

CULTIVOS DE RAÍCES BRÓCOLI TRANSFORMADAS CON EL cDNA DEL GEN 1 DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANO

García-López, Edgar¹; Martínez-Rodríguez, Herminia G²; Ramos-Ramírez, Emma G¹; Ariza-Castolo, Armando³; Esparza-García, Fernando J¹; Gómez-Guzmán, Octavio¹; Calva-Calva, Graciano¹.

egarcial@cinvestav.mx, gcalva@cinvestav.mx

¹Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. Av. IPN 2508 Col. San Pedro Zacatenco. México, D.F., México 07360. Apartado postal 14-740, 07000. Teléfono: 57473800 Ext. 4348.

²Facultad de medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, ³Departamento de Química del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.

Palabras clave: *Hairy roots*, *Brassica oleracea*, Proteínas heterólogas, *hGH1*

Introducción. Los cultivos de raíces transformadas, comúnmente conocidas como *Hairy roots*, han probado ser modelos biotecnológicos adecuados para la expresión de proteínas heterólogas con actividad terapéutica y de diagnóstico. Estas raíces son generadas por transfección de material genético foráneo a células vegetales vía *Agrobacterium rhizogenes* (Tzfira et al., 2006).

En este estudio se establecieron cultivos de raíces transformadas de brócoli con el cDNA del gen 1 de la hormona del crecimiento humano (*hGH1*).

Metodología. Fue construido un vector binario basado en el plásmido pCambia1105.1 (pC1105.1) que integra el cDNA del gen de la *hGH1*; denominado pCAMhGHE. El plásmido fue introducido a *A. rhizogenes* LBA9402 por electroporación. Esta cepa fue usada posteriormente para la inducción de raíces transformadas en plántulas de brócoli por punción de hipocotilos. La transformación del tejido se confirmó por el ensayo de actividad de β -glucuronidasa (GUS) (Sundaresan 1995) y por amplificación por PCR de la región del cDNA de *hGH1* usando como templado el DNA genómico extraído de las raíces transformadas.

Resultados y discusión. EL análisis por PCR demostro la presencia del cDNA del gen *hGH1* (822 pb) en vector quimérico pCAMhGHE (12.9 Kb) después de se amplificado con los iniciadores 5'-tggtctctcatgggtaaacgacgagccagt-3' y 5'- tggctccgatctcaggaacagctatgac-3'). Tales iniciadores incluyen en su secuencia el sitio de restricción Eco31I, aparte a los de interés (NcoI y BglII). Con este constructo el cDNA fue movilizadado a *A. rhizogenes* por electroporación y confirmada su presencia por electroforesis y PCR (Fig 1).

Los hipocotilos infectados con la cepa *A. rhizogenes* pCAMhGHE mostraron la presencia de raíces aéreas, con las características morfológicas típicas de las raíces transformadas, en el punto de punción después de 15 días.

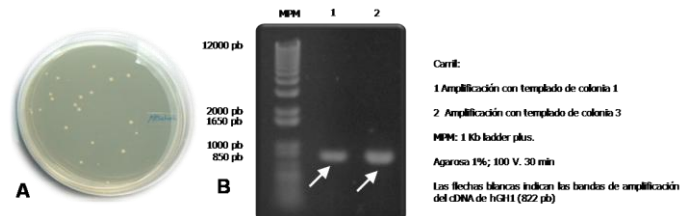


Fig. 1. A) Colonias resultantes de la integración de moléculas recombinantes pCAMhGHE B) Amplificación de la región de *hGH1* en DNA plasmídico

Las raíces emergidas de los puntos de punción fueron separadas y proliferadas de la parte aérea de la planta para ser puestas en medio SH (Schenk & Hildebrandt) líquido con higromicina (100 μ g/ml) para la selección de transformantes. La transformación del tejido se confirmó buscando la expresión del gen reportero GUSplus que codifica para la β -glucuronidasa por la aparición del precipitado azul de cloro-bromoindigo y la amplificación de la región del cDNA de *hGH* en el DNA genómico de raíces (Fig. 2).

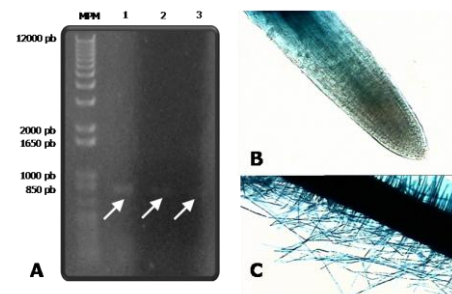


Fig. 2. A) Amplificación de la región de *hGH1* en DNA genómico de raíces B) Expresión de β -glucuronidasa en tejido transformado

Conclusiones. Se establecieron cultivos de raíces de brócoli transformadas con el cDNA del gen *hGH1*. La presencia del gen en las raíces se confirmó por su amplificación por PCR y la expresión de β -glucuronidasa.

Agradecimiento. A CONACyT por la beca otorgada al primer autor (beca 207131) y el apoyo al proyecto 47678.

Bibliografía

- Sundaresan V., Springer P., Volpe T. 1995. Patterns of gene action in plant development revealed by enhancer trap and gene trap transposable elements. *Genes and development*. 9: 1797-1810
- Tzfira T., Citovsky V. 2006. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Curr op in biotech*. 17: 147-154.