



TRANSFORMACIÓN NUCLEAR Y DE CLOROPLASTO EN SISTEMAS VEGETALES CON GENES SINTÉTICOS ANTIMICROBIANOS

Areli Herrera-Díaz, Sergio Rosales-Mendoza, Schuyler S. Korban, Roberto Montes de Oca-Luna y Ángel G. Alpuche-Solís.

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. Camino a La Presa San José 2055 CP 78216, San Luis Potosí, S.L.P Tel. (444) 8342000 e-mail. alpuche@ipicyt.edu.mx.

Palabras clave: Transformación de cloroplastos, transformación nuclear, Péptidos antimicrobianos.

Introducción.

El uso de plantas transgénicas para la producción de proteínas de importancia farmacéutica es una excelente alternativa biotecnológica. En general las ventajas son: se pueden crecer fácilmente en grandes volúmenes, evitando el uso de fermentadores, la purificación de la proteína heteróloga es económica o puede no ser necesaria, se evitan las contaminaciones de toxinas o secuencias virales que pueden tener otros sistemas (1). Dentro del área de la transformación genética de plantas, en los últimos diez años fue posible introducir genes al genoma del cloroplasto. Esta tecnología emergente cuenta con ventajas respecto a la transformación nuclear tales como: 1-Ausencia de flujo de transgenes mediante polen. 2. Altos niveles de expresión (hasta 20% de la proteína total soluble). 3. No presenta efectos epigenéticos (2). Particularmente en el caso de los péptidos antimicrobianos se han reportado buenos resultados de plantas transgénicas con genes sintéticos resistentes a bacterias y hongos (3). Las Protegrinas son péptidos antimicrobianos de la familia de las cathelicidinas con un amplio espectro de acción, lo que les ha dado usos importantes en biomedicina.

El objetivo del proyecto es lograr la expresión de genes de Protegrina en plantas de zanahoria y lechuga, empleando la transformación nuclear y en tabaco utilizando la transformación de cloroplastos.

Metodología. Se diseñaron genes sintéticos optimizados de Protegrina fusionado al péptido señal de la proteína antifúngica 2 de rábano, para la transformación nuclear y de Protegrina fusionado a Ubiquitina, para la transformación de cloroplasto. Para la transformación nuclear, el gen fue clonado en el vector pCAMBIA1304, bajo el promotor constitutivo CaMV35S. La construcción obtenida pCAMBIA1304-PG1 se transfirió a *Agrobacterium tumefaciens* que se empleó en la transformación de zanahoria y lechuga (4). En la transformación de cloroplastos se empleó el vector pKCZ en el que se clonaron, el Promotor Prn, la región 5'UTR del fago T7 y los genes de Protegrina fusionados a Ubiquitina (Figura 1). Se realizaron co-bombardos con las construcciones obtenidas y un cassette que contenía el gen de selección para espectinomicina (3).

Resultados y discusión. Para la transformación nuclear se cuenta con el vector de transformación pCAMBIA1304-PG1, se han obtenido 55 plantas de lechuga y 20 brotes de

zanahoria, después de tres meses, en medio de cultivo de selección. Se obtuvieron vectores para cloroplasto con genes de Protegrina fusionada a Ubiquitina. Posteriormente se realizaron tres experimentos de co-bombardos con el gen antimicrobiano de interés y el de selección (PKCZ-espectinomicina). Se cuenta con explantes en medio selectivo que están en etapa de regeneración. Se seleccionarán las transformantes mediante PCR y se transferirán a tierra, para realizar posteriormente análisis de actividad antimicrobiana con microorganismos de importancia biomédica y fitopatológica.



Figura 1. Mapa de la construcción pKCZ-Ubiquitina-Protegrina. El gen se encuentra bajo el control del promotor Prn de cloroplasto y flanqueado por regiones intergénicas para la recombinación homóloga específica de cloroplasto.

Conclusiones. Se cuenta con 55 plantas de lechuga y 20 brotes de zanahoria en medio de selección, las cuales fueron obtenidas a partir de la transformación nuclear con el gen de la Protegrina. Se obtuvieron vectores para cloroplasto con el gen de la Protegrina y se realizaron experimentos de biobalística en tabaco.

Agradecimiento. Al CONACYT por el financiamiento otorgado para la beca de maestría, al proyecto 37048-B. Al programa TIES-USAID Training program por la beca otorgada y al Dr Hans-Ulrich Koop por el vector PKCZ.

Bibliografía.

1. DeGray, G, Smith, FJS y Daniell, H. (2001). Expression of an antimicrobial peptide via the chloroplast genome to control phytopathogenic bacteria. *Plant Physiol.* 127: 852-862.
2. Giddings, G. (2001). Transgenic plants as protein factories. *Current Opinion in Biotechnology.* 12:450-454
3. Maliga, P. (2002) Engineering the plastid genome of higher plants. *Curr Opin Plant Biol.* 5: 164-72.
4. Curtis, IS, Power, JB, Blackhall, NW, Laats, AMM y Davey, MR. (1994). Genotype-independent transformation of lettuce using *Agrobacterium tumefaciens*. *J Exp Bot.* 45: 1441-1449.