



# XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



## AVANCES EN EL ESTABLECIMIENTO DE UN SISTEMA DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA ESTABLE PARA EL MUSGO *Plagiomnium cuspidatum*.

Fret Cervantes-Díaz, Alejandra Chamorro-Flores, Analilia Arroyo, Raúl Delgado-Macuil, Miguel Ángel Villalobos.  
Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, Instituto Politécnico Nacional, Tepetitla de Lardizabal, Tlaxcala  
C.P. 90700. mvillalobos@ipn.mx

*Palabras clave:* Transformación genética, musgo, *P. cuspidatum*.

**Introducción.** La transformación genética de plantas ha tenido muchas aplicaciones en diversos campos de la ciencia, generando beneficios a la sociedad (1). Recientemente, la transformación genética de los musgos ha surgido como una alternativa para la producción de biofarmacéuticos, debido a que presentan un sistema secretor que permite conducir las proteínas recién sintetizadas a través del retículo endoplasmico y el aparato de Golgi, los cuales son responsables de la N-glicosilación y muchas modificaciones postraduccionales (2). *Plagiomnium cuspidatum* es un musgo mexicano que presenta cualidades que lo hacen un organismo de gran interés biotecnológico. Se ha observado que sus gametóforos pueden tolerar condiciones de desecación (30% de humedad relativa) por periodos mayores a 2 años. Además el desarrollo de un eficiente sistema de propagación *in vitro*, tanto en medio sólido como líquido, ha permitido conocer que en otras fases de su ciclo de vida, como son las esporas y protonemas, pueden germinar y/o sobrevivir aún bajo condiciones extremas de estrés salino y osmótico (NaCl 200 mM, Manitol 600 mM y NaCl 300 mM, Manitol 1000 mM, respectivamente); sin embargo, la falta de un protocolo para la transformación de este musgo ha limitado su estudio a nivel molecular. De esta manera, el objetivo que se pretende alcanzar es: Establecer un sistema de transformación genética estable para el musgo *P. cuspidatum*, que permita conocer la función de probables genes de respuesta a estrés abiótico (mediante Knockout) y explorar la producción de proteínas recombinantes.

**Metodología.** En primera instancia se estableció un procedimiento de obtención de protoplastos de *P. cuspidatum* y del musgo modelo *Physcomitrella patens*, el cual cuenta con eficiente sistema de transformación genética, aunque este musgo no es tan tolerante a estreses abióticos como *P. cuspidatum*. Los protoplastos fueron obtenidos a partir de tejido protonemal mediante la acción de driselasa en una concentración de 2 % durante 1.5 hrs, posteriormente fueron resuspendidos en una concentración de  $1.6 \times 10^6$  protoplastos/ml. A continuación fueron transformados con los plásmidos pTFH38.9c y pPGX8 mediante choque osmótico generado por polietilenglicol 8000. Los protoplastos fueron sembrados en medio de regeneración, donde permanecieron 4 días. Posteriormente fueron transferidos

a medio selectivo (con antibióticos) para seleccionar los protoplastos transformados genéticamente.

**Resultados.** La eficiencia en la obtención de protoplastos en *P. cuspidatum* y *P. patens* ha sido muy alta,  $5.2 \times 10^6$  y  $4.5 \times 10^6$ , respectivamente (fig.1).

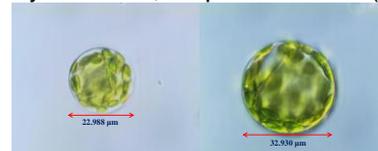


Fig. 1. Imagen representativa de un protoplasto de *P. cuspidatum* y de *P. patens* (fotografías a 1000X).

Los protoplastos de ambas especies han sido capaces de regenerar tejido en el medio de regeneración (fig. 2).

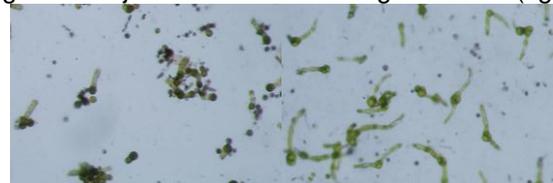


Fig 2. Protoplastos de *P. cuspidatum* y *P. patens* regenerando tejido.

No obstante, hasta este momento sólo se han podido transformar los protoplastos de *P. patens* (fig. 3).

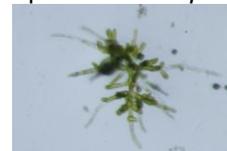


Fig. 3. Protonema transgénico de *P. patens* creciendo en medio con antibiótico.

**Conclusiones.** La obtención de protoplastos en ambos musgos y la regeneración de tejido a partir de ellos, han sido muy exitosas. Los resultados preliminares obtenidos para la transformación genética son promisorios aunque nos muestran que este paso requiere ser ajustado a nuestras condiciones. Se presentarán y discutirán los avances más recientes.

**Agradecimiento.** Agradecemos a SIP (20113190, 20113106, 20113727, 20113728, 20113585 y 20111086).

### Bibliografía.

1. Newell C A. 2000. *Mol. Biotech.* 16:53-65.
2. Beike A K, Decker E L, Frank W, Lang D, Vervliet-Scheebaum M, Zimmer A D y Reski R. 2010. *Trop. bryol.* 31:22-32.