



SOBRE EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CELULASAS EN CLOROPLASTOS DE TABACO

Edward Alexander Espinoza-Sánchez¹, Jorge Ariel Torres-Castillo², Quintín Rascón-Cruz³, Sugey Ramona Sinagawa-García^{1*}

¹Laboratorio de Biotecnología, Campus de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de Nuevo León, Francisco Villa S/N Col. Ex hacienda El Canadá, General Escobedo, N.L. C.P. 66050. Tel: +52 8113404399 ext. 3517.

²Instituto de Ecología Aplicada, Universidad Autónoma de Tamaulipas, División del Golfo No. 356. Colonia Libertad. Cd. Victoria, Tamaulipas, México, CP. 87019.

³Laboratorio de Biotecnología I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, Circuito 1, Nuevo Campus Universitario, 31125 Chihuahua, México.

*autor de correspondencia: ssinagawa@gmail.com

Palabras clave: transformación genética, cloroplastos, celulasas

Introducción. La ingeniería genética de cloroplasto ha generado avances importantes en la biotecnología, jugando un rol crucial en el mejoramiento genético de plantas con múltiples ventajas como nulos efectos de posición, ausencia de efectos epigenéticos y la contención de los transgenes⁽¹⁾; la transformación genética de cloroplastos ha sido satisfactoriamente lograda en tabaco, papa, tomate, soya, coliflor y lechuga, integrando más de 100 transgenes; asimismo, han sido realizadas investigación para la expresión de enzimas celulolíticas⁽²⁾; aunque los reportes para este tipo de enzimas han sido limitados⁽³⁾.

Debido a esto, se utilizó la tecnología transplastómica para sobre expresar enzimas que degradan celulosa para estudiar su expresión, estabilidad, actividad y su efecto en el metabolismo normal de las plantas.

Metodología. Tres genes fueron utilizados: β -glucosidasa (*bgl1*) de *Aspergillus niger*, celulasas A (*CelA*) y celulasa B (*CelB*) de *Thermotoga neapolitana*. Las secuencias fueron diseñadas in silico y sujetas eliminación de sitios de restricción no deseados. Los genes *bgl1*, *CelA*, *CelB* y el dicistrón *CelA-CelB* fueron flanqueados por el promotor del gen *rrn16S* y una secuencia terminadora del gen *rbcl*; una secuencia Shine-Dalgarno (SD) y secuencia líder (LS) del gen *rbcl*. Plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* var. Petite havana) fueron transformadas por biobalística. Los explantes bombardeados fueron colocados en medio RMOP suplementado con 500 mg L⁻¹ de espectinomomicina/estreptomomicina. ADN total fue extraído de plantas de tabaco para análisis de PCR usando primers específicos de cada gen bajo las siguientes condiciones: 2 min de desnaturalización, 25 ciclos de amplificación (45 s a 94°C, 45 s a 60°C, 1 min a 72°C). Para el análisis de Southern blot las muestras fueron digeridas con *BamHI* usando una sonda *rRNA16S*. Para el análisis de ARN un Northern blot fue realizado; las sondas fueron marcadas con digoxigenina mediante amplificación por PCR.

Resultados. Cuatro vectores fueron construidos: pES6, pHM4, pHM5 y pHM6 derivados del pES4⁽⁴⁾ conteniendo los genes *bgl1*, *CelA*, *CelB* y *CelA-CelB*, respectivamente. Explantes regenerantes fueron obtenidos después del bombardeo a las cinco semanas con una eficiencia de transformación de 3.14%; los explantes fueron crecidos en invernadero hasta floración. Las plantas obtenidas fueron PCR-positivas amplificando los fragmentos correspondientes a los genes de interés. La sonda de Southern blot hibrido con un solo fragmento de 3 kb en plantas wt mientras que en plantas transformadas lo hizo con un fragmento de 5.783 kb correspondiente al gen *Bgl1*, 4.8 kb para *CelA-CelB*, 3.7 kb para *CelA* y 3.8 kb para *CelB*. La ausencia de fragmentos de 3 kb sugiere un estado homoplásmico en todas las plantas. El análisis de transcritos confirmó monocistrones en todas las plantas incluyendo la construcción *CelA-CelB*. Semillas de todas las plantas fueron espectinomomicina-resistentes confirmando la segregación de los genes. El análisis enzimático mostró alta actividad sobre sustratos comerciales.

Conclusiones. La transformación genética de cloroplasto puede ser usada de forma eficiente para sobre expresar enzimas que degraden paredes celulares con alta actividad enzimática. Estos resultados contribuyen con nueva información para realizar mejoramiento genético en otros sistemas de expresión con este tipo de enzimas con impacto en el sector agrícola o biocombustibles.

Agradecimiento. Agradecemos a CONACYT por el financiamiento de este proyecto CB-2012-01 179794

Bibliografía.

1. Daniell H, Ruiz ON, Dhingra A. (2005). Mol Biol 286:111-138
2. Verma, D., A. Kanagaraj, S. Jin, N. Singh, P. Kolattukudy, H. Daniell. (2010). Plant Biotechnol J, 8, 332 - 350
3. Petersen K, Bock R. (2011). Plant Mol Biol 76:311-321
4. Espinoza-Sánchez EA, Torres-Castillo JA, Rascón-Cruz Q, Gutiérrez-Díez A, Zavala-García F, Sinagawa-García SR. (2015). Elec J Biotech (en prensa).