaron 10µl of Alkaline Protease Solution se agitó por inversión 4 veces y los tubos se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min. La reacción fue neutralizada mediante la adición de 350µl de Neutralization Solution. El tubo fue centrifugado a 14000 rpm durante 10 min, se insertó la columna dentro del tubo colector y se decantó dentro ella el sobrenadante. El tubo colector con la columna fue centrifugado a 14000 rpm durante 1 min, se retiró el líquido del tubo colector, se introdujo nuevamente la columna a la cual se le adicionaron 750µl de Wash Solution y se centrifugó a 14000 rpm durante 1 min, se retiró el líquido del tubo colector y se repitió el paso anterior con 250µl de Wash Solution el tubo se centrifugó a 14000 rpm durante 2 min. La columna fue introducida a un tubo de 1.5 mL y se le agregaron 100µl de Nuclease-Free Water el tubo se centrifugó a 14000 rpm durante 1 min. El tubo conteniendo el ADN fue almacenado a -20°C hasta su uso.

4.7.3. Extracción a gran escala (Maxiprep) de ADN plasmídico a partir de cultivos de *E. coli*

Para el aislamiento a gran escala de ADN bacteriano se utilizó el HiSpeed Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Una colonia de *E. coli* Top10 se transfirió a un tubo de 25 mL con 5 mL de medio LB con el antibiótico apropiado (0.2 mg mL⁻¹ ampicilina y/o espectinomicina), el tubo se incubo a 37°C durante toda la noche con agitación vigorosa. Se tomó 1 mL del inoculó y se transfirió a un matraz con 150-200 mL de medio LB con el antibiótico apropiado y se incubó a 37°C durante 15 h con agitación vigorosa. El cultivo fue centrifugado a 4000 x g por 7 min. Las células precipitadas fueron resuspendidas en 10 mL de buffer P1 (100 mg mL⁻¹ RNase A, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA·Na₂) después se agregaron 10 mL de buffer P2 (0.2 M NaOH, 1% (p/v) SDS) y el tubo se incubó a temperatura ambiente durante 5 min, seguido de esto se

adicionaron 10 mL de buffer P3 (acetato de potasio 3 M, pH 4.8) el tubo se agitó gentilmente y se vertió en el QIAfilter Maxi Cartridge para ser incubado durante 10 min. El permeado proveniente del QIAfilter Maxi Cartridge fue descargado dentro del HiSpeed Maxi Tip (previamente equilibrado con 10 mL de buffer QBT (NaCl 70 mM, MOSP-NaOH 50 mM pH 7.0, 15% (v/v) de etanol, 0.15% (v/v) de Triton X-100)). Después de que todo el volumen paso a través de la columna por gravedad esta fue lavada con 60 mL de buffer QC (NaCl 1 M, MOSP-NaOH 50 mM pH 7.0, 15% (v/v) de etanol), el ADN plasmídico fue eluido con 15 mL de buffer QF (NaCl 1.25 M, Tris-HCl 50 mM pH 8.5, 15% (v/v) de etanol). El plásmido fue precipitado con 0.7 volúmenes de isopropanol. La solución fue pasada a través de una membrana QIA precipitator Maxi module y posteriormente esta fue lavada con 2 mL de etanol 70% (v/v). El ADN plasmídico fue eluido de la membrana QIA precipitator Maxi module con 0.5-1.5 mL de buffer TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8.3).

4.7.4. Precipitación de ADN plasmídico con acetato de sodio

Se adicionó 1/10 de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto al tubo de 1.5 mL que contenía el ADN a purificar y/o concentrar. El tubo se incubó durante 30 min en hielo, se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min a 4°C, se retiró el sobrenadante y se lavó con 200-500 µL de etanol al 70%, después de retirar el etanol el tubo se dejó secar para finalmente resuspender el plásmido en el buffer apropiado o en agua en un volumen menor a la mitad del inicial.

4.7.5. Digestión de plásmidos con enzimas de restricción

La mayoría de las restricciones enzimáticas se llevaron a cabo en volúmenes de 15-50 µL. se usaron buffer específicos 10x provistos por el fabricante. La cantidad de enzima de restricción usada dependió de la cantidad de ADN presente en la reacción (0.1-15 µg) sin embargo usualmente se empleó en un intervalo de 1-10 U por reacción. Se agregó Albumina de Suero Bovino (BSA) cuando el fabricante lo recomendó. Las reacciones fueron incubadas a la temperatura apropiada durante

4-16 h. Para las reacciones de doble digestión se emplearon las recomendaciones del fabricante.

4.7.6. Ligaciones de fragmentos de ADN

Las ligaciones de las moléculas de ADN se llevaron a cabo usando la T4 DNA ligase. Los volúmenes de reacción estuvieron entre 20-30 μ L. Las reacciones contuvieron la cantidad apropiada de 10x buffer (Tris-HCl 66 mM pH 7.5, MgCl₂ 5 mM, DTT 5 mM, ATP 1 mM), 1-5 U de T4 DNA ligase y los fragmentos de ADN a ser ligados. La relación molar vector:inserto varió para cada construcción pero por lo regular fue de 1:3 a 1:10 (Sambrook and Russell 2001).

4.7.7. Método para la clonación independiente de la secuencia y ligación, SLIC (Sequence- and Ligation- Independent Cloning)

Li and Elledge (2012) describen el método de clonación independiente de la secuencia y ligación SLIC (Sequence- and Ligation- Independent Cloning) empleando una exonucleasa, T4 DNA polimerase, para generar extremos cohesivos en las cadenas dobles de ADN del inserto y el vector. La longitud de los extremos está directamente relacionada con el tiempo de tratamiento con la exonucleasa. El vector y el inserto son alineados *in vitro* y transformados dentro de la célula y reparados por gap para generar el ADN recombinante (plásmido).

Se digirieron 2 μ g de vector con la(s) enzima(s) correspondiente(s). El ADN fue separado en un gel de agarosa al 1% para verificar la correcta digestión del vector. El vector digerido se purificó con acetato de sodio. El fragmento de ADN (inserto) fue amplificado por PCR, después se purificó en gel agarosa o con acetato de sodio. El vector (1 μ g) y el inserto de ADN (1 μ g) fueron tratados con 0.5 U de T4 DNA polymerase en buffer 2 NEB (New England Biolabs) más 100 μ g mL⁻¹ de BSA (Albumina de suero bovino) todo en un reacción de 20 μ L y puesto en incubación a 24°C durante 2.5 min. La reacción se detuvo adicionando 10 mM de dCTP (cualquier dNTP puede funcionar para detener la reacción de escisión de la T4 DNA polymerase).

4.7.8. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Los fragmentos de ADN de doble cadena fueron separados por electroforesis en geles de agarosa de 0.7-1.5% (w/v) dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar. La agarosa fue suspendida en buffer TBE 1x (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8.3) y posteriormente calentado en horno de microondas. La solución de agarosa fue vertida en una canasta dentro de una cámara de electroforesis. Cuando la agarosa solidificó esta fue colocada en el tanque de la cámara horizontal de electroforesis con la suficiente cantidad de buffer TBE para cubrir el gel (1 mm de profundidad). Las muestras de ADN fueron mezcladas con buffer de corrida 6x (0.25% (w/v) de azul de bromofenol, 30% (v/v) de glicerol) antes de colocar las muestras en los pozos del gel. La electroforesis se realizó durante 1-4 h a un voltaje constante de 90 V. El tamaño de los fragmentos se estimó comparando con bandas estándar de longitud conocida (ADN del bacteriófago λ digerido con *Cla*I). Las bandas de ADN fueron visualizadas en un transiluminador UV a 305 nm (Sambrook and Russell 2001).

4.7.9. Determinación de la concentración de ADN por espectrofotometría

La concentración de ADN fue medida en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermoscientific, EUA), el equipo fue ajustado a cero con 2 μ L del líquido en el cual se encontraba disuelta la muestra (buffer TE o agua), 2 μ L de la muestra fueron colocados en el lector del equipo y se corrió el software. La contaminación con proteína fue estimada a partir de la relación A_{260}/A_{280} . La cantidad de ADN fue determinada midiendo la absorbancia de la muestra a 260 nm. La concentración de ADN fue calculada considerando que $A_{260}=1.0$ de ADN de doble cadena equivale a 50 μ g mL⁻¹ (Sambrook and Russell 2001).

4.7.10. Purificación de fragmentos de ADN en geles de agarosa

La purificación de ADN en geles de agarosa se llevó a cabo usando el Gel Band Purification Kit (Promega, EUA). Las bandas con los fragmentos de ADN deseado fueron cortadas y extraídas del gel (aproximadamente 300 mg de agarosa) el cual

fue disuelto con 300 μL de Binding Solution para un volumen total de 600 μL . En las purificaciones de productos de PCR se adicionó el mismo volumen de reacción de Binding Solution. Para ambos casos el volumen final se pasó a través de una columna con matriz de fibra de vidrio. El ADN retenido en la columna fue lavado con 500 μL de Washing Solution y centrifugado a 1000 x g durante 1 min. La columna fue puesta en un tubo nuevo y el ADN fue eluido con 50 μL de buffer TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8.3).

4.7.11. Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR

Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo siguiendo el método reportado por Sambrook and Russell (2001) en un termociclador (Labnet, EUA). Las reacciones de PCR se realizaron usando 0.02 U μL^{-1} de la enzima Kod Hot Start polimerase (Novagen, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La reacción contuvo buffer (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, DTT 7.5 mM, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de BSA), MgCl_2 8 mM, dATP, dCTP, dGTP, dTTP 150 μM de cada uno y de 0.1-0.5 μL de iniciadores (0.3 μM) para una reacción de 50 μL . Las condiciones de temperatura de las PCR dependieron de los iniciadores usados y de la longitud del fragmento a amplificar, pero básicamente consistieron de 1 ciclo de 2 min 95°C, 20-40 ciclos de 20 s 95°C, 10 s 55°C, 15-20 s 70°C y un ciclo de 2 min 70°C para la extensión final.

4.8. Secuenciación de plásmidos de ADN

La secuenciación de los vectores fue realizada por la empresa Macrogen (Seúl, Corea) y el análisis de la calidad y el alineamiento de la secuencia fueron verificados mediante el software CodonCode Aligner y SerialCloner.

4.9. Modificación genética de cloroplastos de lechuga mediante biobalística

4.9.1. Método de bombardeo de hojas de lechuga con partículas recubiertas de ADN

Las partículas de tungsteno para el bombardeo fueron inicialmente preparadas, lavadas y recubiertas de acuerdo con Sanford et al., (1993) y finalmente de acuerdo al protocolo modificado del boletín 9075 de Bio-Rad (Maliga and Svab 2011) de la siguiente forma:

4.9.2. Lavado de partículas de oro y tungsteno

Se colocaron 30 mg de micropartículas de oro 0.6 μm o tungsteno 0.7 μm en un tubo de 1.5 mL y se les adicionó 1 mL de etanol al 70% frío. El tubo se agitó vigorosamente (vortex) durante 5 min, después se dejó el tubo en reposo a temperatura ambiente durante 15 min, para sedimentar las micropartículas. El tubo fue centrifugado a 600 x g durante 1 min para compactar las partículas. El etanol fue removido y se agregó 1 mL de agua destilada estéril fría. El tubo se agitó vigorosamente (vortex) y posteriormente se dejaron sedimentar las partículas durante 10 min a temperatura ambiente. El tubo fue centrifugado 600 x g durante 1 min y se retiró el agua, este tratamiento se repitió 2 veces más. En el último lavado con agua el tubo se centrifugo a 1700 x g por 15 s y se removió el agua completamente, se adicionaron 500 μL de glicerol 50% y se agitó el tubo vigorosamente (vortex) durante 1 min para resuspender las partículas. La concentración final de oro o tungsteno fue de 60 mg mL^{-1} y estas fueron almacenadas a -20°C .

4.9.3. Recubrimiento de partículas de oro o tungsteno con ADN

La solución de partículas mencionada anteriormente se agitó en un vortex durante 5 minutos, posteriormente se tomaron 50 μL y se colocaron en un tubo de 1.5 mL. En agitación constante se agregaron 5 μL del vector ($1 \mu\text{g} \mu\text{L}^{-1}$), 50 μL de CaCl_2 2.5 M y 20 μL de espermidina 0.1 M; las partículas se mantuvieron en agitación durante 3-5 minutos, las partículas se sedimentaron centrifugando el tubo durante 1 min 600 x g , el sobrenadante fue removido y se adicionaron 140 μL de etanol 70% en los cuales se humedeció perfectamente la pastilla, el tubo se centrifugó durante 1 min 600 x g y se removió el sobrenadante, el paso anterior se repitió empleando etanol

absoluto frío. Finalmente las partículas fueron resuspendidas en 60 μ L de etanol absoluto de los cuales 10 μ L de las partículas recubiertas de ADN fueron colocados en cada uno de los macroacarreadores.

4.9.4. Protocolos de bombardeo de hojas de lechuga

El bombardeo de hojas (**Figura 6**) se llevó a cabo según lo descrito por Kanagaraj et al., (2011) y Lim et al., (2011a) de la siguiente forma: 10 μ L de partículas recubiertas de ADN fueron esparcidas en el macroacarreador. El bombardeo se realizó con una pistola PSD-1000/He (Bio-Rad, EUA) usando discos de ruptura de 900 y 1100 psi y un vacío de 19-20 mm Hg. La distancia del macroacarreador a las hojas de lechuga fue de 6 y 9 cm.

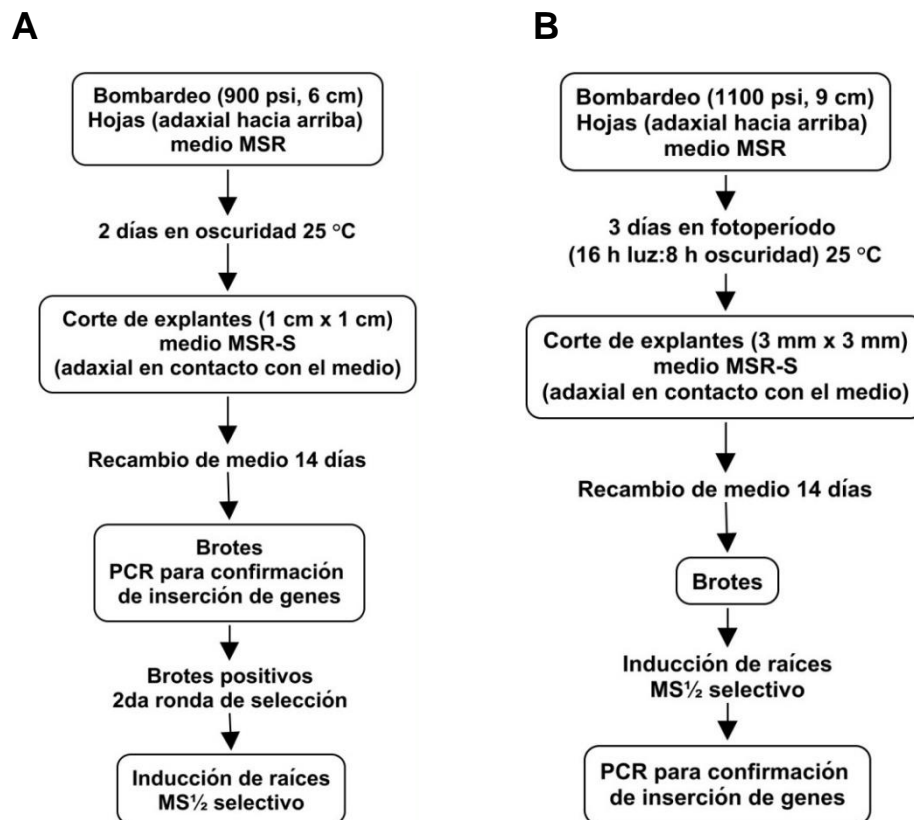


Figura 6. Protocolos de bombardeo reportados en la transformación genética de cloroplastos de lechuga: **A)** Protocolo 1 (Kanagaraj et al. 2011); **B)** Protocolo 2 (Lim et al. 2011a).

4.10. Caracterización molecular de líneas transplastómicas

4.10.1. Identificación de líneas transplastómicas mediante PCR

Los brotes transplastómicos fueron analizados por PCR usando el RED-Extract-N-Amp plant PCR kit (Sigma, EUA). La reacción de PCR se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante. Una pequeña pieza (0.5-1 cm²) de los brotes regenerados fue cortada y sumergida en un tubo con 50 µL de Extraction Solution. El ADN fue extraído incubando el tubo a 94°C durante 10 min, después se adicionaron 50 µL de Dilution Solution para finalmente agitar en vortex. Para la reacción de PCR se adicionaron 2 µL de extracto de tejido (obtenidos en el paso anterior) 5 µL de RED-Extract-N-Amp PCR mix (Taq polimerasa, dNTPs y buffer), 0.5 µL de cada uno de los iniciadores (50 pmol µL⁻¹) y 2 µL de agua estéril. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador (Labnet, EUA) con las siguientes condiciones: 1 ciclo de 3 min 94 °C; 30-40 ciclos de 30 s 94°C, 1 min 55°C, 1.5 min 72°C, y un ciclo de 10 min a 72°C para la extensión final.

5. RESULTADOS

5.1. Regeneración *in vitro* de lechuga (*Lactuca sativa*)

Estudios previos sugieren que la BA (6-bencilaminopurina) y el ANA (ácido α -naftalenacético) son reguladores clave y afectan la inducción de brotes en el cultivo *in vitro* de lechuga (Ampomah-Dwamena et al. 1997; Cui et al. 2011; Curtis et al. 1994; Curtis et al. 1999; Doerschug and Miller 1967; Enomoto et al. 1990; Hunter and Burritt 2002; Kanamoto et al. 2006; Lim et al. 2011b; Mohebodini et al. 2011). Por lo anterior se aplicó un Diseño Central Compuesto de Superficie de Respuesta. DCC-SR para obtener ocho combinaciones de BA y ANA seleccionadas aleatoriamente por el programa Design-Expert 7.0 (Stat-Ease 2005) incluyendo cinco repeticiones en el punto central (**Cuadro 5**). Las repeticiones en el punto central permiten estimar la curvatura de la función respuesta en todas las direcciones y para la estimación del error. Se empleó el programa Design-Expert para obtener el DCC-SR debido a su fácil manejo ya que cuenta con herramientas de programación muy sencillas. Además provee de información adicional si se compara con otros programas estadísticos (Team 2014) alternativos. La información que el programa Design-Expert puede proporcionar es: análisis de varianza, gráficas 3D y de perturbación, ecuaciones de los modelos, valores de conveniencia, optimización de la respuesta y de los factores. Esta información enriquece la discusión de los resultados experimentales y el análisis de los valores predichos derivados de la ecuación de modelo. El programa proporciona regresiones que permiten la derivación de las funciones cuadráticas que fueron aplicadas a los modelos de explantes cotiledonales y hojas verdaderas.

Cuadro 5. Diseño central compuesto de superficie de respuesta con dos factores implementado para la inducción de brotes a partir de explantes de lechuga c.v. Romana y Flora

Medios de cultivo	Valores experimentales (mg L ⁻¹)		Factores codificados	
	ANA	BA	A	B
MS1	0.05	0.7	-1	1
*MS2	0.1	0.4	0	0
MS3	0.17	0.4	1.13	0
MS4	0.1	0.1	0	-1
MS5	0.03	0.4	-0.6	0
MS6	0.1	0.82	0	1.2
MS7	0.05	0.1	-1	-1
MS8	0.15	0.1	1	-1
MS9	0.15	0.7	1	1

* 5 repeticiones en el punto central (MS2)

5.1.1. Protocolo de regeneración de lechuga variedad Flora

Los experimentos fueron inicialmente realizados para medir la regeneración directa de brotes empleando diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal a partir de explantes de la variedad Flora. Los resultados de regeneración obtenidos con esta variedad fueron para hojas verdaderas de 2.10 (MS4) a 0.70 (MS1) (**Cuadro 6**) y para explantes cotiledonales de 2.07 (MS4) a 0.67 (MS5) (**Cuadro 7**) brotes por explantes, respectivamente. Del día 21 de cultivo al 42 solo se observó la inducción de callos con todos los medios probados, y no propició una mayor inducción de brotes. Debido a los valores sumamente bajos de brotes por

explante, el programa Design-Expert no pudo obtener un modelo a partir de los datos experimentales y por lo tanto estos resultados no fueron evaluados mediante superficie de respuesta. En cambio con la variedad Romana los valores de brotes por explante (hojas verdaderas y explantes cotiledonales) fueron aproximadamente 17 veces mayores a los obtenidos con la variedad Flora.

