



MAPEO FÍSICO DEL GENOMA DE CLOROPLASTO DE *Bouteloua gracilis* MEDIANTE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN, PARA EL DESARROLLO DE HERRAMIENTAS MOLECULARES

David A. Betancourt-Guerra, Gerardo A. Aguado Santacruz, Sigifredo Arevalo Gallegos, Blanca E. Rivera Chavira, Gpe. V. Nevarez Moorillon, Quintín Rascón-Cruz[†],

[†]Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, Cd. Universitaria s/n, CP 31070, Apartado postal 1542-C. Chihuahua, México. (614) 414-4492 grascon@uach.mx

Palabras clave: Bouteloua, Transgénicos, Cloroplasto.

Introducción. La presencia del DNA en el cloroplasto (cpDNA) fue establecido en 1963, convirtiéndose así en un primer candidato de estudio. El surgimiento de la tecnología del DNA recombinante permitió que en 1983 se obtuvieran las primeras plantas transgénicas, convirtiéndose este evento en el origen de una problemática ambiental de tipo ecológico como lo es la transferencia horizontal de genes a especies relacionadas. Este problema despertó un creciente interés mundial por la seguridad ambiental y a nosotros nos ha llevado a diseñar una estrategia que de solución a esta problemática donde se limite la transferencia de genes a otras plantas. Los avances en la biología molecular han permitido que en la actualidad se expresen y se almacenen vacunas en cloroplastos transgénicos (1). Sin embargo, estos sistemas de transformación genética son útiles para plantas de la misma especie (hecho a la medida) y hasta el momento no se han desarrollado las estrategias para la transformación genética de cloroplastos en gramíneas. En nuestro grupo ya contamos con un cultivo celular embriogénico de *Bouteloua gracilis*, que es el pasto forrajero más importante de los pastizales semiáridos de México. Este cereal ha tomado gran importancia para nuestro equipo de trabajo, y particularmente el estudio de sus cloroplastos debido a dos características importantes, por su participación en la resistencia al estrés hídrico de la planta, y porque la transferencia de los cloroplastos a la descendencia es preferentemente materna.

Considerando la enorme importancia que tienen los cloroplastos de *B. gracilis*, se pretende hacer un mapa físico del cpDNA y la clonación de segmentos de este, para posteriormente diseñar vectores de transformación genética de cloroplastos en este modelo, y así reducir el riesgo de la liberación accidental de genes a través del polen.

Metodología. El cpDNA fue extraído como previamente fue descrito (2) con algunas modificaciones; a partir de cultivos celulares embriogénicos de *B. gracilis*, y de hojas de maíz y tabaco; el cpDNA obtenido se sometió a restricción con las enzimas BglII, BamHI, EcoRI además de la combinación entre las tres enzimas; los fragmentos digeridos se separaron en geles de agarosa y se transfirieron a membrana de nylon, posteriormente se ubicaron los fragmentos que contenían el operon de rDNA. La sonda fue marcada por PCR incorporando Dig-dUTP. El Southern blot se realizó como previamente se describió (3).

Resultados y Discusión. Se estandarizó un método de extracción y enriquecimiento de cpDNA de hoja de maíz y cultivos celulares de *Bouteloua gracilis*, que permiten la digestión y análisis del ADN. En la Fig. 1 se muestra el análisis

del cpDNA y se puede ver que tanto el patrón de restricción como el de hibridación son similares en *B. gracilis* y maíz, sin embargo estas dos difieren más del patrón obtenido para tabaco por tratarse esta última de una solanácea.

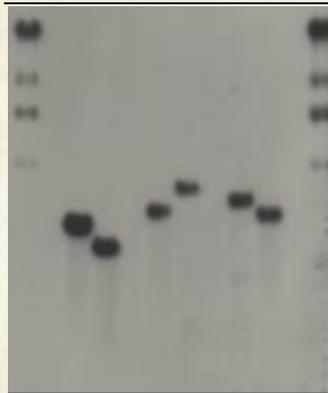


Fig. 1 Análisis de cpDNA de Tabaco (carriles 3 y 4), Maíz (carriles 6 y 7) y *B. gracilis* (carriles 9 y 10), Dig-Lambda HindIII (carriles 1 y 12) A) Patrón de restricción con EcoRI/BglIII (carriles 3, 7 y 9) EcoRI/BamHI (carriles 4, 6 y 10). B) Patrón de hibridación para la sonda 16S Ribosomal.

Los fragmentos que son reconocidos en la hibridación en maíz y pasto son ligeramente mayores respecto al operon del rDNA de tabaco utilizado para vectores de recombinación homóloga. Estos además, están flanqueados por sitios de restricción conocidos, lo que facilita su clonación.

Conclusiones. La similitud en los patrones de digestión entre maíz y *B. gracilis* indican que existe una gran homología en secuencia esto se puede atribuir a que ambas pertenecen a la familia de las gramíneas, esto permitirá diseñar vectores de transformación para cloroplastos en los sistemas de maíz y pasto.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo económico otorgado por PROMEP. UACHIH-PTC-41.

Bibliografía

1. Nixon, P., Maliga, P., Dougan, G. y Treoning, J. (2004) New advances in the production of edible plants vaccines: chloroplast expresión of a tetanus vaccine antigen, TetC. *Phytochemistry*. 65:989-994.
2. Palmer, J. (1986) Isolation and structural analysis of chloroplast DNA. *Method Enzimol* 118:167-186.
3. Rascón-Cruz, Q., Sinagawa-García S., Osuna-Castro J., Bohorova N. y Paredes-López O. (2004) Assembly, accumulation and digestibility of amarantin expressed in endosperm of transgenic tropical maize. *Theor. Appl. Genet.* 108:335-342.