

CLONACIÓN DE REGIONES CLOROPLASTÍDICAS DE CEDRO (*Cedrela odorata*) PARA LA ELABORACIÓN DE VECTORES DE TRANSFORMACIÓN

Timoteo Rodríguez López, Abadesa C. Gregorio Martínez, Alejandro G. Nila Méndez, Elizabeta Hernández Domínguez, José A. González Rodríguez, Yuri J.J. Peña Ramírez. Unidad de Investigación de Biotecnología Vegetal. Instituto Tecnológico Superior de Acayucan. Carretera Costera del Golfo Km. 216.4 Col. Agrícola Michapa. Acayucan, Veracruz. Tel/Fax: 01 924 24 574 10, email: unibve@itsacayucan.edu.mx

Palabras clave: ADN, cloroplastos, PCR

Introducción. El cedro rojo (*Cedrela odorata*) es un árbol perteneciente a la familia de las meliáceas, su madera es considerada fina y duradera. Sin embargo, esta especie es atacada por el barrenador de las meliáceas llamado *Hypsipyla grandella* (ver Fig.1. A) (1). Debido a ello, la manutención de plantaciones comerciales de cedro podrían ser muy costosas o incluso no factibles. Con la finalidad de obtener a mediano plazo plantas transgénicas resistentes a *Hypsipyla grandella*, nuestro grupo de investigación trabaja en la propagación *in vitro* y en el establecimiento de protocolos de transformación nuclear y plastídica.

El objetivo de este trabajo consiste en la clonación de productos de amplificación de la zona rrn16S a la zona rrn23S de la región IR (repetido inverso) del ADN cloroplastídico de *C. odorata* para su posterior utilización en la construcción de vectores de transformación plastídica.

Metodología. Se utilizaron hojas de plántulas de *C. odorata* crecidas y desarrolladas *in vitro* (ver Fig.1. B). Utilizando este material, la extracción y purificación de ADN cloroplastídico (ADNcl) se realizó de acuerdo a lo reportado por Daniell *et al* (2). En un gel de agarosa, se observó la integridad de las muestras de ADNcl obtenidas. Cada muestra se utilizó como templado para la optimización de reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) que nos permitieran obtener productos de amplificación parciales de la región IR (repetido invertido) del ADNcl de cedro rojo. Las reacciones de PCR y otras técnicas moleculares se realizaron utilizando protocolos estandarizados reportados en la literatura (3).

Resultados y discusión. Se tomaron muestras de hojas de cedro para la extracción de ADNcl (ver Fig.1. B). La visualización del ADN cloroplastídico fue de acuerdo a lo esperado: una banda discreta de alto peso molecular (ver Fig.2. A). Para la obtención de productos de amplificación de regiones parciales IR, se realizó una matriz experimental en la que se utilizaron seis diferentes pares de primers a tres temperaturas de alineamiento (51.5 °C, 59.0 °C y 65.0 °C) (ver Fig.2. B). Basándonos en otros genomas cloroplastídicos secuenciados, el tamaño esperado de estos productos de amplificación era entre 2 Kpb y 4 Kpb; este dato concordó con los tamaños

obtenidos experimentalmente (ver Fig.2. B). Actualmente, estamos trabajando en la clonación y secuenciación de estos productos.

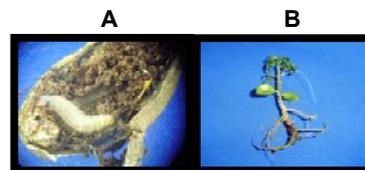


Fig.1. A. Barrenador de las meliáceas (*Hypsipyla grandella*) que ataca al árbol de cedro. B. Muestra de una planta de cedro utilizada para la extracción de ADNcl

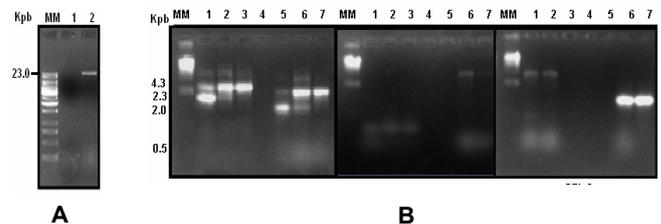


Fig.2. Evaluación de ADN cloroplastídico y amplificación parcial de la región IR. A. ADNcl de cedro. B. Optimización de PCR para cedro

Conclusiones. Se obtuvo ADNcl de cedro. Utilizando este ADNcl como templado, se obtuvieron productos de amplificación por PCR empleando cebadores específicos que hibridan en zonas específicas de la región IR cloroplastídica de *C. odorata*.

Agradecimiento. Proyecto Ciencia Básica de Fondo Institucional SEP-CONACYT 2006-53851-C01.

Bibliografía.

1. Newton, A.C., Baker, P., Ramnarine, S., Mesen, J.F. y Leakey, R.R.B. (1993). The mahogany shoot borer: prospects for control. *Forest Ecol. Manage.* 57 (1-4): 301-328.
2. Daniell, H., Datta, R., Varma, S., Gray, S. y Lee, S.B. (1998). Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome. *Nat. Biotechnol.* 16: 345-348.
3. Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, NY, USA.