Cuadro 6. Efecto de los reguladores de crecimiento vegetal BA y ANA en la inducción de brotes a partir de explantes de hojas verdaderas de *L. sativa* c.v. Flora

Código de los medios	Valores codificados		Valores experimentales (mg L ⁻¹)		Brotes adventicios por explante
	A	B	ANA	BA	Experimentales
MS4	0	-1	0.10	0.10	2.10±1.00
*MS2	0	0	0.10	0.40	1.23±8.00
MS9	+1	+1	0.15	0.70	1.07±1.53
MS7	-1	-1	0.05	0.10	1.00±5.20
MS3	+1.13	0	0.17	0.40	0.90±2.65
MS8	+1	-1	0.15	0.10	0.83±2.08
MS5	-0.6	0	0.03	0.40	0.80±4.58
MS6	0	+1.2	0.10	0.82	0.73±3.21
MS1	-1	+1	0.05	0.70	0.70±1.73

Los valores experimentales son la media±desviación estándar de cada muestra (n=3). * Promedio de las cinco repeticiones en el punto central. Factores **A**=ANA; **B**=BA. Los valores de los factores **A** y **B** fueron atribuidos por el programa Design-Expert

Los valores de brotes por explante de este trabajo son similares a los obtenidos en la regeneración *in vitro* de lechuga c.v. Red colar (2.7±0.9) empleando 0.1 mg L⁻¹ de ANA y BA a partir de explantes cotiledonales (Hunter and Burritt 2002), también (0.3-1.0 brotes por explante) con las variedades de lechuga Red salad bowl,

Mainspring y Bronze mignonette usando la combinación de 0.1 AIA mg L⁻¹, 0.5 mg L⁻¹ CIN y 0.05 mg L⁻¹ ZEA con explantes cotiledonales (Ampomah-Dwamena et al. 1997) y en la regeneración de lechuga durante la modificación genética con *Agrobacterium tumefaciens* a partir de las variedades Red romaine y Bibb (1.0-5.0 brotes por explante) evaluando el efecto las combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal 2ip (N-6(2-isopentenil)-adenina), ANA, BA, AIA y ZEA (Lim et al. 2011b). Estos resultados indican que la regeneración *in vitro* de lechuga es genotipo dependiente y que está directamente relacionada con la variedad empleada.

Cuadro 7. Efecto de los reguladores de crecimiento vegetal BA y ANA en la inducción de brotes a partir de explantes de explantes cotiledonales de *L. sativa* c.v. Flora

Código de los medios	Valores codificados		Valores experimentales (mg L ⁻¹)		Brotos adventicios por explante
	A	B	ANA	BA	Experimentales
MS4	0	-1	0.10	0.10	2.07±1.15
MS1	-1	+1	0.05	0.70	1.17±7.37
MS9	+1	+1	0.15	0.70	1.10±2.65
MS8	+1	-1	0.15	0.10	1.07±5.03
*MS2	0	0	0.10	0.40	1.01±3.50
MS3	+1.13	0	0.17	0.40	0.97±5.69
MS7	-1	-1	0.05	0.10	0.87±2.89
MS6	0	+1.2	0.10	0.82	0.70±3.61
MS5	-0.6	0	0.03	0.40	0.67±2.52

Los valores experimentales son la media±desviación estándar de cada muestra (n=3). * Promedio de las cinco repeticiones en el punto central. Factores **A**=ANA; **B**=BA. Los valores de los factores **A** y **B** fueron atribuidos por el programa Design-Expert

5.1.2. Protocolo de regeneración de lechuga variedad Romana

Los experimentos fueron inicialmente realizados para medir la regeneración directa de la variedad Romana a partir de la inducción de brotes empleando diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal. Durante el tiempo de experimentación se observó el desarrollo de callos después de los 10 días de cultivo (**Figura 7a**) y la aparición de brotes a los 20 días de cultivo (**Figura 7b**), en ambos tipos de explantes (cotiledonales y hojas verdaderas). A partir de los explantes de hojas verdaderas se logró obtener 37.4 y 35.5 brotes por explante (**Cuadro 8**) empleando las combinaciones de 0.1 mg L⁻¹ de ANA y 0.4 mg L⁻¹ de BA (MS2) y 0.17 mg L⁻¹ ANA y 0.4 mg L⁻¹ de BA (MS3), que representan los mejores resultados de regeneración. Estas dos medias no presentan diferencia significativa a partir de una prueba de Duncan ($p > 95\%$). Respecto a los explantes cotiledonales se obtuvieron 35.4 y 30.1 brotes por explante usando las mismas concentraciones de ANA y BA mencionadas anteriormente, (**Cuadro 9**), sin embargo estos resultados presentaron diferencias significativas (prueba de medias de Duncan $p < 0.05$).

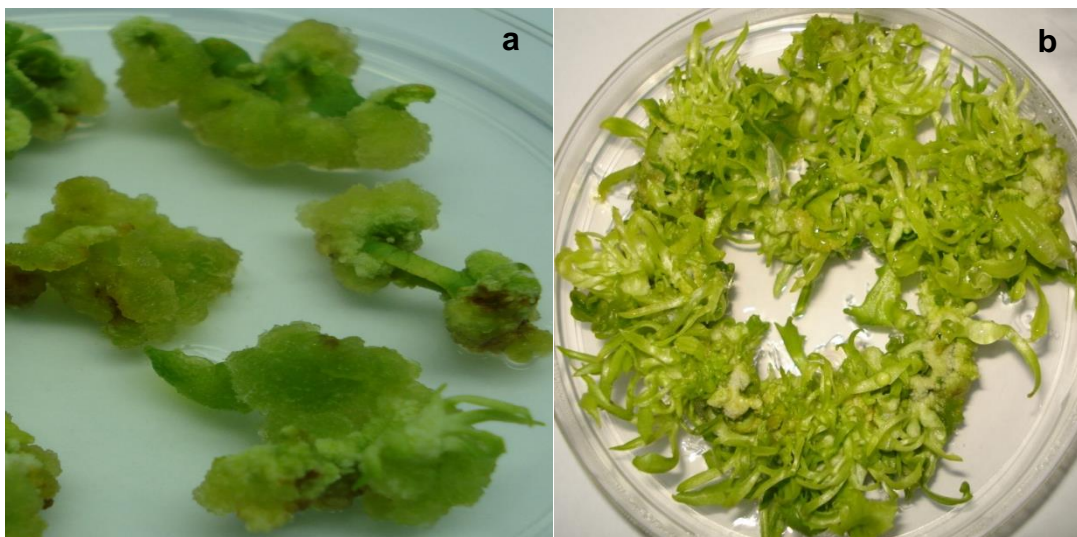


Figura 7. Cultivo *in vitro* de lechuga c.v. Romana. **a)** Inducción de callos después de 10 días; **b)** Inducción de brotes después de 42 días de cultivo en medio MS2 (0.1 mg L⁻¹ ANA y 0.4 mg L⁻¹ BA)

Se ha reportado la inducción de brotes durante la regeneración de lechuga usando diferentes concentraciones de ANA (0.02 a 0.4 mg L⁻¹) y BA (0.05 a 0.5 mg L⁻¹). Hunter and Burrit (2002) reportaron los mejores resultados de brotes por explante (alrededor de 24) a partir de cuatro variedades de lechuga usando 0.54 µM (0.1 mg L⁻¹) de ANA y 0.44 µM (0.1 mg L⁻¹) de BA a partir de explantes cotiledonales. En el presente trabajo y en el reportado por Hunter y Burrit (2002) la concentración de ANA es similar, sin embargo la concentración de BA usada por nosotros es cuatro veces mayor.

Cuadro 8. Efecto de los reguladores de crecimiento vegetal BA y ANA en la inducción de brotes a partir de explantes cotiledonales de *L. sativa* c.v. Romana

Código de los medios	Valores codificados		Valores experimentales (mg L ⁻¹)		Brotes adventicios por explante	
	A	B	ANA	BA	Experimentales	Modelo
*MS2	0	0	0.10	0.40	35.4±4.4 ^a	31.2
MS3	+1.13	0	0.17	0.40	30.1±2.4 ^b	31.1
MS5	-0.6	0	0.03	0.40	29.8±1.0 ^b	31.3
MS1	-1	+1	0.05	0.70	26.1±0.7 ^{bc}	29.0
MS6	0	+1.2	0.10	0.82	24.1±5.6 ^{cd}	27.7
MS9	+1	+1	0.15	0.70	23.6±1.3 ^{cd}	28.9
MS4	0	-1	0.10	0.10	20.6±1.1 ^d	32.5
MS8	+1	-1	0.15	0.10	20.2±4.0 ^d	32.4
MS7	-1	-1	0.05	0.10	20.1±1.0 ^d	32.5

Los valores experimentales son la media±desviación estándar de cada muestra (n=3). Medias con la misma letra en la misma columna no son diferentes significativamente ($P < 0.05$). * Promedio de las cinco repeticiones en el punto central. Factores **A**=ANA; **B**=BA. Los valores de los factores **A** y **B** fueron determinados por el programa Design-Expert

Cuadro 9. Efecto de los reguladores de crecimiento vegetal BA y ANA en la inducción de brotes a partir de explantes de hojas verdaderas de *L. sativa* c.v. Romana

Código de los medios	Valores codificados		Valores experimentales (mg L ⁻¹)		Brotes adventicios por explante	
	A	B	ANA	BA	Experimentales	Modelo
*MS2	0	0	0.10	0.40	37.4±3.0 ^a	32.5
MS3	+1.13	0	0.17	0.40	35.5±5.7 ^a	32.5
MS5	-0.6	0	0.03	0.40	28.6±6.5 ^b	32.5
MS9	+1	+1	0.15	0.70	26.7±0.7 ^b	30.1
MS6	0	+1.2	0.10	0.82	26.1±5.4 ^b	28.9
MS1	-1	+1	0.05	0.70	24.8±0.8 ^b	30.1
MS7	-1	-1	0.05	0.10	23.5±0.7 ^b	33.9
MS8	+1	-1	0.15	0.10	23.2±3.7 ^b	33.9
MS4	0	-1	0.10	0.10	22.7±1.8 ^b	33.9

Los valores experimentales son la media±desviación estándar de cada muestra (n=3). Medias con la misma letra en la misma columna no son diferentes significativamente ($P < 0.05$). * Promedio de las cinco repeticiones en el punto central. Factores **A**=ANA; **B**=BA. Los valores de los factores **A** y **B** determinados por el programa Design-Expert

Ruhlman et. al., (2007) analizaron la eficiencia de regeneración de cinco explantes foliares de diferentes variedades de lechuga empleando ANA y BA, reportaron 15.2±2.5 brotes por explante con la concentración óptima de ANA (0.1 mg L⁻¹) y de BA (0.2 mg L⁻¹) con la variedad Romana. La causa de estas diferencias no es clara, una posible respuesta es que la edad de los explantes y la variedad analizada en dichos estudios es diferente a la variedad cuya regeneración es reportada aquí (Curtis et al. 1996a; Curtis et al. 1999; Mohebodini et al. 2011; Vanjildorj et al. 2005).

La concentración de reguladores de crecimiento vegetal más cercana (0.1 mg L^{-1} de ANA, 0.5 mg L^{-1} de BA) a la reportada en este trabajo fue empleada en la regeneración de lechuga (variedad no reportada de *L. sativa*) posterior a la transformación con *Agrobacterium tumefaciens* (Huy et al. 2009; Huy et al. 2011; Kim et al. 2006).

Los valores de los resultados de los 13 experimentos para la inducción de brotes se muestran como Experimentales en los **Cuadro 8** y **Cuadro 9**. Empleando concentraciones de ANA entre 0.05 y 0.15 mg L^{-1} no se observó un efecto significativo en el número de brotes por explante (**Figura 8a y b**). Sin embargo la variación de BA (0.1 - 0.7 mg L^{-1}) indujo un incremento de 1.6 veces en el número de brotes por explante (entre los valores máximos y mínimos de BA) a partir de hojas verdaderas, mientras que para explantes cotiledonales se observó un incremento de 1.77 veces. Al emplear los valores extremos de reguladores de crecimiento (ANA y BA) no se observó oscurecimiento o necrosis en los callos o explantes durante todo el periodo del ensayo (42 días). También usando las formulaciones codificadas como MS4 y MS9 se observó una alta tasa de inducción de callos, pero estos no indujeron la formación brotes.

Los brotes regenerados fueron transferidos a medio MS sin reguladores de crecimiento para su enraizamiento, el desarrollo de raíces se observó en el día 14, el 97% de los brotes presentaron raíz en el día 28 de cultivo.

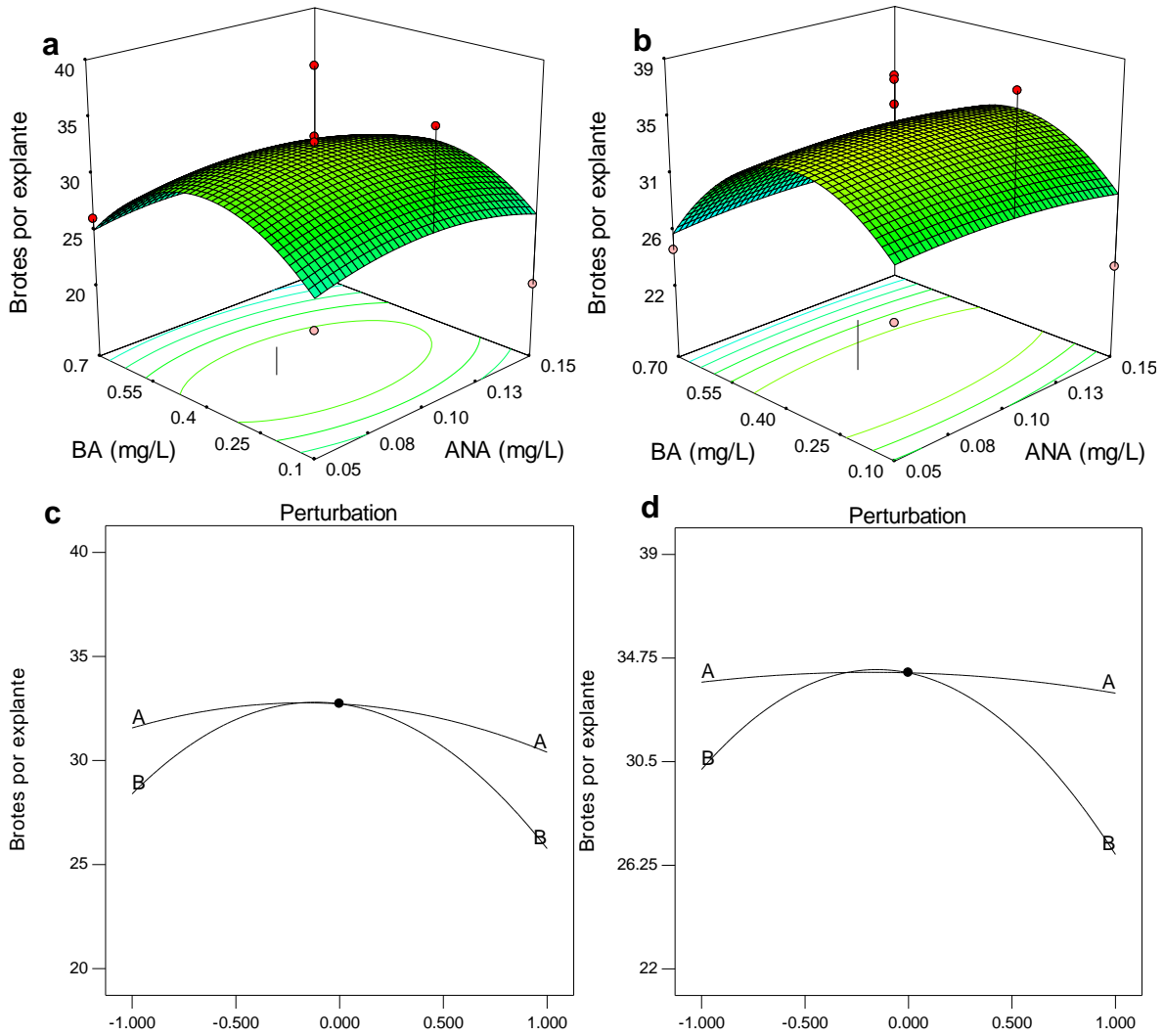


Figura 8. Graficas tridimensionales (3D) de superficie de respuesta mostrando el efecto de las variables (ANA y BA) sobre el número de brotes por explante. **a)** Explantes cotiledonales; **b)** hojas verdaderas. Graficas de perturbación mostrando el efecto de las variables **A** (ANA) y **B** (BA) en el número de brotes por explante. **c)** explantes cotiledonales y **d)** hojas verdaderas

El programa Design-Expert proporciona regresiones que permiten la derivación de las funciones cuadráticas, las cuales fueron aplicadas a los modelos de explantes cotiledonales y hojas verdaderas. Frecuentemente, la curvatura en la superficie de respuesta es tan pronunciada que la aplicación de un modelo de primer orden (inclusive con el término de interacción incluido) es inadecuado. En esta situación,

un modelo de segundo orden representa una mejor opción. El análisis de varianza (ANOVA) de la regresión cuadrática demostró que la derivación del ajuste del modelo no fue significativo ($p < 0.05$) para explantes cotiledonales y de hojas verdaderas (**Cuadro 13** y **Cuadro 14**).

El ANOVA (ver anexo 11.1) aplicado a las respuestas estimadas (número de brotes por explante) como una función de los factores **A** y **B** se muestra en el **Cuadro 13** para explantes cotiledonales, y en el **Cuadro 14** para hojas verdaderas. El coeficiente de variación para explantes cotiledonales fue de 23.03% (**Cuadro 13**) y para hojas verdaderas fue de 20.64% (**Cuadro 14**). Estos resultados indicaron una buena concordancia del modelo a los datos experimentales. La falta de ajuste del *valor de F* fue de 1.68 y 2.08 para explantes cotiledonales y hojas verdaderas, respectivamente; esto implica que la falta de ajuste no es significativa respecto al error puro. Por consecuencia, el modelo se adecua a los datos colectados en respuesta a las variables. El ajuste del modelo fue confirmado por el coeficiente de determinación (R^2). Los valores de R^2 para explantes cotiledonales y hojas verdaderas fueron 0.42 y 0.44, respectivamente (**Cuadro 13** y **Cuadro 14**); recordando que R^2 puede variar entre 0-1, valores cercanos a 1 indican que el modelo se ajusta bien a los datos experimentales (Wang, et al., 2005). Lo anterior también puede ser expresado como porcentaje de variabilidad en respuesta al modelo propuesto. Los resultados indican que alrededor del 40% de la variación en la respuesta (número de brotes por explante) se atribuye a las variables, mientras que el 60% de la variación observada puede ser el resultado de otros factores no considerados. En este caso, la función resultante de la regresión de segundo orden a partir de las dos variables estudiadas, produjo dos términos lineales, dos cuadráticos, una interacción de primer orden y una constante. Las interacciones 3D entre los términos **A** y **B** se muestran en las **Figura 8a y b**. Los puntos de referencia fueron evaluados usando cada uno de polinomios cuadráticos, y en ambos casos que observo que la mayor respuesta fue obtenida con 0.1 mg L⁻¹ de ANA y 0.4 mg L⁻¹ de BA. La superficie de respuesta fue generada a partir de las siguientes ecuaciones de segundo orden:

$$Y = 32.72 - 0.58 A - 1.32 B - 0.47 AB - 1.74 A^2 - 5.64 B^2$$

Ecuación 2. Ecuación del modelo de superficie de respuesta a partir de explantes cotiledonales de lechuga;

$$Y = 34.14 - 0.22 A - 1.74 B + 0.25 AB - 0.61 A^2 - 5.71 B^2$$

Ecuación 3. Ecuación del modelo de superficie de respuesta a partir de explantes de hojas verdaderas de lechuga;

Donde **Y** es la variable respuesta (brotes por explante), **A** y **B** son los factores codificados correspondientes a ANA y BA respectivamente. El ANOVA aplicado a las **Ecuación 2** y **Ecuación 3** confirmo que la contribución de cada termino no fue significativo ($p < 0.05$). También cada término en dichas ecuaciones tiene un efecto negativo sobre el número de brotes por explante, excepto el termino **AB** en hojas verdaderas (**Ecuación 3**). Este análisis también indica que con valores bajos de **A** y **B** induce una mayor cantidad de brotes por explantes. Estos resultados concuerdan con reportes previos de inducción de brotes de lechuga, donde altas concentraciones de reguladores de crecimiento fallan en la estimulación de la inducción de callos y brotes (Hunter and Burritt 2002).

