



MAPEO FÍSICO DEL GENOMA DE CLOROPLASTO DE *Bouteloua gracilis*, PARA EL DESARROLLO DE VECTORES PARA LIMITAR LA TRANSFERENCIA HORIZONTAL DE GENES

David Betancourt-Guerra, Gerardo Aguado Santacruz, Sigifredo Arevalo Gallegos, Blanca Rivera Chavira, Guadalupe Nevarez Moorillon, Quintín Rascón-Cruz, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua. Cd. Universitaria s/n, CP 31070. 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. 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 a despertado un creciente interés mundial por la seguridad ambiental. Hay modelos de transformación de cloroplasto en solanáceas, sin embargo nada se ha hecho para realizarlo en gramíneas. Existen ventajas sobresalientes en la transformación del cloroplasto sobre la transformación nuclear: Mayor nivel de expresión, menor efecto de silenciamiento, biocontención de genes por el carácter uniparental de segregación del cpDNA (1).

Considerando la enorme importancia que tienen conocer el cpDNA de *B. gracilis*, se presenta un mapa físico del cpDNA y la clonación de segmentos con capacidad de recombinación homóloga, y el diseño de vectores de transformación genética de cloroplastos para pasto y maíz.

Metodología. El cpDNA fue extraído de acuerdo con lo descrito en (2) con algunas modificaciones; a partir de cultivos celulares embriogénicos de *B. gracilis*, de hojas de maíz y tabaco; el cpDNA obtenido se cortó con las enzimas BgIII, BamHI, EcoRI y combinación entre ellas. Los fragmentos se separaron en geles de agarosa y se transfirieron a membrana de nylon. Se ubicaron los fragmentos que contenían el operon de rDNA, con la sonda de rDNA marcada con Dig-dUTP. El Southern blot se realizó como previamente se describió en (3). Se utilizaron primers diseñados en regiones poco variables del cpDNA ribosomal de maíz y arroz para amplificar *B. gracilis*.

Resultados y Discusión. Se estandarizó un método de extracción y enriquecimiento de cpDNA de hoja de maíz y cultivos celulares de *Bouteloua gracilis*, que permite la digestión y análisis del cpADN. En la Fig. 1 se muestran las diferencias entre los operones ribosomales del cpDNA de tabaco, maíz y pasto.

Se puede ver que tanto el patrón de restricción como el de hibridación son similares en *B. gracilis* y maíz, sin embargo difieren más del patrón obtenido para tabaco por tratarse esta última de una solanácea. Se amplificaron fragmentos de 5 kb de los repetidos invertidos (16S-tRNA18-tRNA14-23S) amplificados por PCR que fueron clonados en el vector pMOSBlue Fig 3.

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.

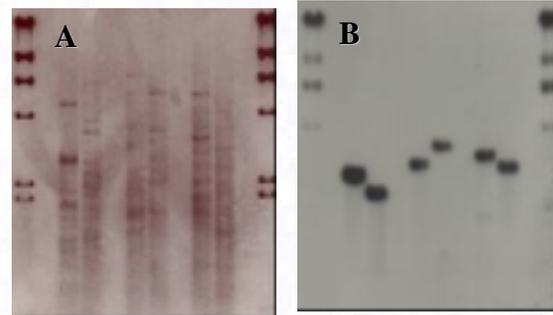


Fig. 1 Análisis de cpDNA de Tabaco (carriles 3 y 4), Maíz (carriles 6 y 7) y *B. gracilis* (carriles 9 y 10), Lambda HindIII-Dig (carriles 1 y 12) A) Patrón de restricción con EcoRI/BgIII (carriles 3, 7 y 9) EcoRI/BamHI (carriles 4, 6 y 10). B) Patrón de hibridación 16S.

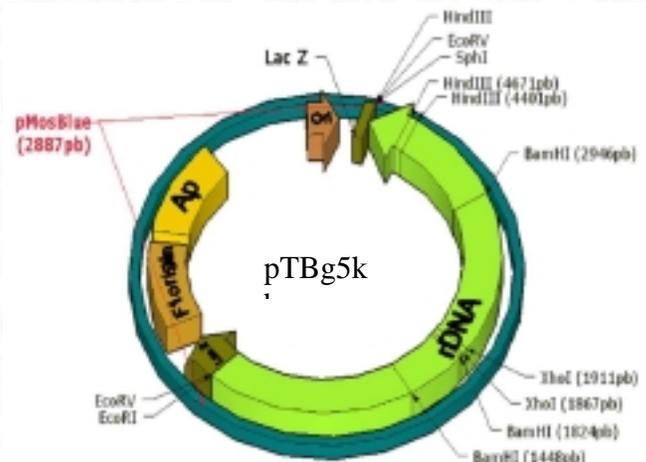


Fig. 2. Mapa del vector básico para el pTBg5kb con genes de recombinación homóloga. Se muestran los sitios de digestión encontrados

Agradecimientos. Los autores agradecen el apoyo económico otorgado por PROMEP. UACHIH-PTC-41. Proyecto interno SIP-FCQ-UACH

Bibliografía

- Nixon, P., Maliga, P., Dougan, G. y Treoning, J. (2004) New advances in the production of edible plants vaccines: chloroplast expression of a tetanus vaccine antigen, TetC. *Phytochemistry*. 65:989-994.
- Palmer, J. (1986) Isolation and structural analysis of chloroplast DNA. *Method Enzimol* 118:167-186.
- 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.