Las gráficas de perturbación fueron usadas para comparar el efecto de cada uno de los factores en un punto particular del espacio del diseño de superficie de respuesta. Las gráficas muestran como cada factor influye en la respuesta cuando este cambia sobre todo el intervalo mientras el otro factor se mantiene constante en un punto de referencia. Las **Figura 8a y b** muestran que el factor **B** (BA) influye de manera más pronunciada en la inducción de brotes que el factor **A** (ANA), en explantes cotiledonales y hojas verdaderas. También se puede observar que a concentraciones menores y mayores al punto central del factor **B** tienen un efecto negativo en la respuesta. Además la variación en la concentración del factor **A** no tiene un efecto importante en la respuesta. Estudios previos también han demostrado la influencia de los reguladores de crecimiento en la inducción de

brotos; en los cuales la citocinina BA (0.1 a 1.0 mg L⁻¹) mostro la estimulación de la inducción de brotes en cultivos *in vitro* de lechuga (Curtis et al. 1994; Hunter and Burritt 2002; Mohebodini et al. 2011). También ANA (0.1 a 1.0 mg L⁻¹) fue más eficiente que otras auxinas en la regeneración de lechuga (Hunter and Burritt 2002). La función de conveniencia (desirability) del método es ampliamente usada para la optimización de procesos con una o múltiples respuestas. Basado en la noción de que la calidad de un producto a proceso que ofrece múltiples soluciones debe generar respuestas dentro de límites convenientes con la finalidad de ser aceptado. El programa Design-Expert determina las condiciones que proveen la respuesta más conveniente dentro de los límites establecidos. Las condiciones óptimas que sugirió el programa fueron 0.09 mg L⁻¹ de ANA y 0.36 mg L⁻¹ de BA para explantes cotiledonales con un valor predicho de brotes por explante de 32.8 y un coeficiente de conveniencia de 0.66 (**Figura 9a**), mientras que para hojas verdaderas las concentraciones optimas de ANA y BA fueron de 0.09 y 0.35 mg L⁻¹ para un valor de brotes por explante de 34.3 y un valor de 0.71 para el coeficiente de conveniencia (**Figura 9b**). Al comparar los datos experimentales (**Cuadro 8 y Cuadro 9**) con los predichos (**Figura 9a y b**) de brotes por explante estos, muestran una diferencia de 2.57 para explantes cotiledonales y 3.1 para hojas verdaderas. En ambos casos los valores predichos fueron sub-estimados en comparación con los valores experimentales, sin embargo las diferencias fueron menores al 10%. Un valor de conveniencia diferente de cero implica que todas las respuestas convergen dentro del intervalo determinado y, para valores cercanos a 1, la combinación de los diferentes factores es la óptima, además los valores de la respuesta son también los óptimos (Sivakumar et al. 2007). Los valores predichos por el análisis de conveniencia se encuentran razonablemente cercanos al punto central de los datos experimentales (número de brotes por explante y concentraciones de ANA y BA) y la diferencia entre los resultados experimentales (punto central) y los datos de optimización obtenidos con el programa, es mínima.

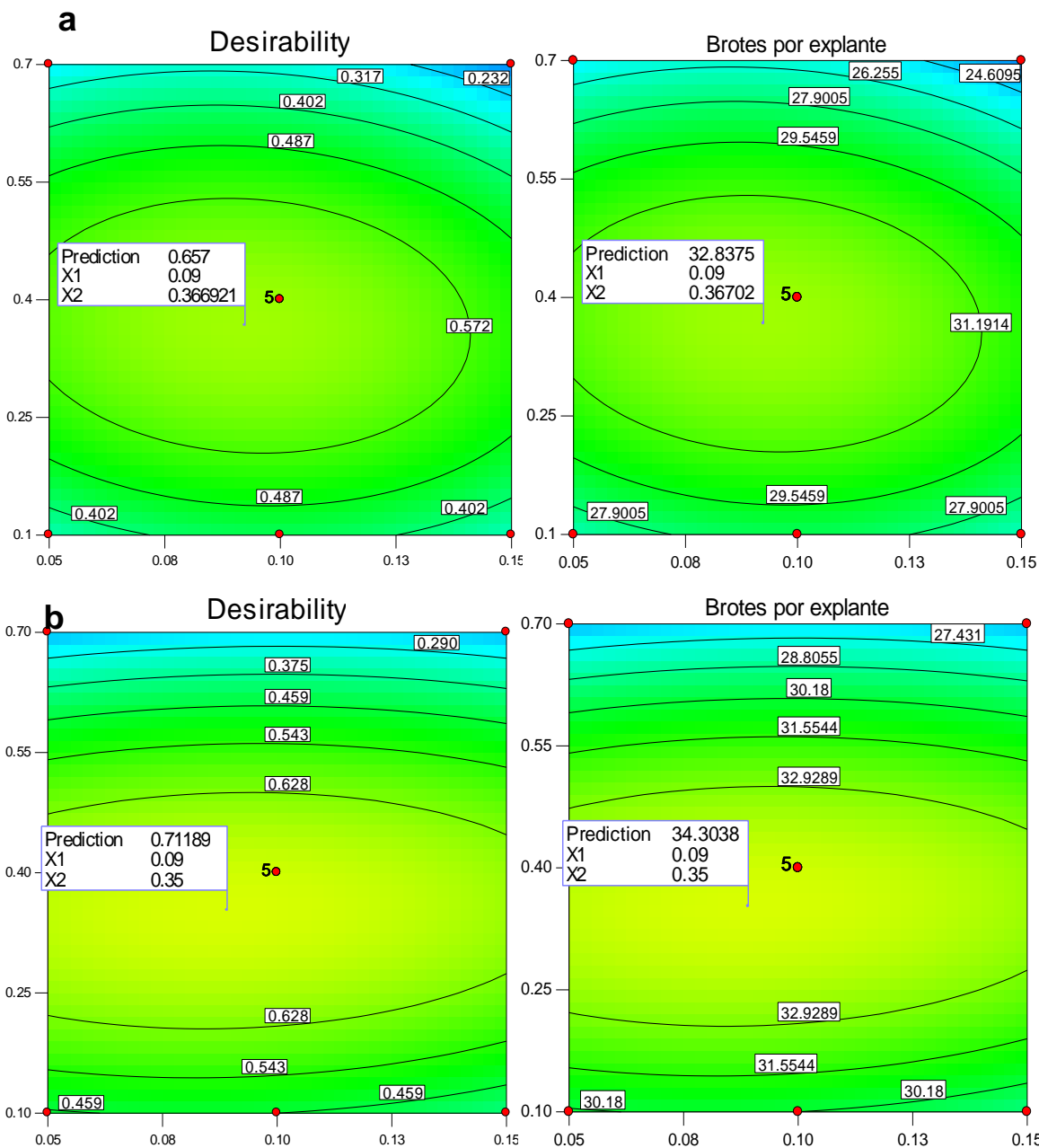


Figura 9. Graficas de contornos representando los valores predichos de brotes (brotes por explante) y la conveniencia (desirability) generada por el programa Design-Expert. **a)** Explantes cotiledonales; **b)** hojas verdaderas. Los contornos de azul a amarillo indican el *mínimo* al *máximo* de conveniencia del número de brotes por explante. En este caso el contorno central y *amarillo* refleja los valores óptimos de conveniencia y del número de brotes por explante. En el *lado izquierdo* los números de los contornos representan la conveniencia de cada condición. En el *lado derecho* los números de los contornos se refieren al número de brotes por

explante esperados. En el *recuadro* se observan las concentraciones óptimas predichas de los reguladores de crecimiento vegetal X1 = ANA, y X2 = BA. El número “5” en el centro representa el número de puntos (x, y) examinados

5.2. Diseño y Construcción de los vectores pEOGM y pEOGM-p24/nef

Para el diseño y la construcción del vector pEOGM se siguió la estrategia experimental representada en la **Figura 10**. Los iniciadores JAB420 y JAB421 (**Cuadro 4**) fueron diseñados a partir de la secuencia del genoma del cloroplasto de *L. sativa* por Kanamoto et al., (Kanamoto et al. 2006) y Timme et al., (2007), con los cuales se amplificó por PCR una región de 2553 pb del gen *rbcL-accD* del genoma del cloroplasto específica de *L. sativa* c.v. Romana como se describe en el apartado **4.7.11** de materiales y métodos. El fragmento de ADN anteriormente mencionado fue insertado (sección **4.7.6**) en el sitio de corte *SmaI* del vector pBluescript SK(+). A partir del producto de ligación se transformaron células de *E. coli* (sección **4.6.2**). El ADN plasmídico se extrajo mediante lisis alcalina (sección **4.7.2**). El tamaño del vector se verificó mediante un gel de agarosa 1% previo a su secuenciación. Posteriormente se diseñaron los iniciadores JAB467 y JAB468 (**Cuadro 4**) para amplificar por PCR el cassette de expresión loxP-*Prrn-aadA-TrbcL-loxP* a partir del vector pZSJH (Svab and Maliga 1993), dicho cassette de expresión fue clonado mediante SLIC (sección **4.7.7**) en el sitio único *BSU36I* presente en la región intergénica *rbcL-accD*. Posterior a la ligación se transformaron células de *E. coli* para obtener suficiente cantidad de plásmido, el cual se extrajo mediante lisis alcalina. El tamaño del vector se verificó mediante un gel de agarosa 1% previo a su envío para ser secuenciado.

La **Figura 11** muestra la estrategia experimental que se siguió para la construcción del vector pEOGM-p24/nef. Para la construcción del vector pEOGM-p24/nef, se escindió el cassette de expresión *Prrn+T7g10 5'UTR-p24-nef-TrbcL* del vector Nt-pZF7 (Zhou et al. 2008) mediante la digestión con las enzimas *SacI* y *HindIII* (sección **4.7.5**), el producto de restricción fue purificado en un gel de agarosa al 1% y posteriormente insertado en sentido opuesto (3'-5') en los sitios *SacI* y *HindIII*

contenidos en el vector pEOGM. Posterior a la verificación por secuenciación se realizó una Maxiprep del vector pEOGM mediante cultivo de *E. coli* para obtener una concentración de $1 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ empleado para la modificación genética de lechuga mediante biobalística.

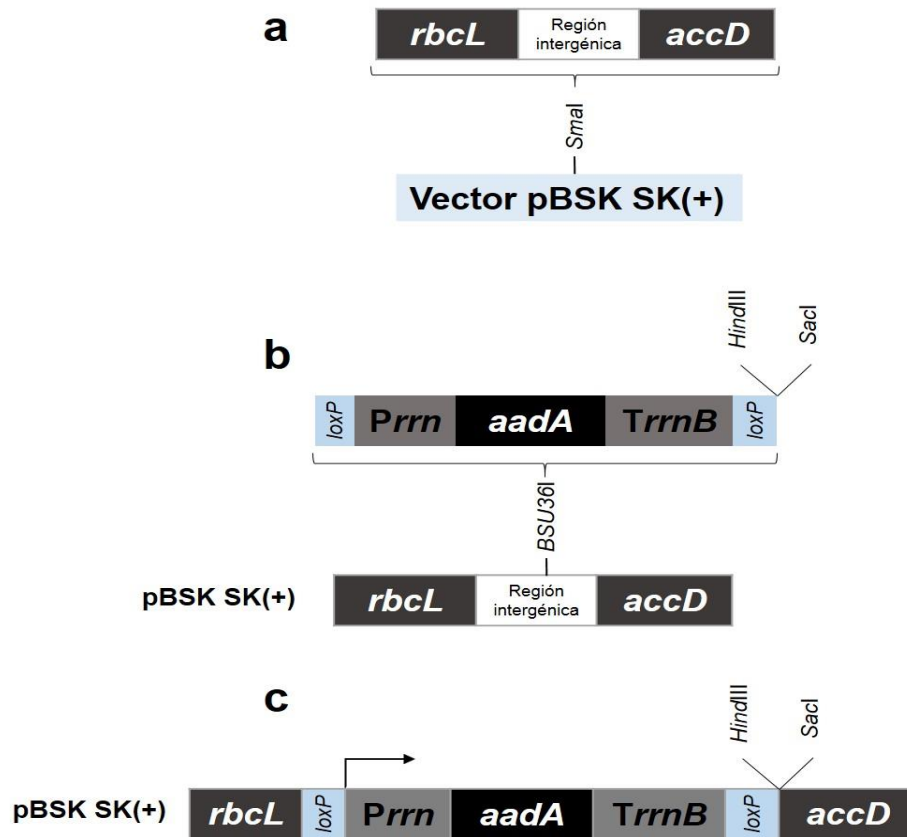
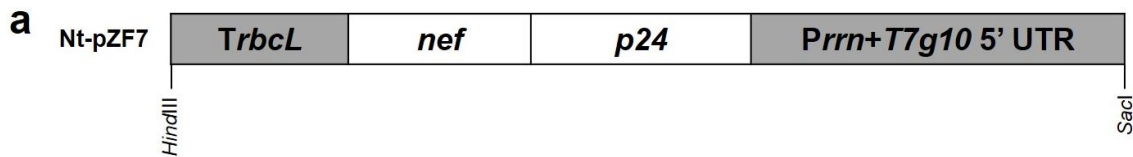


Figura 10. Esquema de la construcción del vector pEOGM. **a)** Restricción del vector pBluescript SK(+) con la enzima *SmaI* y la subsecuente inserción del producto de PCR de los genes *rbcL-accD* (2553 pb); **b)** restricción del vector pBluescript SK(+) conteniendo los genes *rbcL-accD* con la enzima *BSU36I* y la inserción del cassette de expresión *aadA* flanqueado por los sitios *loxP*; **c)** vector pEOGM conteniendo las regiones homologas *rbcL-accD* del genoma de cloroplasto de lechuga y el cassette de expresión *aadA* como marcador de selección.



6.

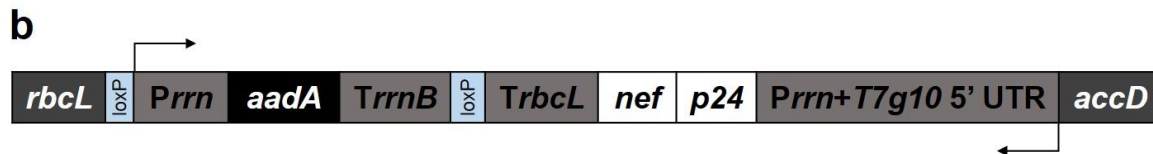


Figura 11. Esquema de la construcción del vector pEOGM-p24/nef. **a)** Escisión del cassette de expresión p24/nef con las enzimas de restricción *Hind*III y *Sac*I a partir del vector Nt-pZF7 y su ligación en los mismos sitios de corte del vector pEOGM; **b)** vector pEOGM conteniendo las regiones homologas *rbcL-accD* del genoma de cloroplasto de lechuga, el cassette de expresión *aadA* como marcador de selección y el cassette de expresión p24/nef que codifica para las proteínas p24 y nef del VIH.

Para llevar a cabo la modificación genética del cloroplasto de lechuga, se construyó un vector (pEOGM) de transformación (**Figura 12**). Una región de 2553 pb (**Figura 12a**) la cual comprende una parte de los genes *rbcL-accD* (incluyendo la región intergénica) del cloroplasto de lechuga (*L. sativa*) c.v. Romana, fue amplificada por PCR (como se describe en la sección **4.7.11**) con los iniciadores JAB420 y JAB421, diseñados a partir de la secuencia del genoma de *L. sativa* c.v. Cisco reportada por Kanamoto et al., (2006). La región *rbcL-accD* amplificada por PCR fue separada en un gel de agarosa 1% (**Figura 12a**) como se describe en la sección **4.7.8**, el tamaño del fragmento de ADN fue el esperado (≈ 2500 pb). La electroforesis muestra una sola banda (**Figura 12a**).

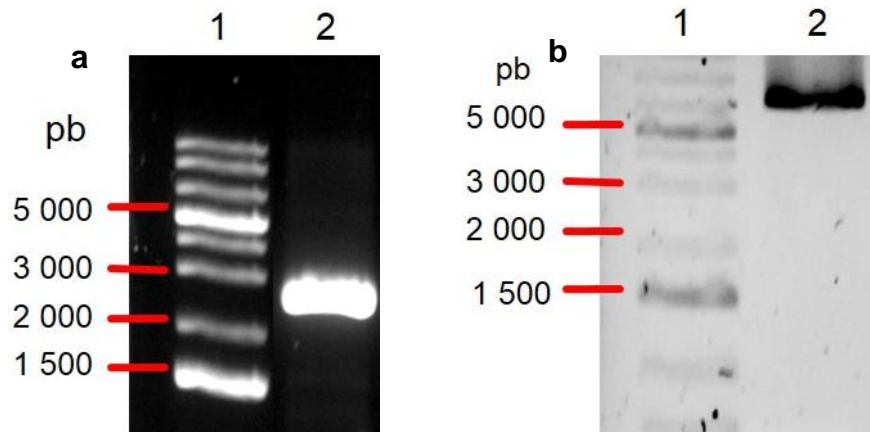


Figura 12. Electroforesis de agarosa de la región *rbcL-accD* y de su respectiva inserción en el vector pBSK SK(+). **a)** carril 1: marcador de peso molecular 1 kb; carril 2: producto de la amplificación del fragmento de las regiones *rbcL-accD* (2553 pb) por PCR con los iniciadores JAB420 y JAB421 en gel de agarosa 1%; **b)** carril 1: marcador de peso molecular 1 kb; carril 2: producto de la ligación de las regiones *rbcL-accD* obtenidas por PCR en el sitio único de restricción *SmaI* del vector pBSK SK(+).

A partir de este gel el fragmento de ADN fue purificado (sección 4.7.10). Posteriormente el producto de PCR de la región *rbcL-accD* fue insertado (sección 4.7.6) en el sitio único de restricción *SmaI* del sitio múltiple de clonación (SMC) del vector pBlueskript SK(+). La correcta ligación y el tamaño del vector fueron confirmados primero por electroforesis de agarosa. Posteriormente la construcción del vector pBSK-*rbcL-accD* fue confirmada por secuenciación empleando los iniciadores M13 Fwd y Rev (sección 4.5). Los resultados del análisis de electroforesis fueron los esperados obteniendo una banda de ≈ 5511 pb. El alineamiento de los resultados de secuenciación con el programa CodonCode Aligner mostró la correcta identidad de la región *rbcL-accD* reportada por Kanamoto et al., (2006). A partir de estos resultados se obtuvo la primer parte del vector pEOGM.

Posteriormente se amplificó el gen *aadA* (Figura 14a) que confiere resistencia a espectinomicina y estreptomomicina como marcador de selección (Svab et al. 1990)

con los iniciadores JAB467 y JAB468 a partir del vector pZSJH1 (Birch-Machin et al. 2004). La región codificante de *aadA* (**Figura 14a**) fue colocada bajo el control del promotor (*Prrn*) fuerte constitutivo del operon ribosomal RNA de cloroplasto de tabaco, además del sitio de unión a ribosomas de *rbcL* colocado en el sitio 5'UTR y un sitio 3'UTR del gen fotosintético *psbA* (Svab and Maliga 1993). El gen *aadA* está flanqueado por los sitios *loxP*. En el extremo 3' del gen *aadA* (al final del sitio *loxP*) se introdujeron los sitios *HindIII* y *SacI* (**Figura 10b**). El gen *aadA loxP* fue insertado (**Figura 14a**) mediante el método de SLIC (Li and Elledge 2012) en el sitio único *BSU36I* situado en la región intergénica *rbcL-accD* (**Figura 10b**).

La identidad del vector fue verificada en primer lugar por tamaño mediante electroforesis de agarosa al 1%. El tamaño del vector fue el esperado ≈ 7051 pb (**Figura 14b**). La correcta construcción del vector pEOGM (**Figura 10c**) fue verificada por secuenciación utilizando los iniciadores M13 (Fw y Rv), JAB 420, 421, 467 y 468 (**Cuadro 4**). El alineamiento de los resultados de secuenciación con el programa CodonCode Aligner mostró la correcta identidad del vector pEOGM y la inserción del gen *aadA loxP* en el sitio *BSU36I*. La secuencia completa de este vector es reportada en el **anexo 11.2**.

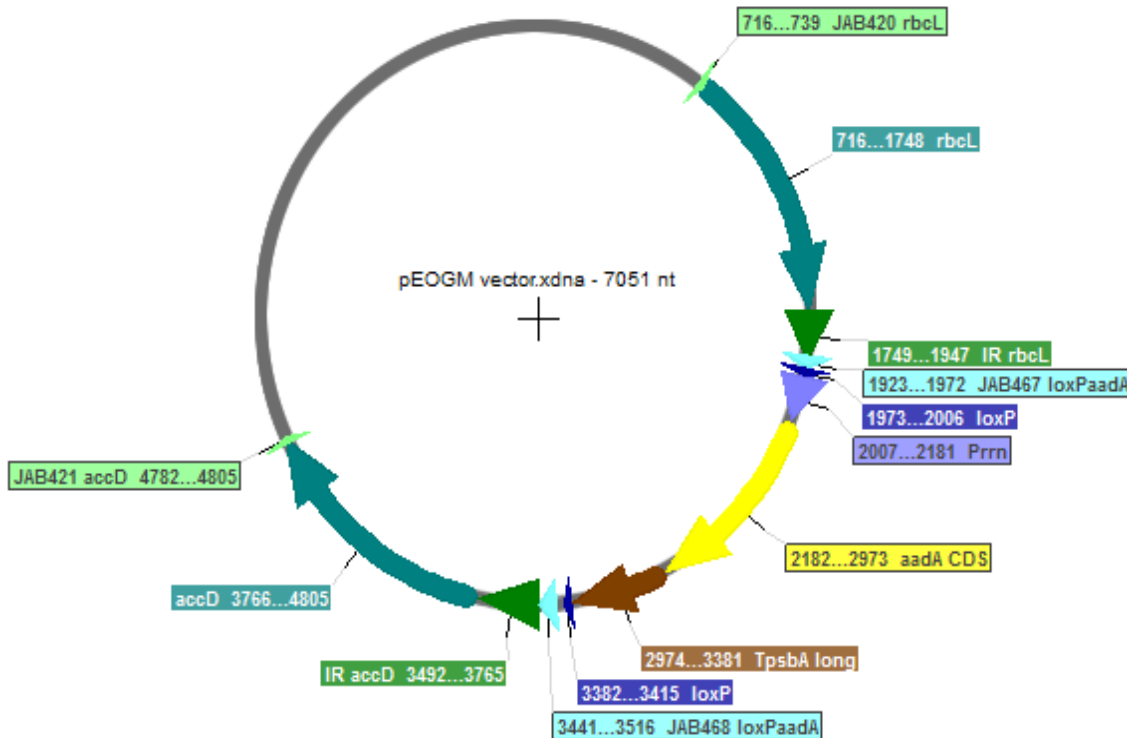


Figura 13. Representación esquemática del vector pEOGM. El vector contiene 2553 pb de los genes *rbcL-accD* del genoma de cloroplasto de lechuga c.v. Romana insertado en el sitio *SmaI* del sitio múltiple de clonación del vector pBluescript SK(+), el gen *aadA* que confiere resistencia a espectinomicina y estreptomycinina fue insertado en el sitio *BSU36I* mediante SLIC.

Para la construcción del vector pEOGM-p24/nef se extrajo el cassette de expresión *p24/nef* (**Figura 14b**) del vector Nt-pZF7 (Zhou et al. 2008) por restricción con las enzimas *HindIII* y *SacI* (**Figura 11a**). El vector pEOGM fue cortado con las mismas enzimas (**Figura 14b**) para su posterior ligación en sentido opuesto al gen *aadA* en los sitios *HindIII* y *SacI* (**Figura 14b**). La correcta construcción y orientación del vector pEOGM-p24/nef (**Figura 11b**) fue verificada por secuenciación con los iniciadores M13 (Fwd y Rev), JAB 420, 421, 467, 468, p24 (Fwd y Rev) y nef (Fwd y Rev). El alineamiento de los resultados de secuenciación con el programa CodonCode Aligner mostró la correcta identidad del vector pEOGM-p24/nef (**Figura 13**) y la inserción del gen *aadA loxP* en el sitio *BSU36I*, y del cassette de expresión *p24/nef* en los sitios *HindIII* y *SacI* en sentido opuesto al gen *aadA loxP*.

Posteriormente se realizó la obtención a gran escala del plásmido pEOGM y pEOGM-p24/nef como se describe en la sección 4.7.3 para emplearlo en el bombardeo de hojas de lechuga c.v. Romana (sección 4.9.1).

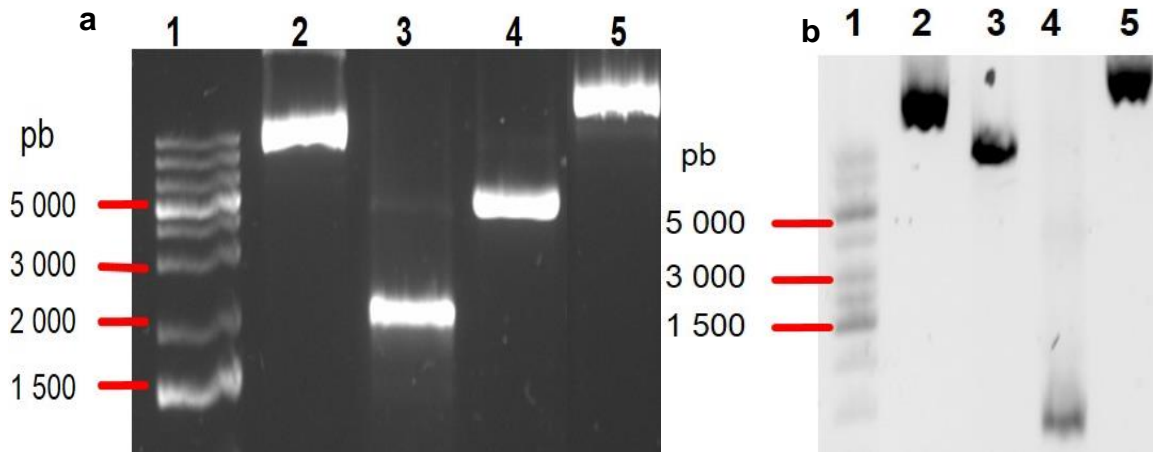


Figura 14. Electroforesis de agarosa del vector pEOGM y pEOGM-p24/nef. **a)** carril 1: marcador de peso molecular 1 kb; carril 2: vector pBluescript conteniendo las regiones *rbcL-accD* del cloroplasto de lechuga (pBSK-*rbcL-accD*), carril 3: producto de PCR del gen *loxP aadA*, carril 4: pBSK-*rbcL-accD* digerido con la enzima de restricción *BSU36I*, carril 5: vector pEOGM conteniendo el cassette *aadA loxP* insertado por SLIC en el sitio *BSU36I*; **b)** carril 1: marcador de peso molecular; Carril 2: vector pEOGM, carril 3: vector pEOGM digerido con las enzimas de restricción *HindIII* y *SacI*, carril 4: cassette de expresión *p24/nef* obtenido mediante la digestión del vector Nt-pZF7 con las enzimas *HindIII* y *SacI*, carril 5: vector pEOGM-p24/nef obtenido mediante la inserción del cassette de expresión *p24/nef* en los sitios de restricción *HindIII* y *SacI* del vector pEOGM.

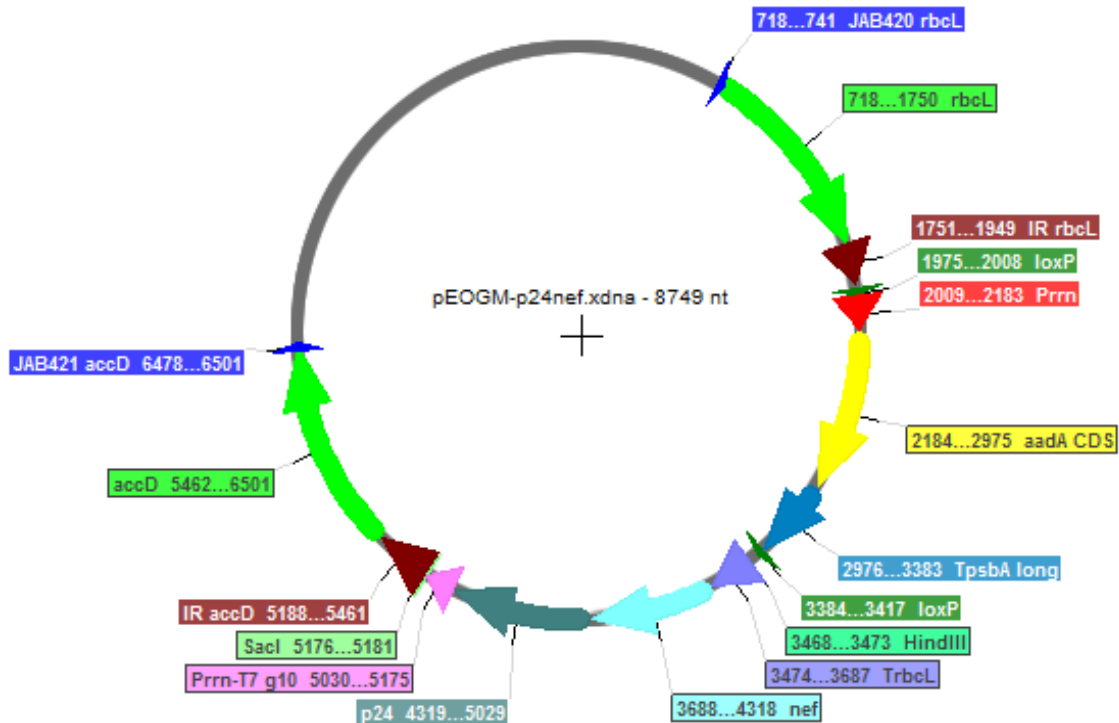


Figura 15. Representación esquemática del vector pEOGM-p24/nef.

El vector tiene como base el vector pEOGM el cual contiene los sitios de restricción *HindIII* y *SacI* en el extremo 3' al final del sitio *loxP*, en dichos sitios se insertó el cassette de expresión p24/nef en sentido opuesto al gen *aadA*. La secuencia completa de este vector es reportada en el **anexo 12.3**.

6.1. Modificación genética de cloroplastos de lechuga mediante biobalística

Se iniciaron los bombardeos de hojas de lechuga c.v. Romana siguiendo los protocolos descritos por Kanagaraj, et al., (2011) (protocolo 1) y Lim, et al., (2011a) (protocolo 2). Se empleó el vector pLCV2-GFP/*aadA* (sección 4.4) que contiene regiones intergénicas *rrn16/trnI* hasta *trnA/rrn23* del genoma del cloroplasto de tabaco, el gen *aadA* (que confiere resistencia a espectinomicina y estreptomicina) como marcador de selección y el gen *gfp* (que codifica para la proteína verde fluorescente) como proteína reportera (Lelivelt et al. 2005). Se realizaron aproximadamente 28 eventos de transformación (**Cuadro 10**) usando micropartículas de tungsteno 0.7 µm, siguiendo los protocolos y usando el vector

antes mencionados. Cuando se bombardearon hojas de lechuga c.v. Romana con tungsteno se observó un gran daño tisular (protocolo 1 **Figura 16a**) y oxidación (protocolo 2 **Figura 16b**) en la zona (amarilla/café) donde impactaron la mayor cantidad de partículas. Se logró observar la formación de tejido calloso (**Figura 16d**) a partir de los explantes de las hojas bombardeadas y, también muerte celular de los explantes (**Figura 16c**) ambos a 42 días de cultivo en medio de regeneración selectivo.

Cuadro 10. Eventos de transformación para la modificación genética de cloroplastos de lechuga c.v. Romana con el vector pLCV2-GFP/aadA mediante biobalística

Protocolo	Número de bombardeos	Brotos regenerados	Micropartículas
1	30	0.0	Tungsteno 0.7 µm
2	30	0.0	Tungsteno 0.7 µm
*1	20	0.0	Tungsteno 0.7 µm
*2	20	0.0	Tungsteno 0.7 µm
**1	10	0.0	Tungsteno 0.7 µm
**2	10	0.0	Oro 0.6 µm
*1	10	0.0	Oro 0.6 µm
*2	10	0.0	Oro 0.6 µm

* Hepta-adaptador, ** Callos 14 días de cultivo

No se logró obtener brotes transplastómicos con los eventos de transformación antes mencionados. Existen diversos factores limitantes en la transformación genética mediante biobalística uno de ellos es la baja tasa de obtención de transformantes debido al daño celular. El sistema modelo para la modificación genética de cloroplastos mediante biobalística ha sido tabaco. Los primeros trabajos de transformación de cloroplastos de tabaco (Svab and Maliga, 1990; 1993)

reportaron la obtención de un brote resistente a espectinomicina por cada 50 hojas bombardeadas. Durante los últimos años la eficiencia de transformación ha mejorado mediante la estandarización y optimización de los protocolos para el recubrimiento de partículas con ADN (Maliga and Svab 2011) y del bombardeo, con lo cual se han obtenido más de 10 brotes por cada hoja bombardeada (Zhou et al. 2008). Al emplear el equipo de biobalística PSD-1000/He comercial, una porción de las células y/o tejido tienden sufrir daño o morir debido al impacto del helio y las partículas sobre el tejido durante la explosión del disco de ruptura. Lo anterior ocasiona la presencia de zonas de tejido sin transformar, y el daño puede probablemente provocar también, que otras células fuera de esta zona sufran daño y se vea alterado su crecimiento y división celular. (Russell et al. 1992). Otro factor que afecta la obtención de transformantes es el uso de partículas de tungsteno ya que presenta diversas desventajas en el bombardeo hojas y células en suspensión de tabaco como: mayor oxidación (Southgate et al. 1995), toxicidad y daño del tejido debido a la reducción del pH del medio (Russell et al. 1992), su superficie irregular no permite la correcta adhesión de ADN (plásmido) (Southgate et al. 1995), por lo anterior se han usado partículas de oro obteniendo un mayor número de transformantes (Russell et al. 1992).

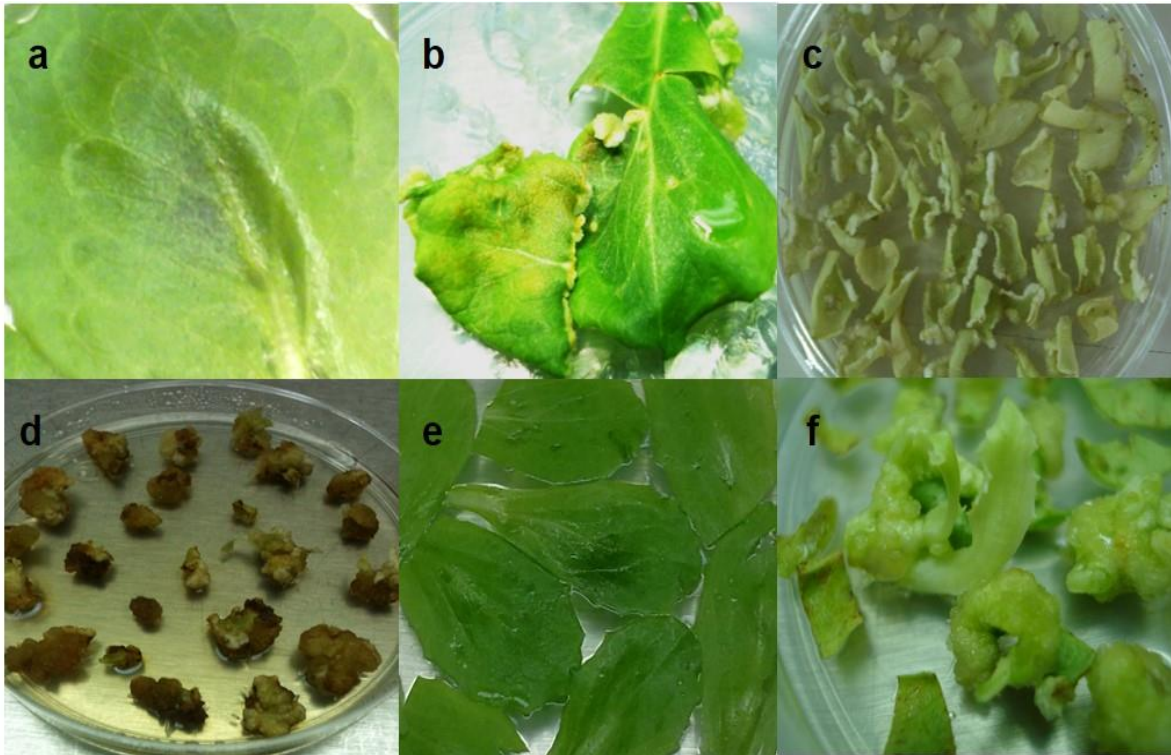


Figura 16. Bombardeo de hojas de lechuga c.v. Romana con micropartículas de tungsteno y oro empleando el vector pLCV2-GFP/aadA. Hojas de lechuga bombardeadas: Protocolo 1 **a)** hojas de lechuga bombardeadas con tungsteno; **c)** explantes de hojas bombardeadas con tungsteno a 42 días de cultivo en MSR-S; **e)** hojas de lechuga bombardeadas con oro. Protocolo 2 **b)** hojas de lechuga bombardeadas con tungsteno; **d)** tejido calloso a 42 días de cultivo en MSR-S; **f)** inducción de callos 14 días de cultivo y brotes a partir de hojas bombardeadas con oro 42 días de cultivo en MSR-S. MSR=medio de regeneración MS2 del protocolo de regeneración; MSR-S= medio de regeneración selectivo 50 mg L⁻¹ espectinomicina.

Como los resultados obtenidos en la transformación genética de cloroplastos de lechuga no fueron los esperados, se realizaron los siguientes bombardeos con micropartículas de oro 0.6 μm cuyo uso ha sido reportado por diversos autores en la transformación genética de cloroplastos de lechuga y que presentan menores desventajas que el tungsteno (Southgate et al. 1995) reduciendo de forma importante los daños en el tejido (**Figura 16e**) y observando la formación de tejido

calloso y brotes a los 14 y 42 días de cultivo (**Figura 16f**), respectivamente. Sin embargo, debido a la falta de células transformadas y la obtención de brotes resistentes a espectinomicina se decidió emplear la variedad de lechuga (Flora) reportada por Lelivelt et al., (2005) con la cual se amplificaron las regiones homologas del cloroplasto de lechuga presente en el vector pLCV2-GFP/aadA. Por lo tanto, se realizaron subsecuentes bombardeos (**Cuadro 11**) de hojas de lechuga variedad Flora (**Cuadro 11**) con el vector pLCV2-GFP/aadA (**Figura 19a**).

Cuadro 11. Eventos de transformación para la modificación genética de cloroplastos de lechuga c.v. Flora con el vector pLCV2-GFP/aadA mediante biobalística

Protocolo	Número de bombardeos	Brotos regenerados	Micropartículas
1*	10	0.0	Oro 0.6 µm
2*	30	0.0	Oro 0.6 µm
1	40	0.0	Oro 0.6 µm
2	70	0.0	Oro 0.6 µm

* Hepta-adaptador

Sin embargo se observó una baja tasa de regeneración en los controles positivos (**Figura 19b**) empleando la formulación del medio para el cultivo de callos (Lelivelt et al. 2005), así como una nula obtención de brotes (únicamente tejido calloso) transplastómicos a partir de hojas bombardeadas a los 42 días de cultivo (**Figura 19c**) en medio de regeneración (MS4) selectivo que coincide con el medio reportado por Lelivelt et al., (2005).

Por todo lo anterior, se decidió realizar un control positivo de la metodología de transformación genética de cloroplastos mediante biobalística, para determinar si la falta de brotes resistentes a espectinomicina estaba influenciado por errores en la metodología. Para este fin se empleó el vector de pZSHJ-gfp reportado para la modificación genética de cloroplastos de tabaco. Este vector contiene el cassette

de expresión *aadA* que confiere resistencia a espectinomicina y estreptomycin (como marcador de selección) y el cassette *gfp* que codifica para la proteína verde fluorescente (como proteína reportera).

La modificación genética de cloroplastos de tabaco se realizó siguiendo el protocolo 2 (sección 4.9.4) empleado para modificación genética de cloroplastos de lechuga. Se realizaron aproximadamente 20 eventos de transformación (120 bombardeos) durante 4 meses. Se logró obtener un brote (**Figura 17a**) y tejido calloso (**Figura 17b**) a partir de dos eventos de transformación diferentes. Con el tejido calloso se lograron obtener 9 brotes más.

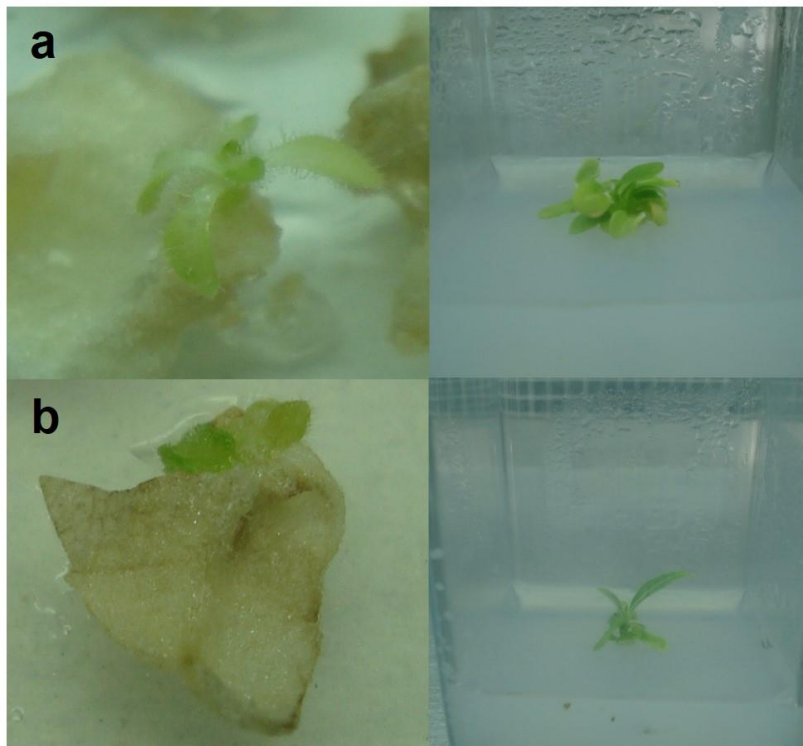


Figura 17. Transformación genética de cloroplastos de tabaco con el vector pZSJH-*gfp*. **a)** Brote adventicio a partir del cual se obtuvo una planta de tabaco resistente a espectinomicina; **b)** Tejido callos a partir del cual se obtuvieron 10 brotes de tabaco.

Todos los brotes fueron colocados en cajas magenta conteniendo medio NB suplementado con 500 mg L⁻¹ de espectinomicina para su enraizamiento. Después de 3 semanas se realizó la extracción de tejido de dichas plantas para la

confirmación de la modificación genética de cloroplastos por PCR (como se describe en la sección 4.10.1). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con los iniciadores *aadA* (Fwd y Rev) y JAB 280, 281 para *gfp*.

Cuadro 12. Resultados de la caracterización molecular de las plantas de tabaco resistentes a espectinomicina

Brotos	Plantas resistentes a espectinomicina	Confirmación por PCR	
		<i>aadA</i>	<i>gfp</i>
1* A	+	+	+
2** B	+	+	+
3** C	+	-	+
4** D	+	+	+
5** E	+	+	-
6** F	+	+	+
7**	-	-	-
8**	-	-	-
9**	-	-	-
10**	-	-	-

* Evento de transformación No.1 brote = 1 planta. ** Evento de transformación No.2 tejido caloso = 9 plantas

Los resultados de la transformación genética de cloroplastos de tabaco (**Cuadro 12**) muestran que a partir del brote se obtuvo una planta resistente a espectinomicina y con el tejido caloso se obtuvieron 10 brotes de los cuales solo 6 fueron resistentes. La verificación de la integración de los genes *aadA* y *gfp* en el genoma del cloroplasto de tabaco mediante PCR y su posterior separación en gel de agarosa 1% (**Figura 18**) mostró una sola banda tanto para el gen *aadA* (**Figura 18a**) como para *gfp* (**Figura 18b**) del mismo tamaño que la obtenida en el control positivo (vector pZSJH-*gfp*). El desarrollo de las plantas en medio selectivo, la fluorescencia de las mismas al ser expuestas a luz UV así como los resultados de las reacciones

de PCR confirmaron la integración de marcador de selección (gen *aadA*) y la expresión de la proteína reportera (*gfp*).

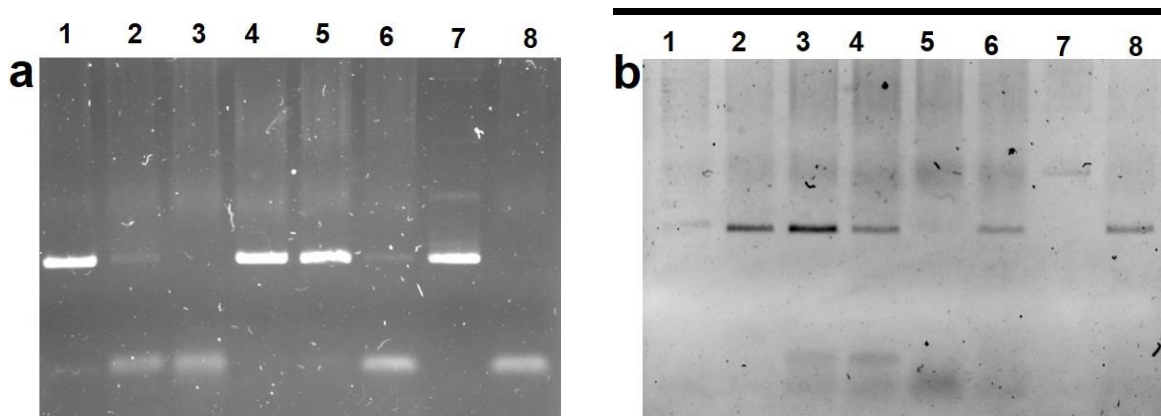


Figura 18. Caracterización molecular de las plantas de tabaco modificadas genéticamente en cloroplasto con el vector pZSJH-gfp. **a)** Amplificación por PCR del gen *aadA* a partir de ADN de plantas de tabaco resistentes a espectinomicina carril 1 al 6: plantas A, B, C, D, E, F; carril 7: control (+) vector pZSJH-gfp; carril 8: control (-) planta de tabaco silvestre; **b)** Amplificación por PCR del gen *gfp* a partir de ADN de plantas de tabaco resistentes a espectinomicina carril 1 al 6: plantas A, B, C, D, E, F; carril 7: control (-) planta de tabaco silvestre; carril 8: control (+) vector pZSJH-gfp.

Con los resultados obtenidos se concluyó que la mejor alternativa sería la construcción de vectores de transformación específicos para la variedad Romana, la cual, presentó los mejores resultados de regeneración. Por lo anterior se realizó la construcción de los vectores pEOGM y pEOGM-p24/nef conteniendo las regiones homologas *rbcL-accD* del genoma del cloroplasto de lechuga c.v. Romana.

El primer vector obtenido fue pEOGM con el cual se realizaron los primeros eventos (4 eventos) de transformación con la variedad Romana y micropartículas oro 0.6 μm , a partir de los cuales no se obtuvieron brotes resistentes a espectinomicina debido a los pocos eventos de transformación realizados. En cuanto fue verificada la correcta construcción del vector pEOGM-p24/nef se realizaron los subsecuentes eventos de transformación de hojas de lechuga c.v. Romana con partículas de oro en los cuales se logró obtener tejido calloso en el 100% de los explantes (**Figura**

19d) los cuales presentaban indicios de formación de brotes (**Figura 19e**). Además de tejido calloso se obtuvieron aproximadamente 10 explantes con brotes (**Figura 19f**), sin embargo estos no fueron transplastómicos ya que no sobrevivieron en medio MS $\frac{1}{2}$ con 50 mg L $^{-1}$ de espectinomicina reportado para el enraizamiento de estos. Actualmente se sigue realizando eventos de bombardeo de hojas de lechuga c.v. Romana con el vector pEOGM-p24/nef.



Figura 19. Bombardeo de hojas de lechuga con partículas de oro empleando el vector pLCV-GFP y pEOGM-p24/nef. **a)** Hojas de lechuga bombardeadas c.v. Flora; **b)** control positivo c.v. Flora, inducción de tejido calloso a los 42 días de cultivo en medio MSR; **c)** inducción de callos a los 42 días de cultivo en MSR-S c.v. Flora; **d)** explantes de hojas de lechuga bombardeadas con el vector pEOGM-p24/nef c.v. Romana a 28 días de cultivo en MSR-S; **e)** inducción de tejido calloso a 28 días de cultivo en MSR-S c.v. Romana, vector pEOGM-p24/nef; **f)** inducción de brotes 42 días de cultivo en MSR-S c.v. Romana, pEOGM-p24/nef. MSR=medio de regeneración MS2 del protocolo de regeneración; MSR-S= medio de regeneración selectivo 50 mg L $^{-1}$ espectinomicina.

7. CONCLUSIONES

a) *Protocolo de regeneración*

En el presente trabajo se determinaron las concentraciones óptimas de reguladores de crecimiento vegetal (0.09 mg L^{-1} NAA, 0.37 mg L^{-1} BA) en el cultivo *in vitro* de lechuga variedad Romana a partir de hojas cotiledonales y verdaderas empleando un Diseño Central Compuesto de Superficie de Respuesta. Los promedios de los valores experimentales de brotes por explante obtenidos con los todos los medios de cultivo probados fueron muy cercanos a los obtenidos a partir del modelo. Se obtuvo el mayor número de brotes por explante (35.36 y 37.44) a partir de explantes de hojas cotiledonales y verdaderas empleando 0.1 mg L^{-1} ANA, 0.4 mg L^{-1} BA con respecto a los demás medios de cultivo probados. En el presente trabajo se logró obtener el mayor número de brotes por explante de lechuga reportado a la fecha. Y esta es la primera vez que se usó un Diseño Central Compuesto de Superficie de Respuesta para optimizar la respuesta en función de la concentración de reguladores de crecimiento vegetal en el cultivo *in vitro* de tejidos.

Los mejores resultados de inducción de brotes obtenidos con la variedad Flora fueron para hojas verdaderas de 2.10 (MS4 0.1 mg L^{-1} ANA, 0.1 mg L^{-1} BA) y para explantes cotiledonales de 2.07 (MS4 0.1 mg L^{-1} ANA, 0.1 mg L^{-1} BA) brotes por explantes, respectivamente. Debido a los valores sumamente bajos de brotes por explante, el programa Design-Expert no pudo obtener un modelo a partir de los datos experimentales y por lo tanto estos resultados no fueron evaluados mediante superficie de respuesta. Con la variedad Romana los valores de brotes por explante (hojas verdaderas y explantes cotiledonales) fueron aproximadamente 17 veces mayores a los obtenidos con la variedad Flora.

b) *Construcción de vectores*

Se diseñaron y construyeron los vectores de transformación de cloroplastos de lechuga pEOGM y pEOGM-p24/nef. Ambos vectores son específicos para el

genoma del cloroplasto de lechuga c.v. Romana. El primero contiene las regiones *rbcL-accD* y un cassette de expresión *aadA* que confiere resistencia a espectinomicina y estreptomomicina (como marcador de selección) flanqueado por los sitios *loxP*.

El vector pEOGM-p24/nef tiene como base el vector pEOGM al cual se le inserto en contra sentido el cassette de expresión p24/nef con los genes que codifican para las proteínas p24 y nef del virus del VIH.

c) Modificación genética de cloroplastos de lechuga

A partir de los eventos de transformación (con micropartículas de tungsteno) de cloroplastos de lechuga c.v. Romana y Flora con el vector pLCV2-gfp/addA no se logró obtener plantas modificadas genéticamente en cloroplasto. Resultados similares se obtuvieron durante los eventos de transformación de cloroplastos de lechuga con la variedad Romana empleando el vector pEOGM y pEOGM-p24/nef. Se observó un daño celular severo en las hojas de lechuga durante los eventos de transformación cuando se emplearon micropartículas de tungsteno (0.7 μm), posiblemente esto interfirió en la viabilidad de las células de lechuga y provocó la disminución de la regeneración y por ende la nula obtención de brotes resistentes a espectinomicina. En cambio en los eventos de transformación (con micropartículas de oro) de cloroplastos de lechuga c.v. Romana con el vector pEOGM y pEOGM-p24/nef, no se observó daño celular severo en las hojas de lechuga durante los eventos de transformación, y estas hojas dieron lugar a callos que soportaron 2 rondas de selección sin muerte del tejido, dichos callos aún continúan en medio selectivo.

En los eventos de transformación (con micropartículas de oro) de cloroplastos de lechuga c.v. Romana y c.v. Flora con el vector pEOGM y pEOGM-p24/nef.

d) Modificación genética de cloroplastos de tabaco

Se logró modificar genéticamente cloroplastos de tabaco empleando el vector pZSJH-gfp el cual contiene el gen *aadA* que confiere resistencia a espectinomicina

y estreptomycin (como marcador de selección) y el gen *gfp* que codifica para la proteína verde fluorescente (como proteína reportera). Se confirmó mediante PCR la inserción de estos genes en el genoma del cloroplasto de tabaco.

8. PERSPECTIVAS

Optimizar el protocolo de transformación de cloroplastos de lechuga c.v. Romana a partir de hojas verdaderas mediante biobalística.

Evaluar el método de transformación genética de cloroplastos de lechuga c.v. Romana mediante polietilenglicol empleando protoplastos.

9. APORTACIONES CIENTIFICAS

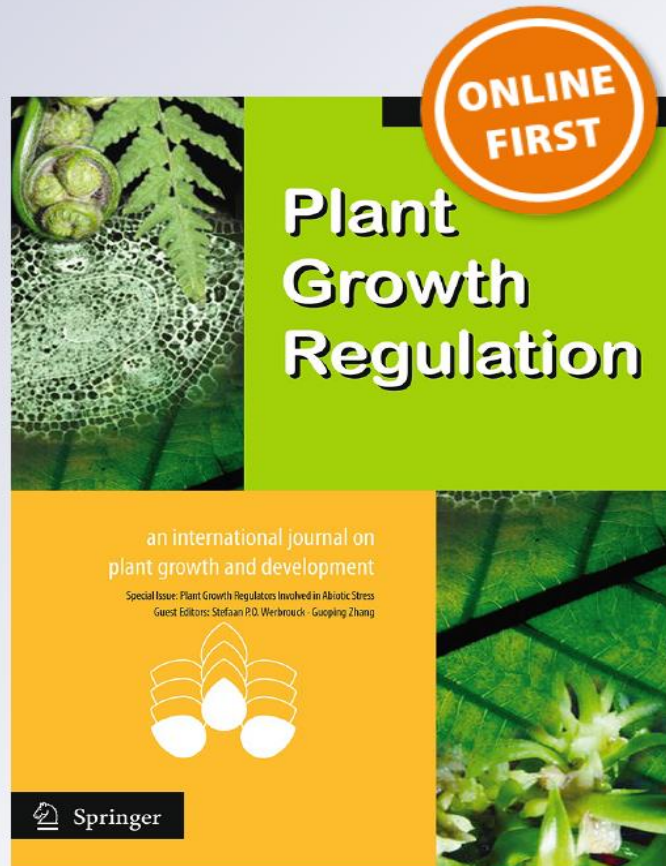
Optimization of direct shoot regeneration using cotyledonary explants and true leaves from lettuce cv. Romaine (Lactuca sativa L.) by surface response methodology

Elías Octavio Gómez-Montes, Carmen Oliver-Salvador, Noé Durán-Figueroa, Jesús Agustín Badillo-Corona & Carlos Edmundo Salas

Plant Growth Regulation
An International Journal on Plant
Growth and Development

ISSN 0167-6903

Plant Growth Regul
DOI 10.1007/s10725-015-0067-5



 Springer

Optimization of direct shoot regeneration using cotyledonary explants and true leaves from lettuce cv. Romaine (*Lactuca sativa* L.) by surface response methodology

Elías Octavio Gómez-Montes¹ · Carmen Oliver-Salvador¹ · Noé Durán-Figueroa¹ · Jesús Agustín Badillo-Corona¹ · Carlos Edmundo Salas²

Received: 12 December 2014 / Accepted: 1 April 2015
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2015

Abstract Lettuce (*Lactuca sativa* L.) is a commercially important crop and useful platform where different heterologous therapeutic proteins have been expressed. During genetic transformation, sometimes the limiting step is the lack of an efficient and reproducible regeneration protocol. Response surface methodology was successfully applied to find the combination of plant growth regulators inducing the largest number of shoots from cotyledonary explants and true leaves. Two independent variables were studied: concentration of α -naphthaleneacetic acid (NAA) and 6-benzyladenine (BA). A central composite design response surface methodology was developed to generate a quadratic model fitting the experimental data. The best combination of NAA (0.1 mg L⁻¹, 0.54 μ M) and BA (0.4 mg L⁻¹, 1.78 μ M) averaged 37.4 shoots per explant when using cotyledonary explants and 35.4 shoots when regenerating from true leaves. The surface response method predicted the following optimal concentration of growth regulators: NAA (0.09 mg L⁻¹) which is identical in both explant types, while BA is 0.37 mg L⁻¹ (1.64 μ M) for cotyledonary explants and 0.35 mg L⁻¹ (1.55 μ M) for true leaves. The desirability value for cotyledonary

explants is 0.66 and for true leaves is 0.71. The concentration of growth regulators suggested by the model are comparable to the optima experimentally obtained. Thus, the data from the central composite design response surface methodology model appropriately defines the optimal conditions for regeneration of lettuce in vitro. These findings open the possibility for using response surface methodology to optimize plant regeneration via growth regulators in different lettuce cultivars, as well as in other crops.

Keywords Adventitious bud development · 6-benzylaminopurine · In vitro plant regeneration · Central composite design · Growth regulators

Introduction

Lettuce (*Lactuca sativa* L.) is a commercially important edible leafy crop and dietary source of vitamins C, E, K (Nicolle et al. 2004), as well as, suitable candidate for production and delivery of therapeutic proteins. In addition, lettuce is harvested within few months from sowing and can be grown as an indoor hydroculture system suitable for production of genetically modified crops (Ichikawa et al. 2010; Kanamoto et al. 2006; Lim et al. 2011a). The success of genetic manipulation relies on an efficient plant regeneration protocol able to yield large number of transformed shoots. The selected explants must have regenerative capacity to undergo morphogenesis to become a transgenic or a transplastomic plant.

Initially, Doerschug and Miller (1967) described a plant regeneration protocol employing lettuce cotyledon explants on media containing 5 mg L⁻¹ indole acetic acid (IAA) and 0.5 mg L⁻¹ kinetin (KIN). Later, Michelmore et al.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10725-015-0067-5) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Carmen Oliver-Salvador
moliver@ipn.mx

¹ Laboratorio de Biotecnología Molecular, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional (UPIBI-IPN), Av. Acueducto s/n, Colonia La Laguna Ticomán, 07340 Mexico, D.F., Mexico

² Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil

10. REFERENCIAS

- Ampomah-Dwamena C, Conner AJ, Fautrier AG (1997) Genotypic response of lettuce cotyledons to regeneration in vitro *Scientia Horticulturae* 71:137-145
doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4238\(97\)00098-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4238(97)00098-8)
- Binley JM, Klasse PJ, Cao Y, Jones I, Markowitz M, Ho DD, Moore JP (1997) Differential regulation of the antibody responses to Gag and Env proteins of human immunodeficiency virus type 1 *Journal of Virology* 71:2799-2809
- Birch-Machin I, Newell CA, Hibberd JM, Gray JC (2004) Accumulation of rotavirus VP6 protein in chloroplasts of transplastomic tobacco is limited by protein stability *Plant Biotechnology Journal* 2:261-270 doi:10.1111/j.1467-7652.2004.00072.x
- Bock R, Khan MS (2004) Taming plastids for a green future *Trends in Biotechnology* 22:311-318 doi:10.1016/j.tibtech.2004.03.005
- Boynton J et al. (1988) Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles *Science* 240:1534-1538
doi:10.1126/science.2897716
- Cosa BD, Moar W, Lee S-B, Miller M, Daniell H (2001) Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals *Nat Biotech* 19:71-74
- Cui L, Chen Y, Shen G, Zhao L, Tang K (2011) Expression of Bioactive Thymosin Alpha 1 (T α 1) in Marker-free Transgenic Lettuce (*Lactuca sativa*) *Plant Mol Biol Rep* 29:466-472 doi:10.1007/s11105-010-0246-5
- Curtis IS, He C, Power JB, Mariotti D, de Laat A, Davey MR (1996a) The effects of *Agrobacterium rhizogenes* rolAB genes in lettuce *Plant Science* 115:123-135
doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0168-9452\(96\)04359-2](http://dx.doi.org/10.1016/0168-9452(96)04359-2)

- Curtis IS, He C, Scott R, Brian Power J, Davey MR (1996b) Genomic male sterility in lettuce, a baseline for the production of F1 hybrids *Plant Science* 113:113-119 doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0168-9452\(95\)04278-4](http://dx.doi.org/10.1016/0168-9452(95)04278-4)
- Curtis IS, Power JB, Blackhall NW, de Laat AMM, Davey MR (1994) Genotype-independent transformation of lettuce using *Agrobacterium tumefaciens* *Journal of Experimental Botany* 45:1441-1449 doi:10.1093/jxb/45.10.1441
- Curtis IS, Power JB, de Laat AMM, Caboche M, Davey MR (1999) Expression of a chimeric nitrate reductase gene in transgenic lettuce reduces nitrate in leaves *Plant Cell Reports* 18:889-896 doi:10.1007/s002990050680
- Daniell H, McFadden BA (1987) Uptake and expression of bacterial and cyanobacterial genes by isolated cucumber etioplasts *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84:6349-6353
- Daniell H, Singh ND, Mason H, Streatfield SJ (2009) Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals *Trends in Plant Science* 14:669-679 doi:10.1016/j.tplants.2009.09.009
- Davoodi-Semiromi A et al. (2010) Chloroplast-derived vaccine antigens confer dual immunity against cholera and malaria by oral or injectable delivery *Plant Biotechnology Journal* 8:223-242 doi:10.1111/j.1467-7652.2009.00479.x
- Deng X, Chang J, He J, He G (2005) Transformation of lettuce with FMDV epitopes fused gene mediated by *Agrobacterium* *Wuhan botanical research* 24:476-479
- Dinant S et al. (1997) Coat protein gene-mediated protection in *Lactuca sativa* against lettuce mosaic potyvirus strains *Molecular Breeding* 3:75-86 doi:10.1023/a:1009671925550
- Doerschug MR, Miller CO (1967) Chemical control of adventitious organ formation in *Lactuca sativa* explants *American Journal of Botany*:410-413

- Dufourmantel N, Pelissier B, Garcon F, Peltier G, Ferullo J-M, Tissot G (2004) Generation of fertile transplastomic soybean *Plant Mol Biol* 55:479-489 doi:10.1007/s11103-004-0192-4
- Dufresne P, Jenni S, Fortin M (2004) FRET hybridization probes for the rapid detection of disease resistance alleles in plants: detection of corky root resistance in lettuce *Molecular Breeding* 13:323-332 doi:10.1023/b:molb.0000034083.24201.90
- EEB/HIV Lab Site YU (1998a) The HIV Genome. <http://www.yale.edu/bio243/HIV/genome.html>. Accessed December 9th 2013
- EEB/HIV Lab Site YU (1998b) The Molecular Structure of HIV. <http://www.yale.edu/bio243/HIV/hivstructure.html>. Accessed December 9th 2013
- Enomoto S, Itoh H, Ohshima M, Ohashi Y (1990) Induced expression of a chimeric gene construct in transgenic lettuce plants using tobacco pathogenesis-related protein gene promoter region *Plant Cell Reports* 9:6-9 doi:10.1007/bf00232124
- Garibaldi A, Gilardi G, Gullino ML (2004) Varietal resistance of lettuce to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* *Crop Protection* 23:845-851 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2004.01.005>
- Giannino D et al. (2008) The overexpression of asparagine synthetase A from *E. coli* affects the nitrogen status in leaves of lettuce (*Lactuca sativa* L.) and enhances vegetative growth *Euphytica* 162:11-22 doi:10.1007/s10681-007-9506-3
- Giddings G (2001) Transgenic plants as protein factories *Current Opinion in Biotechnology* 12:450-454 doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00244-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00244-5)

- Golds T, Maliga P, Koop H-U (1993) Stable Plastid Transformation in PEG-treated Protoplasts of *Nicotiana tabacum* *Nat Biotech* 11:95-97
- Goto F, Yoshihara T, Saiki H (2000) Iron accumulation and enhanced growth in transgenic lettuce plants expressing the iron-binding protein ferritin *Theor Appl Genet* 100:658-664 doi:10.1007/s001220051336
- Govea-Alonso D et al. (2013) Production of an antigenic C4(V3)6 multiepitopic HIV protein in bacterial and plant systems *Plant Cell Tiss Organ Cult* 113:73-79 doi:10.1007/s11240-012-0252-4
- Grube R, Ryder E (2004) Identification of lettuce (*Lactuca sativa* L.) germplasm with genetic resistance to drop caused by *Sclerotinia minor* *Journal of the American Society for Horticultural Science* 129:70-76
- Grube R, Wintermantel W, Hand P, Aburomia R, Pink DC, Ryder E (2005) Genetic analysis and mapping of resistance to lettuce dieback: a soilborne disease caused by tombusviruses *Theor Appl Genet* 110:259-268 doi:10.1007/s00122-004-1825-3
- Grube RC, Ryder EJ (2003) Romaine lettuce breeding lines with resistance to lettuce dieback caused by tombusviruses *Horticultural Science* 38:627-628
- Hee Kim J, Botella JR (2004) Etr1-1 Gene Expression Alters Regeneration Patterns in Transgenic Lettuce Stimulating Root Formation *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 78:69-73 doi:10.1023/B:TICU.0000020396.64257.c1
- Hokey D, Weiner D (2006) DNA vaccines for HIV: challenges and opportunities *Springer Semin Immun* 28:267-279 doi:10.1007/s00281-006-0046-z
- Hunter DC, Burritt DJ (2002) Improved adventitious shoot production from cotyledon explants of lettuce (*Lactuca sativa* L.) *Scientia Horticulturae* 95:269-276 doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4238\(02\)00044-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4238(02)00044-4)

- Huy N-X, Kim Y-S, Jun S-C, Jin Z, Park S-M, Yang M-S, Kim T-G (2009) Production of a heat-labile enterotoxin B subunit-porcine epidemic diarrhea virus-neutralizing epitope fusion protein in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*) *Biotechnol Bioproc E* 14:731-737 doi:10.1007/s12257-009-3012-5
- Huy N-X, Yang M-S, Kim T-G (2011) Expression of a Cholera Toxin B Subunit-Neutralizing Epitope of the Porcine Epidemic Diarrhea Virus Fusion Gene in Transgenic Lettuce (*Lactuca sativa* L.) *Mol Biotechnol* 48:201-209 doi:10.1007/s12033-010-9359-1
- Ichikawa Y, Tamoi M, Sakuyama H, Maruta T, Ashida H, Yokota A, Shigeoka S (2010) Generation of transplastomic lettuce with enhanced growth and high yield GM crops 1:322-326 doi:10.4161/gmcr.1.5.14706
- Jeuken M, Lindhout P (2002) *Lactuca saligna*, a non-host for lettuce downy mildew (*Bremia lactucae*), harbors a new race-specific Dm gene and three QTLs for resistance *Theor Appl Genet* 105:384-391 doi:10.1007/s00122-002-0943-z
- Kanagaraj AP, Verma D, Daniell H (2011) Expression of dengue-3 premembrane and envelope polyprotein in lettuce chloroplasts *Plant Mol Biol* 76:323-333 doi:10.1007/s11103-011-9766-0
- Kanamoto H et al. (2006) Efficient and Stable Transformation of *Lactuca sativa* L. cv. Cisco (lettuce) *Plastids Transgenic Res* 15:205-217 doi:10.1007/s11248-005-3997-2
- Kapusta J et al. (1999) A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus *The FASEB journal* 13:1796-1799
- Kawazu Y, Fujiyama R, Noguchi Y (2009) Transgenic resistance to Mirafiori lettuce virus in lettuce carrying inverted repeats of the viral coat protein gene *Transgenic Res* 18:113-120 doi:10.1007/s11248-008-9200-9

- Kawazu Y, Fujiyama R, Noguchi Y, Kubota M, Ito H, Fukuoka H (2010) Detailed characterization of Mirafiori lettuce virus-resistant transgenic lettuce
Transgenic Res 19:211-220 doi:10.1007/s11248-009-9300-1
- Kim T-G et al. (2007) Synthesis and assembly of Escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunit in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*) Protein Expression and Purification 51:22-27
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2006.05.024>
- Kim Y-S, Kim B-G, Kim T-G, Kang T-J, Yang M-S (2006) Expression of a cholera toxin B subunit in transgenic lettuce (*Lactuca sativa* L.) using Agrobacterium-mediated transformation system Plant Cell, Tissue and Organ Culture 87:203-210 doi:10.1007/s11240-006-9156-5
- Kirchhoff F, Schindler M, Specht A, Arhel N, Münch J (2008) Role of Nef in primate lentiviral immunopathogenesis Cell Mol Life Sci 65:2621-2636
doi:10.1007/s00018-008-8094-2
- Lakshmi PS, Verma D, Yang X, Lloyd B, Daniell H (2013) Low Cost Tuberculosis Vaccine Antigens in Capsules: Expression in Chloroplasts, Bio-Encapsulation, Stability and Functional Evaluation In Vitro PLoS ONE 8:e54708 doi:10.1371/journal.pone.0054708
- Lebeda A, Petrželová I (2004) Variation and distribution of virulence phenotypes of *Bremia lactucae* in natural populations of *Lactuca serriola* Plant Pathology 53:316-324 doi:10.1111/j.0032-0862.2004.01003.x
- Legocki AB, Miedzinska K, Czaplińska M, Płucieniczak A, Wędrychowicz H (2005) Immunoprotective properties of transgenic plants expressing E2 glycoprotein from CSFV and cysteine protease from *Fasciola hepatica* Vaccine 23:1844-1846 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.11.015>
- Lelivelt CC et al. (2005) Stable Plastid Transformation in Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Plant Mol Biol 58:763-774 doi:10.1007/s11103-005-7704-8

- Li J, Chen M, Liu X-W, Zhang H-C, Shen FF, Wang GP (2007) Transient expression of an active human interferon-beta in lettuce *Scientia Horticulturae* 112:258-265 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2006.12.047>
- Li MZ, Elledge SJ (2012) SLIC: A Method for Sequence- and Ligation-Independent Cloning. In: Peccoud J (ed) *Gene Synthesis*, vol 852. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, pp 51-59. doi:10.1007/978-1-61779-564-0_5
- Li Y, Wang G, Hou R, Zhou Y, Gong R, Sun X, Tang K (2011) Engineering tocopherol biosynthetic pathway in lettuce *Biol Plant* 55:453-460 doi:10.1007/s10535-011-0110-y
- Lim S et al. (2011a) Production of biologically active human thioredoxin 1 protein in lettuce chloroplasts *Plant Mol Biol* 76:335-344 doi:10.1007/s11103-011-9745-5
- Lim W, Park J, Park S (2011b) Re-evaluation of the effects of growth regulators on callus induction and shoot regeneration in *Agrobacterium*-mediated transformation of lettuce *Acta Physiol Plant* 33:1631-1637 doi:10.1007/s11738-010-0699-z
- Liu C-W, Chen JJW, Kang C-C, Wu C-H, Yiu J-C (2012) Transgenic lettuce (*Lactuca sativa* L.) expressing H1N1 influenza surface antigen (neuraminidase) *Scientia Horticulturae* 139:8-13 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2012.02.037>
- Luan JJ, Chen M, Li ZF, Wang PG (2009) EspA expressed in lettuce stimulated high immunisation and had a protective effect on HeLa cells *Food and Agricultural Immunology* 20:207-219 doi:10.1080/09540100903029524
- Lutz KA, Azhagiri AK, Tungsuchat-Huang T, Maliga P (2007) A Guide to Choosing Vectors for Transformation of the Plastid Genome of Higher Plants *Plant Physiology* 145:1201-1210 doi:10.1104/pp.107.106963

- Maldaner F et al. (2013) Dengue virus tetra-epitope peptide expressed in lettuce chloroplasts for potential use in dengue diagnosis *Appl Microbiol Biotechnol* 97:5721-5729 doi:10.1007/s00253-013-4918-6
- Maliga P (2003) Progress towards commercialization of plastid transformation technology *Trends in Biotechnology* 21:20-28 doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799\(02\)00007-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799(02)00007-0)
- Maliga P, Svab Z (2011) Engineering the Plastid Genome of *Nicotiana sylvestris*, a Diploid Model Species for Plastid Genetics. In: Birchler JA (ed) *Plant Chromosome Engineering*, vol 701. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, pp 37-50. doi:10.1007/978-1-61737-957-4_2
- Marcondes J, Hansen E (2008) Transgenic lettuce seedlings carrying hepatitis B virus antigen HBsAg *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 12:469-471
- Martínez-González L et al. (2011) Oral immunization with a lettuce-derived *Escherichia coli* heat-labile toxin B subunit induces neutralizing antibodies in mice *Plant Cell Tiss Organ Cult* 107:441-449 doi:10.1007/s11240-011-9994-7
- Matsui T, Asao H, Ki M, Sawada K, Kato K (2009) Transgenic Lettuce Producing a Candidate Protein for Vaccine against Edema Disease *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 73:1628-1634 doi:10.1271/bbb.90129
- Matsui T et al. (2011) Production of double repeated B subunit of Shiga toxin 2e at high levels in transgenic lettuce plants as vaccine material for porcine edema disease *Transgenic Res* 20:735-748 doi:10.1007/s11248-010-9455-9
- Matvieieva NA, Vasylenko MY, Shakhovskiy AM, Kuchuk NV (2009) Agrobacterium-mediated transformation of lettuce (*Lactuca sativa* L.) with genes coding bacterial antigens from *Mycobacterium tuberculosis* *Cytol Genet* 43:94-98 doi:10.3103/s0095452709020042

- McCabe M, Mohapatra U, Debnath S, Brian Power J, Davey M (1999a) Integration, expression and inheritance of two linked T-DNA marker genes in transgenic lettuce *Molecular Breeding* 5:329-344 doi:10.1023/a:1009681615365
- McCabe MS et al. (2008) Plastid transformation of high-biomass tobacco variety Maryland Mammoth for production of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) p24 antigen *Plant Biotechnology Journal* 6:914-929 doi:10.1111/j.1467-7652.2008.00365.x
- McCabe MS, Schepers F, van der Arend A, Mohapatra U, de Laat AMM, Power JB, Davey MR (1999b) Increased stable inheritance of herbicide resistance in transgenic lettuce carrying a petE promoter-bar gene compared with a CaMV 35S-bar gene *Theor Appl Genet* 99:587-592 doi:10.1007/s001220051272
- Michelmore R, Marsh E, Seely S, Landry B (1987) Transformation of lettuce (*Lactuca sativa*) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* *Plant Cell Reports* 6:439-442 doi:10.1007/bf00272777
- Mohapatra U, McCabe M, Power JB, Schepers F, Van Der Arend A, Davey M (1999) Expression of the Bar Gene Confers Herbicide Resistance in Transgenic Lettuce *Transgenic Res* 8:33-44 doi:10.1023/a:1008891216134
- Mohebodini M, Mokhtar JJ, Mahboudi F, Alizadeh H (2011) Effects of genotype, explant age and growth regulators on callus induction and direct shoot regeneration of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) *Australian Journal of Crop Science* 5:92-95
doi:<http://search.informit.com.au/documentSummary;dn=834851258372010;res=IELHSS>
- Mou B, Bull C (2004) Screening lettuce germplasm for new sources of resistance to corky root *Journal of the American Society for Horticultural Science* 129:712-716

- Negrout V, Eisner G, Lee H-i, Han K, Taylor D, Wong HC (2005) Highly efficient transient expression of functional recombinant antibodies in lettuce *Plant Science* 169:433-438 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.03.031>
- Newell C, Birch-Machin I, Hibberd J, Gray J (2003) Expression of Green Fluorescent Protein from Bacterial and Plastid Promoters in Tobacco Chloroplasts *Transgenic Res* 12:631-634 doi:10.1023/a:1025812309254
- Novitsky V et al. (2003) Association between Virus-Specific T-Cell Responses and Plasma Viral Load in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype C Infection *Journal of Virology* 77:882-890 doi:10.1128/jvi.77.2.882-890.2003
- Nugent GD, Coyne S, Nguyen TT, Kavanagh TA, Dix PJ (2006) Nuclear and plastid transformation of *Brassica oleracea* var. botrytis (cauliflower) using PEG-mediated uptake of DNA into protoplasts *Plant Science* 170:135-142 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.08.020>
- Obregon P, Chargelegue D, Drake PMW, Prada A, Nuttall J, Frigerio L, Ma JKC (2006) HIV-1 p24-immunoglobulin fusion molecule: a new strategy for plant-based protein production *Plant Biotechnology Journal* 4:195-207 doi:10.1111/j.1467-7652.2005.00171.x
- Okumura S, Sawada M, Park Y, Hayashi T, Shimamura M, Takase H, Tomizawa K-I (2006) Transformation of poplar (*Populus alba*) plastids and expression of foreign proteins in tree chloroplasts *Transgenic Res* 15:637-646 doi:10.1007/s11248-006-9009-3
- ONUSIDA (2014) La epidemia mundial de sida - datos clave mundiales. http://www.unaids.org/es/resources/documents/2014/20140716_FactSheet_es.pdf. Accessed June 6th 2015
- Pang S-Z, Ja F-J, CRNAey K, Stout J, Tricoli DM, Quemada HD, Gonsalves D (1996) Post-transcriptional transgene silencing and consequent tospovirus resistance in transgenic lettuce are affected by transgene dosage and plant

development *The Plant Journal* 9:899-909 doi:10.1046/j.1365-313X.1996.9060899.x

Park B-J, Liu Z, Kanno A, Kameya T (2005) Increased tolerance to salt- and water-deficit stress in transgenic lettuce (*Lactuca sativa* L.) by constitutive expression of LEA *Plant Growth Regul* 45:165-171 doi:10.1007/s10725-004-7924-y

Park J-S, Kim J-B, Cho K-J, Cheon C-I, Sung M-K, Choung M-G, Roh K-H (2008) *Arabidopsis* R2R3-MYB transcription factor AtMYB60 functions as a transcriptional repressor of anthocyanin biosynthesis in lettuce (*Lactuca sativa*) *Plant Cell Reports* 27:985-994 doi:10.1007/s00299-008-0521-1

Park S, Elless MP, Park J, Jenkins A, Lim W, Chambers Iv E, Hirschi KD (2009) Sensory analysis of calcium-biofortified lettuce *Plant Biotechnology Journal* 7:106-117 doi:10.1111/j.1467-7652.2008.00379.x

Penney C, Thomas D, Deen S, Walmsley A (2011) Plant-made vaccines in support of the Millennium Development Goals *Plant Cell Reports* 30:789-798 doi:10.1007/s00299-010-0995-5

Pniewski T et al. (2011) Low-dose oral immunization with lyophilized tissue of herbicide-resistant lettuce expressing hepatitis B surface antigen for prototype plant-derived vaccine tablet formulation *Journal of Applied Genetics* 52:125-136 doi:10.1007/s13353-010-0001-5

Pope B, Kent HM (1996) High efficiency 5 min transformation of *Escherichia coli* *Nucleic Acids Research* 24:536-537

Rosales-Mendoza S, Soria-Guerra R, Moreno-Fierros L, Alpuche-Solís Á, Martínez-González L, Korban S (2010) Expression of an immunogenic F1-V fusion protein in lettuce as a plant-based vaccine against plague *Planta* 232:409-416 doi:10.1007/s00425-010-1176-z

- Ruf S, Hermann M, Berger IJ, Carrer H, Bock R (2001) Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit *Nature biotechnology* 19:870-875 doi:10.1038/nbt0901-870
- Ruhlman T, Ahangari R, Devine A, Samsam M, Daniell H (2007) Expression of cholera toxin B–proinsulin fusion protein in lettuce and tobacco chloroplasts – oral administration protects against development of insulinitis in non-obese diabetic mice *Plant Biotechnology Journal* 5:495-510 doi:10.1111/j.1467-7652.2007.00259.x
- Russell JA, Roy MK, Sanford JC (1992) Physical Trauma and Tungsten Toxicity Reduce the Efficiency of Biolistic Transformation *Plant Physiology* 98:1050-1056
- Ryder EJ (2002) A mild systemic reaction to lettuce mosaic virus in lettuce: Inheritance and interaction with an allele for resistance *Journal of the American Society for Horticultural Science* 127:814-818
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. vol v. 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press,
- Sanford JC, Smith FD, Russell JA (1993) Optimizing the biolistic process for different biological applications. In: Ray W (ed) *Methods in Enzymology*, vol Volume 217. Academic Press, pp 483-509. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879\(93\)17086-K](http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879(93)17086-K)
- SAS-Institute (2009) *Statistical Analysis System Version 9.0*, 9.0 edn.,
- Sharifi Tabar M, Habashi AA, Rajabi Memari H (2013) Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor (hG-CSF) Expression in Plastids of *Lactuca sativa* Iranian *Biomedical Journal* 17:158-164 doi:10.6091/ibj.1180.2013
- Shih SMH, Doran PM (2009) Foreign protein production using plant cell and organ cultures: Advantages and limitations *Biotechnology Advances* 27:1036-1042 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.05.009>

- Sidorov VA, Kasten D, Pang S-Z, Hajdukiewicz PTJ, Staub JM, Nehra Narender S (1999) Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker *The Plant Journal* 19:209-216 doi:10.1046/j.1365-313X.1999.00508.x
- Sijmons PC, Dekker BMM, Schrammeijer B, Verwoerd TC, van den Elzen PJM, Hoekema A (1990) Production of Correctly Processed Human Serum Albumin in Transgenic Plants *Nat Biotech* 8:217-221
- Singh ND, Daniell H (2010) Chapter 18 Chloroplast Genetic Engineering: A Novel Technology for Agricultural Biotechnology and Bio-pharmaceutical Industry. In: Rebeiz C et al. (eds) *The Chloroplast*, vol 31. *Advances in Photosynthesis and Respiration*. Springer Netherlands, pp 263-284. doi:10.1007/978-90-481-8531-3_18
- Singh ND, Ding Y, Daniell H (2009) Chloroplast-Derived Vaccine Antigens and Biopharmaceuticals: Protocols for Expression, Purification, or Oral Delivery and Functional Evaluation. In: Faye L, Gomord V (eds) *Recombinant Proteins From Plants*, vol 483. *Methods in Molecular Biology™*. Humana Press, pp 163-192. doi:10.1007/978-1-59745-407-0_10
- Sivakumar T, Manavalan R, Valliappan K (2007) Global optimization using Derringer's desirability function: enantioselective determination of ketoprofen in formulations and in biological matrices *Acta Chromatographica* 19:29-47
- Sohi HH, Jourabchi E, Khodabandeh M (2005) Transient expression of human growth hormone in potato (*Solanum tuberosum*), tobacco (*Nicotiana tabacum*) and lettuce (*Lactuca sativa*) leaves by agroinfiltration *Iranian Journal of Biotechnology (IJB)* 3
- Song L, Zhao D-g, Wu Y-j, Li Y (2008) Transient expression of chicken alpha interferon gene in lettuce *Journal of Zhejiang University Science B* 9:351-355 doi:10.1631/jzus.B0710596

- Southgate E, Davey M, Power J, Marchant R (1995) Factors affecting the genetic engineering of plants by microprojectile bombardment *Biotechnology Advances* 13:631-651 doi:10.1016/0734-9750(95)02008-X
- Stat-Ease (2005) *Design Expert* 7. Stat-Ease, Inc. <http://legacy.statease.com/dx7descr.html>. Accessed 17 april 2013
- Staub JM, Maliga P (1992) Long regions of homologous DNA are incorporated into the tobacco plastid genome by transformation *The Plant Cell* 4:39-45 doi:10.1105/tpc.4.1.39
- Staub JM, Maliga P (1995) Expression of a chimeric uidA gene indicates that polycistronic mRNAs are efficiently translated in tobacco plastids *The Plant Journal* 7:845-848 doi:10.1046/j.1365-313X.1995.07050845.x
- Sugiura M (1992) The chloroplast genome *Plant Mol Biol* 19:149-168 doi:10.1007/bf00015612
- Sun H-J, Cui M-I, Ma B, Ezura H (2005) Functional expression of the taste-modifying protein, miraculin, in transgenic lettuce *FEBS Letters* 580:620-626 doi:10.1016/j.febslet.2005.12.080
- Svab Z, Hajdukiewicz P, Maliga P (1990) Stable transformation of plastids in higher plants *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87:8526-8530 doi:10.1073/pnas.87.21.8526
- Svab Z, Maliga P (1993) High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric aadA gene *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90:913-917 doi:10.1073/pnas.90.3.913
- Takada K, Watanabe S, Sano T, Ma B, Kamada H, Ezura H (2007) Heterologous expression of the mutated melon ethylene receptor gene Cm-ERS1/H70A produces stable sterility in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*) *Journal of Plant Physiology* 164:514-520 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2006.10.003>

- Team RC (2014) The R project for statistical computing vol 9.
- Teli N, Timko M (2004) Recent developments in the use of transgenic plants for the production of human therapeutics and biopharmaceuticals *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 79:125-145 doi:10.1007/s11240-004-0653-0
- Timme RE, Kuehl JV, Boore JL, Jansen RK (2007) A comparative analysis of the *Lactuca* and *Helianthus* (Asteraceae) plastid genomes: identification of divergent regions and categorization of shared repeats *American Journal of Botany* 94:302-312
- Tiwari S, Verma PC, Singh PK, Tuli R (2009) Plants as bioreactors for the production of vaccine antigens *Biotechnology Advances* 27:449-467 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.03.006>
- Torres AC, Cantliffe DJ, Laughner B, Bienick M, Nagata R, Ashraf M, Ferl RJ (1993) Stable transformation of lettuce cultivar South Bay from cotyledon explants *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 34:279-285 doi:10.1007/bf00029717
- Tsuchiya N, Yoshida K, Usui T, Tsukada M (2004) 'Shinano Hope', a fusarium root rot-Resistant lettuce *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 73:429-434
- Valimareanu S (2010) Leaf disk transformation of *Lactuca sativa* using *Agrobacterium tumefaciens* *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 38:181-186
- Vanjildorj E, Bae T-W, Riu K-Z, Kim S-Y, Lee H-Y (2005) Overexpression of *Arabidopsis* ABF3 gene enhances tolerance to drought and cold in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 83:41-50 doi:10.1007/s11240-005-3800-3
- Verma D, Daniell H (2007) Chloroplast Vector Systems for Biotechnology Applications *Plant Physiology* 145:1129-1143 doi:10.1104/pp.107.106690

- Wang H-H, Yin W-B, Hu Z-M (2009) Advances in chloroplast engineering Journal of Genetics and Genomics 36:387-398 doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S1673-8527\(08\)60128-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1673-8527(08)60128-9)
- Webster DE, Smith SD, Pickering RJ, Strugnell RA, Dry IB, Wesselingh SL (2006) Measles virus hemagglutinin protein expressed in transgenic lettuce induces neutralising antibodies in mice following mucosal vaccination Vaccine 24:3538-3544 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.02.002>
- WHO WHO (2013) Number of people (all ages) living with HIV. Estimates by WHO region. <http://apps.who.int/gho/data/view.main.22100WHO?lang=en>. Accessed June 6th 2015
- Xu Z-F, Teng W-L, Chye M-L (2004) Inhibition of endogenous trypsin- and chymotrypsin-like activities in transgenic lettuce expressing heterogeneous proteinase inhibitor SaPIN2a Planta 218:623-629 doi:10.1007/s00425-003-1138-9
- Yuki Y, Kiyono H (2003) New generation of mucosal adjuvants for the induction of protective immunity Reviews in Medical Virology 13:293-310 doi:10.1002/rmv.398
- Zhang L-Y, Zhang Y-Y, Chen R-G, Zhang J-H, Wang T-T, Li H-X, Ye Z-B (2010) Ectopic Expression of the Tomato Mi-1 Gene Confers Resistance to Root Knot Nematodes in Lettuce (*Lactuca sativa*) Plant Mol Biol Rep 28:204-211 doi:10.1007/s11105-009-0143-y
- Zhou F et al. (2008) High-level expression of human immunodeficiency virus antigens from the tobacco and tomato plastid genomes Plant Biotechnology Journal 6:897-913 doi:10.1111/j.1467-7652.2008.00356.x

11. ANEXOS

11.1. Análisis de varianza de los modelos de superficie de respuesta

Cuadro 13. Análisis de varianza (ANOVA) del efecto de los factores **A** y **B** sobre el modelo de superficie de respuesta (brotes por explante) a partir de explantes cotiledonales de *L. sativa* c.v. Romana

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor de <i>F</i>	Valor de <i>p</i>
Modelo	220.26	5	44.05	1.02	0.4733
A	2.72	1	2.72	0.063	0.8092
B	11.22	1	11.22	0.26	0.6263
AB	0.90	1	0.90	0.021	0.8893
A²	21.40	1	21.40	0.49	0.5048
B²	154.46	1	154.46	3.57	0.1009
Residuo	303.07	7	43.30		
Falta de ajuste	168.78	3	56.26	1.68	0.3082
Error puro	134.29	4	33.57		
Total	523.33	12			

Análisis estadístico que permite el ajuste del modelo: Desviación estándar (**D.S.**): 6.58; Coeficiente de correlación (**R**): 0.6487; Coeficiente de determinación (**R²**): 0.4209; Coeficiente de variación (**C.V.**): 23.03%; **F**= prueba de distribución de Fisher; factores codificados **A**= NAA; **B**= BA

Cuadro 14. Análisis de varianza (ANOVA) del efecto de los factores **A** y **B** sobre el modelo de superficie de respuesta (brotes por explante) a partir de hojas verdaderas de *L. sativa* c.v. Romana

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor de <i>F</i>	Valor de <i>p</i>
Modelo	224.21	5	44.84	1.12	0.4288
A	0.40	1	0.40	0.010	0.9229
B	19.72	1	19.72	0.49	0.5053
AB	0.25	1	0.25	0.00625	0.9392
A²	2.61	1	2.61	0.065	0.8056
B²	158.13	1	158.13	3.95	0.0871
Residuo	280.04	7	40.01		
Falta de ajuste	170.75	3	56.92	2.08	0.2452
Error puro	109.29	4	27.32		
Total	504.25	12			

Análisis estadístico que permite el ajuste del modelo: Desviación estándar (**D.S.**): 6.33; Coeficiente de correlación (**R**): 0.6668; Coeficiente de determinación (**R²**): 0.4446; Coeficiente de variación (**C.V.**): 20.64%; **F**= prueba de distribución de Fisher; factores codificados **A**= NAA; **B**= BA

11.2. Secuencia del vector pEOGM

12. ctaaattgtaagcgtaataatattttgttaaatttcgcgtaaaattttgttaaatacagctcattttttaaccaataggc
cg
13. aaatcggcaaaatcccttataaatcaaaagaatagaccgagatagggttgagtgttgttccagtttgaacaagagt
ca
14. ctattaaagaacgtggactccaacgtcaaagggcgaaaaaccgtctatcagggcgatggccactacgtgaacctca
cc
15. ctaatcaagttttttggggtcgaggtgccgtaaagcactaaatcggaaccctaaagggagcccccgatntagagcttg
ac
16. ggggaaagccggcgaaactgtggcgagaaaggaagggagaaagcgaaaggagcgggctagggcgctggcaagtgtg
cg
17. gtcacgctgcgcgtaaccaccacaccgcccgcgttaatgcccgcctacagggcgctcccattcgccattcaggctg
cg
18. caactgttgggaagggcgatcgggtcgggcctcttcgctattacgccagctggcgaaaggggatgtgctgcaaggcg
at
19. taagttgggtaacgccagggttttccagtcacgacgttgtaaaacgacggccagtgagcgcgtaatacgcactcac
ta
20. tagggcgaattgggtaccgggccccctcgaggtcgacggatcgataagcttgatcgaaattcctgcagccctct
gg
21. aagattgcaatccctactgcgatgttaaactttccaaggtccgcctcacggcatccaagttgagagagataaat
tg
22. aacaagtatggctgctcccctgttgggatgtactattaaacctaaattggggttatccgctaaaaactacggtagagct
gt
23. ttatgaatgtcttcggtggccttgattttactaaagatgatgagaacgtgaactcccaaccatttatgcggttgag
ag
24. accgtttcttattttgtgccaagctattttaaatcacaagctgaaacaggtgaaatcaaagggcattacttgaatg
ct
25. actgcccgtacatgcaagaaatgatgaaaagggctatatttgccagagaattgggagttcctatcgtaatgcatgac
ta
26. ctaacaggggattcactgcaaatactagcttggtcattattgcccagataatggtctacttcttcacatccaccg
cg
27. caatgcatgcagttattgatagacagaagaatcatggtatacacttccgtgtactagctaaagcgttacgtatgtctg
gt
28. ggagatcatattcattccgggtaccgtagtaggtaaacctgaaggggaaagagaaatcactttgggctttgttgattta
ct
29. gcgtgatgattttattgaaaaagatagaagtgcgggtatttatctcaccgaagattgggtctctctaccaggtgttct
gc
30. ctgtagcttggggcggtattcacgtttggcatatgctgctctgaccgagatctttggagatgattccgtactacagt
tc
31. ggtggaggaactttaggccacccttggggaaatgcaccgggtgccgtagctaatcgagtagctctagaagcatgtgta
ca
32. ggctcgtaatgagggacgcgatcttgcactgagggtaaatgaaattatccgtgaggctaccaaatggagtcctgaa
ag
33. ctgctgcttgtgaagtatggaaggagattaaatttgagtttcaggcaatggatactttggatcaataactttcgttct
ct
34. taattgaatttcaattaaactcgcccaatcttttactaaaaggattgagccgaatccaacatgcatatattttgat
ag
35. atacatacttatatagatatagaaaaatttcaactaaaaactcgaagactaaacaactcaaatctttctatttttgtg
tg
36. gttggatccacaattaatcctatggatGGCGGAATTAATTACTAGCTAGGTATAACTTCGTATAATGTATGCTATAC
GA
37. AGTTATTAATTAATCGACAGATCCCGAATTGGGATCGGTACCCAAAGCTCCCCGCCGTCGTTCAATGAGAATGGATA
AG
38. AGGCTCGTGGGATTGACGTGAGGGGGCAGGGATGGCTATATTTCTGGGAGCGAACTCCGGGCGAATACGAAGCGCTTG
GA
39. TACAGTTGTAGGGAGGGATTTATGGCAGAAGCGGTGATCGCCGAAGTATCGACTCAACTATCAGAGGTAGTTGGCGTC
AT
40. CGAGCGCCATCTCGAACCGACGTTGCTGGCCGTACATTTGTACGGCTCCGCAGTGGATGGCGGCCCTGAAGCCACACAG
TG
41. ATATTGATTTGCTGGTTACGGTGACCGTAAGGCTTGATGAAACAACGGCGAGCTTTGATCAACGACCTTTTGGAAA
CT

42. TCGGCTTCCCCTGGAGAGAGCGAGATTCTCCGCGCTGTAGAAGTCACCATTGTTGTGCACGACGACATCATTCCGTGG
CG
43. TTATCCAGCTAAGCGCGAACTGCAATTTGGAGAATGGCAGCGCAATGACATTCTTGACAGGTATCTTCGAGCCAGCCAC
GA
44. TCGACATTGATCTGGCTATCTTGCTGACAAAAGCAAGAGAACATAGCGTTGCCTTGGTAGGTCCAGCGGGGAGGAAC
TC
45. TTTGATCCGGTTCTTGAACAGGATCTATTTGAGGGCTAAATGAAACCTTAACGCTATGGAACCTGCCGCCGACTGG
GC
46. TGGCGATGAGCGAAATGTAGTGCTTACGTTGTCCCGCATTGGGTACAGCGCAGTAACCGGCAAAATCGCGCCGAAGGA
TG
47. TCGCTGCCGACTGGGCAATGGAGCGCCTGCCGGCCAGTATCAGCCGTCATACTTGAAGCTAGACAGGCTTATCTTG
GA
48. CAAGAAGAAGATCGCTTGGCCTCGCGCGCAGATCAGTTGGAAGAATTTGTCCACTACGTGAAAGGCGAGATCACCAAG
GT
49. AGTCGGCAAATAATGTCTAGAGCGATCCTGGCCTAGTCTATAGGAGGTTTTGAAAAGAAAGGAGCAATAATCATTTTC
TT
50. GTTCTATCAAGAGGGTGCTATTGCTCCTTCTTTTTTCTTTTTTATTTACTAGTATTTACTTACATAGACTTT
TT
51. TGTTTTACATTATAGAAAAAGAAGGAGAGGTTATTTTCTTGCATTTATTCATGATTGAGTATTCTATTTTGATTTTGT
TT
52. TGTTTTAAATTTGTAGAAATAGAACTTGTCTCTTCTTGCTAATGTTACTATATCTTTTTTGATTTTTTTTTTCCAAAA
AA
53. AAAATCAAATTTTACTTCTTCTTATCTCTTATCTTTGAATATCTCTTATCTTTGAAATAATAATATCATTGAAATAA
GA
54. AAGAAGAGCTATATTCGACCTATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATTGAATTCTAGTTAGTACCGGGCC
CC
55. TGAATTCTAGTTAGTACCGGGCCCAAGCTTGCGGCCGCGAGCTCGTGCACattgggatattattttagatcctgtat
tt
56. tccctggatcgagacaggtatcacaactctttccaccatcctgtatattgtccttttggttccgtattgtaatagaa
ac
57. ttaactgattattagttattagacgagattttacgaaaaattggtcgtaggagagaacaaatcctttttcaatact
ta
58. cactccttattatattagtttaataatcctagtgtattgtattgatatgcttattctgataggaaataagatattcaaat
aa
59. attaaatgatttttctgcgaatgactattcatctattgtattttcatgcaaatatggagcaagaaaactctatgaaaa
ga
60. tgggtggttcaattcgaatgatttttaagaaggagttcgaacacagatgtaggctaagtaaatcaatgggcagtcttgg
cc
61. tattgaaaatgccagtgaaagtaagatccgaatagaaatgatacggataaaaacattcaggggttgggtggtcatga
ca
62. attacagtaatggtgatctttttttggcgtcaaggacattcggaaatttttctctgatgatacttttttagtgaag
at
63. agtaatggggacagttattctatataatggatattgaaaatcatattttgagattgccaatgatcatcctttttgt
ag
64. tgaactagaaagttctttttatcggaattctagtgatctgaataatggatctaagagtaagaatcccgaccacgatcg
tt
65. acatggatgatactcagtatacttggaaataatcacattaatagttgcattgacagttatcttcagtaccaaactctgta
tt
66. gataattacattgtaagtggtaatgacaattccagtaacaataattccagtaacgagaattccagtaacgagaattcc
ag
67. taacgagaattccagtaacgagaattccagtaacgattacatttctagttccatttctagtcaaagtgaaaatagtag
tc
68. aaaacgaggatatacacaacgagtgatcaactataaccagaaagttctactcatatgggtgtaactcaacaataccggc
at
69. ttgtgggttcaatgcaaaaattggtatggattaaattataagaaattttttaaatcaaagatgcatctttgtgaacaa
tg
70. tggatatcatttgaaaatgagtagttcagatagaatcgaacttttgatcgatccgggcacttgggagcctatggatga
ag
71. acatggtctctctggatcccattgaatttcattcggaggaggccttataaaaatcgatcgattcttatcaagaa
at
72. acaggggggatccactagttctagagcggccgccaccgggtggagctccagcttttggttcccttagtgagggtta
at

73. tgcgcgcttggcgtaatcatgggtcatagctgtttcctgtgtgaaattgttatccgctcacaattccacacaacatacag
ag
74. ccggaagcataaagtgtaaagcctggggcgctaatgagtgagctaactcacattaattgcggttgcgctcactgccccg
ct
75. ttccagtcgggaaacctgctgtgccagctgcattaatgaatcggccaacgcgcggggagaggcggtttgcgtattggg
cg
76. ctcttcgcttctcctcgctcactgactcgctgcgctcggtcgttcggctgcgggcgagcggtatcagctcactcaaaggc
gg
77. taatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaacc
gt
78. aaaaaggccgcttgcgtggcgtttttccataggctccgccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcaag
ag
79. gtggcgaaaccggacaggaactataaagataaccaggcgtttccccctggaagctccctcgctgctctcctgttccgac
cc
80. tgccgcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatc
tc
81. agttcgggtgtaggtcgttcgtccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgcttcagcccgaccgctgcgcttatcc
gg
82. taactatcgtcttgagtccaaccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcag
ag
83. cgaggtatgtagggcgtgctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggctacactagaaggacagtatttggt
tc
84. tgcgctctgctgaagccagttaccttcgaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaaacaaaccaccgctggtagc
gg
85. tggttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggg
gt
86. ctgacgctcagtggaacgaaaactcaggttaagggattttgggtcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatcc
tt
87. ttaaattaaaaatgaagttttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaaacttggctgacagttaccaatgcttaatc
ag
88. tgaggcacctatctcagcgatctgtctatcttgcgttccatagttgctgactccccgctgtagataactacgat
ac
89. gggaggccttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagaccacgctcaccggctccagatttatcagcaa
ta
90. aaccagccagccggaaggccgagcgcagaagtggtcctgcaactttatccgcctccatccagctctattaattggtgc
cg
91. ggaagctagagtaagtagttcgcagttaatagtttgcgcaacggttgttgccattgctacaggcatcgtgggtgcag
ct
92. cgtcgtttggtatggcttcattcagctccggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatggttgcaaaa
aa
93. gcggttagctccttcggtcctccgatcgttgtcagaagtaagttggccgagtggtatcactcatggttatggcagca
ct
94. gcataattctcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactggtgagtactcaaccaagtattctgaga
at
95. agtgtatgcggcgaccgagttgctcttgcccggcgtcaatacgggataataaccgcgccatagcagaactttaaaag
tg
96. ctcatcattggaaaacgttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctggtgagatccagttcagatgtaacc
ac
97. tcgtgcacccaactgatcttcagcatcttttactttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgc
cg
98. caaaaaagggaataaggcgacacggaatggtgaatactcatactcttcttttccatattattgaagcatttatc
ag
99. ggttattgtctcatgagcggatacatatgtgaatgtatgttagaaaaataaacaatagggggtccgcgcacatttccc
cg
100. aaaagtgccac

12.3 Secuencia del vector pEOGM-p24/nef

101. ctaaattgtaagcgtaataatTTTTgttaaattcgcgttaaattTTTTgttaaatacagctcattttttaaccaata
ggccg
102. aaatcgcaaaatcccttataaatcaaaagaatagaccgagataggggtgagtggttccagtttgaacaaga
gtcca
103. ctattaaagaacgtggactccaacgtcaaagggcgaaaaccgtctatcagggcgatggcccactacgtgaacca
tcacc
104. ctaatcaagtTTTTTggggtcgaggtgccgtaaagcactaaatcggaaccctaaagggagccccgatttagagc
ttgac
105. ggggaaagccggcgaaactggtgagaaaggaaggaagaaagcgaagggagcggcgctagggcgctggcaagt
tagcg
106. gtcacgctgcgcgtaaccaccaccccgcgcgcttaatgcgccgctacagggcgctccattcgccattcagg
ctgcg
107. caactgttgggaagggcgatcgggtcgggcctcttcgctattacgccagctggcgaagggggatgtgctgcaag
gcgat
108. taagtgggtaacgccagggTTTTccagtcacgacgttgtaaaacgacggccagtgagcgcgctaatacagct
cacta
109. tagggcgaattgggtaccggggccccccctcgaggtcgacgggtatcgatactagcttgatatacgaattcctgcagc
cctct
110. ggaagatttgcaatccctactgctgatgttaaaactttccaaggtccgctcacggcatccaagttgagagaga
taaat
111. tgaacaagtatggtcgtcccctgttgggatgtactattaaacctaaattggggttatccgctaaaaactacggta
gagct
112. gtttatgaatgtcttcgtggtggccttgatTTTactaaagatgatgagaacgtgaactoccaaccatttatgctg
tggag
113. agaccgtttcttattttgtgccgaagctatTTTTaaatcacaagctgaaacaggtgaaatcaaagggcattactt
gaatg
114. ctactcgggtacatgcaagaatgatgaaaagggtatatttgcagagaattgggagttcctatcgtaatgc
atgac
115. tacctaacagggggattcactgcaatactagcttggctcattattgccgagataatgggtctacttcttcacatc
caccg
116. cgcaatgcatgcagttattgatagacagaagaatcatggtatacacttccgtgtactagctaaagcgttacgtat
gtctg
117. gtggagatcatattcattccggtaccgtagtaggtaaacttgaaggggaaagagaaatcactttgggctttgtg
attta
118. ctgctgatgattttattgaaaaagatagaagtcgcggtatTTTtatttaccacaagattgggtctctctaccaggt
gttct
119. gcctgtagcttcgggcggtattcacgtttggcatatgcctgctctgaccgagatctttggagatgattccgtact
acagt
120. tcggtggaggaactttagggcacccttgggaaatgcaccgggtccgtagctaatacgagtagctctagaagcat
gtgta
121. caggctcgtaatgagggacgcatcttgctactgagggtaatgaaattatccgtgagggctaccaaaggagtcct
gaact
122. agctgctgcttgtgaagtatggaaggagattaaatttgagtttcaggcaatggatactttggatcaataactttc
gttct
123. cttaattgaatttcaattaaactcgcccaatctTTTactaaaaggattgagccgaatccaacatgcatatattt
tagat
124. agatacatacttatatagatatagaaaatttcaactaaaaactcgaagactaaacaactcaaactctttctatttt
tgtgt
125. tggttggatccacaattaatcctatggatGGCGGAATTAATTACTAGCTAGGTATAACTTCGTATAATGTATGC
TATAC
126. GAAGTTATTAATTAATCGACAGATCCCGAATTGGGATCGGTACCCAAAGCTCCCCGCGTCGTTCAATGAGAAT
GGATA
127. AGAGGCTCGTGGGATTGACGTGAGGGGCGAGGGATGGCTATATTTCTGGGAGCGAACTCCGGGCGAATACGAAGC
GCTTG
128. GATACAGTTGTAGGGAGGATTTATGGCAGAAGCGGTGATCGCCGAAGTATCGACTCAACTATCAGAGGTAGTTG
GCGTC
129. ATCGAGCGCCATCTCGAACCGACGTTGCTGGCCGTACATTTGTACGGCTCCGCAGTGGATGGCGGCCTGAAGCCA
CACAG
130. TGATATTGATTTGCTGGTTACGGTGACCGTAAGGCTTGATGAAACAACGCGCGAGCTTTGATCAACGACCTTTT
GAAA

131. CTTCGGCTTCCCTGGAGAGAGCGAGATTCTCCGCGCTGTAGAAGTCACCATTGTTGTGCACGACGACATCATTC
CGTGG
132. CGTTATCCAGCTAAGCGCGAACTGCAATTTGGAGAATGGCAGCGCAATGACATTCTTGCAGGTATCTTCGAGCCA
GCCAC
133. GATCGACATTGATCTGGCTATCTTGTCTGACAAAAGCAAGAGAACATAGCGTTGCCTTGGTAGGTCCAGCGGCGGA
GGAAC
134. TCTTTGATCCGGTTCTTGAACAGGATCTATTTGAGGCGCTAAATGAAACCTTAACGCTATGGAACCTGCCGCCCC
ACTGG
135. GCTGGCGATGAGCGAAATGTAGTGCTTACGTTGTCCCGCATTTGGTACAGCGCAGTAACCGGCAAAATCGCGCCG
AAGGA
136. TGTGCTGCCGACTGGGCAATGGAGCGCCTGCCGCCCAGTATCAGCCCGTCATACTTGAAGCTAGACAGGCTTA
TCTTG
137. GACAAGAAGAAGATCGCTTGGCCTCGCGCGCAGATCAGTTGGAAGAATTTGTCCACTACGTGAAAGGCGAGATCA
CCAAG
138. GTAGTCGGCAAATAATGTCTAGAGCGATCCTGGCCTAGTCTATAGGAGGTTTTGAAAAGAAAGGAGCAATAATCA
TTTTT
139. TTGTTCTATCAAGAGGGTCTATTGCTCCTTTCTTTTTTTCTTTTTATTTACTAGTATTTACTTACATAG
ACTTT
140. TTTGTTTACATTATAGAAAAGAAGGAGAGGTTATTTCTTGCATTTATTCATGATTGAGTATCTATTTTGATT
TTGTA
141. TTTGTTTAAAATTGTAGAAATAGAACTTGTCTCTTCTTGTCTAATGTTACTATATCTTTTTGATTTTTTTTTTTC
CAAAA
142. AAAAAATCAAATTTGACTTCTTCTTATCTTATCTTTGAATATCTCTTATCTTTGAAATAATAATATCATTGA
AATAA
143. GAAAGAAGAGCTATATTCGACCTATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATTGAATTCTAGTTAGTACC
GGGCC
144. CCTGAATCTAGTTAGTACCGGGCCCCaagcttGCTAGATTTTGTATTTCAAATCTGTATATCTAGGTAAGTAT
ATACT
145. TAGTCAAAATATATGCAATAGAATCTTTGTTGTATTTCGGCTCAATCCTTTTAGTAAAAGATTGGGCCGAGTTTAA
TTGCA
146. ATTCAATTAAGAGAACGAAGGATAATTACTTGAGTTCTTTCTCCTTATCCTTCTTTATTTCTGCTAATTTATCT
GCTAA
147. TGTCTACTCTAGATGGATCCACAATTTTTAAAATATTCAGGATGTAATCTCTAGCTACATGATGAAAAGCTAAT
CTTGA
148. ATCAAATCTCCATTCTAATACTTCTCTTTTCAGGATCATCCATTCCATGTAAAGATACAGGATGTAATAAAGAAGT
ATTTT
149. CTCTTTTATTAGCTTCTTCTAATTTTTCAGGTTCTACAGGTACTAATTTATAACACCATCCAAAAGTTAAAGGAT
AACGA
150. ATACCAGGTCCAGGAGTATAATTTTGCCAATCAGGAAAATATCCTTGAGTATGATAAAATCCATAAATCTAAAATA
TCTTG
151. TCTTCTTTGAGAATGAATTAATCCTTCTAATCCTCCTTTTTCTTTTAAAAAATGAGATAAATCTACAGCAGCTTT
ATAAG
152. TCATAGGTCTTAAAGTACTTGAGGAGTTACAGGAAATCCTACTTCTTCTTCTTCTTCTGAGCTTCTAACCAAGCAC
AATCA
153. GCATTAGTAGCAGCAGTATTAGAAGAAGTAATAGCTCCATGTTTTTCTAAATCTTGAGAAGCAGCTCCTACTCCA
TCAGC
154. AGCAGGTTACAGCTTCTCTCATTCTTTCTTCTTACAGTAGGCCATCCAATTACAGAAGATTTAGACCATTTCTCTCC
CATGA
155. ATTCTACTCTAGCTTTATGTCCAGGTCCTCCTACTCCTTGACAAGCAGTCATCATTCTTCTAAAGTAGCAGCAG
GTCCT
156. AATGCTTTTAAAATAGTTTTACAATCAGGATTAGCATTTTGTACTAATAAAGTTTCAGTCATCCAATTTTTTACT
TCTTG
157. AGATGCTTGTTACAGCTCTTAAAGTTTTATAAAATCTATCTACATAATCTCTAAAAGGTTCTTTAGGTCCTTGCTCT
AATAT
158. CTAATAAGAGTAGGAGAATACATCTTACAATTTTATTTAATCCTAAAATAATCCATCTTTTATAAAATTTCTC
CTACA
159. GGAATAGGAGGATTATTAGTCATCCATCCAATTTGTCTTGTAAGTAGAAGTAGTCCAGCAATATCAGATCCT
CTAGG
160. TTCTCTCATTTGTCCAGGAGCAATAGGTCAGCATGTACAGGATGTACTCTATCCCATTCAGCAGCTTCTTCATT
AATAG
161. TTTCTTTTAAACATTTGCATAGCAGCTTGATGTCCCTCTACAGTATTTAACATAGTATTTAAATCTTGAGGAGTAG
CTCCT

162. TCAGATAAAGCAGAAAACATAGGAATTACTTCAGGAGAAAATGCTTTTCTTCTACTACTTTTACCCAAGCATT
AAAGT
163. TCTAGGAGAAATAGCTTGATGTACCATTTGTCCTTGAATATTTTGTACAATAGGGGATCCGCTAGCCATATGTAT
ATCTC
164. CTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTTCTAGTGGGAAACCGTTGTGGTCTCCCTCCCAGAAATATAGCCATCCCTG
CCCC
165. TCACGTCAATCCCACGAGCCTCTTATCCATTCTCATGAACGACGGCGGGGAGCgagctcGTCGACattgggat
attat
166. tttagatcctgtatTTTTccctggatcgagacaggtatcacaactctttccaccatcctgtatattgtcctttt
gttcc
167. gtattgtaatagaaacttaactgattattagttattagacgagatTTTtacgaaaaattgttcgtaggagagaa
aatc
168. cTTTTTcaatacttacactccttattatattagttaataatcctagtgtattgtatgatgcttattctgata
ggaaa
169. taagatattcaataaattaaatgatttttctgctgaatgactattcatctattgtatTTTTcatgcaaatatggag
caaga
170. aaactctatgaaaagatgggtggttcaattcgatgtattttaagaaggagttcgaacacagatgtaggctaagtaa
atcaa
171. tgggcagtcttggctcattgaaaaatgccagtgaaagtaaagatccgaatagaaatgatacggataaaaaacattc
agggg
172. tgggggtggtcatgacaattacagtaatggtgatctTTTTTTTggcgtcaaggacattcggaaTTTTTctctgat
gatac
173. TTTTTtagtgaaagatagtaatggggacagttattctatatTTTTgatattgaaaatcatTTTTtgagattgc
caatg
174. atcatcTTTTTgtagtgaactagaaagtctTTTTatcggaattctagtgtatctgaataatggatctaagagta
agaat
175. cccgaccagatcgttacatggatgatactcagtatacttggaaataacacattaatagttgcattgacagttat
cttca
176. gtaccaaactctgtattgataattacattgtaagtggtaatgacaattccagtaacaataattccagtaacgagaa
ttcca
177. gtaacgagaattccagtaacgagaattccagtaacgagaattccagtaacgattacatttctagttccatttcta
gtcaa
178. agtgaaaatagtagtcaaaacgaggatatcacaacgagtgatcaaaactataccagaaagtttctactcatatgggt
gtaac
179. tcaacaataccggcatttgtgggttcaatgcaaaaattggtatggattaaattataagaaatTTTTTaaatcaaa
gatgc
180. atctttgtgaacaatgtggatatcatttgaaaatgagtagttcagatagaatcgaacttttgatcgatccgggca
cttgg
181. gagcctatggatgaagacatggtctctctggatccattgaatttcattcggaggaggagccttataaaaaatcgt
atcga
182. ttcttatcaaagaaatacaggggggatccactagttctagagcggccgccaccggtggagctaaccagcttt
tgttc
183. ccttttagtgagggtaattgcgcgcttggcgtaatcatggtcatagctgTTTcctgtgtgaaattgttatccgct
cacia
184. ttccacacaacatacagccggaagcataaagtgtaaagcctggggtgcctaataagtgagtaactcacattaa
ttgcg
185. ttgcgctcactgccgctttccagtcgggaaacctgctgctgcagctgattaatgaatcggccaacgcgcgggg
agagg
186. cggtttgctgattggcgctcttccgcttctcctcgtcactgactcgtcgcgctcggctcgttcggctcgggagc
ggtat
187. cagctcactcaaaggcggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaagaacatgtgagcaaaa
gccag
188. caaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccggttctgctggcgtTTTTTccataggctccgccccctgacgagcatcac
aaaa
189. tcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataaccaggcgtttccccctggaagctccct
cgtgc
190. gctctcctgttccgaccctgccgcttacccgatacctgtccgcctttctccttcgggaagcgtggcgctttctc
atagc
191. tcacgctgtaggtatctcagttcgggtgaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcaacgaacccccgttccg
cccga
192. ccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagccaacccgtaagacacgacttatcgccactggcagcagc
cactg

193. gtaacaggattagcagagcggaggtatgtaggcgggtgctacagagttcttgaagtggtaggcctaactacggctaca
ctaga
194. aggacagtatattgggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggc
aaaca
195. aaccaccgctggtagcggtagggttttttggtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaaga
tcctt
196. tgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaaacgaaaactcacgtaagggttttgggtcatgagattatcaa
aaagg
197. atcttcacctagatccttttaattaaaaatgaagttttaaatacaatctaaagtatatatgagtaaacttggct
gacag
198. ttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatcttcgttcatccatagttgcctgactccc
cgctg
199. tgtagataactacgatacgggagggcttaccatctgccccagtgctgcaatgataccgcgagacccacgctcac
cggct
200. ccagatttatcagcaataaaccagccagccggaaggccgagcgcagaagtggctctgcaactttatccgcctcc
atcca
201. gtctattaattggtgcccgggaagctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgcaacgttggtgccattgc
tacag
202. gcatcgtgggtgcacgctcgtcgtttgggtatggcttcattcagctccggttcccaacgatcaaggcgagttacat
gatcc
203. cccatggttgcaaaaaagcgggttagctccttcggtcctccgatcgttgtcagaagtaagttggccgcagtggtta
tcaact
204. catggttatggcagcactgcataattctcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactggtgagta
ctcaa
205. ccaagtcattctgagaatagtgatgcggcgaccgagttgctccttgccggcgctcaatacgggataataaccgcg
cacat
206. agcagaacttttaaaagtgtcatcattggaaaacgttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctggtg
agatc
207. cagttcgatgtaaccactcgtgcacccaactgatcttcagcatcttttactttcaccagcgtttctgggtgagc
aaaaa
208. caggaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaataagggcgacacggaatggtgaatactcatactcttctcttttc
aatat
209. tattgaagcatttatcaggggtattgtctcatgagcggatacatatttgatgatttagaaaaataaacaata
ggggg
210. tccgcgcacatttccccgaaaagtgccac